

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

Unidad Mixta de Investigación en Genómica y Salud  
Centro Superior de Investigación en Salud Pública  
Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva



# FRACCIONANDO LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL HUMANA

Memoria presentada por Francesc Peris-Bondia para optar al grado de doctor en  
Biodiversidad por la *Universitat de València*

Directores:

Dra. Amparo Latorre Castillo

Dr. Giuseppe D'Auria

Valencia 2012



*Si algo sabemos omnipresente, son las bacterias.*



FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

Unidad Mixta de Investigación en Genómica y Salud  
Centro Superior de Investigación en Salud Pública  
Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva



# FRACCIONANDO LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL HUMANA

Memoria presentada por Francesc Peris-Bondia para optar al grado de doctor en  
Biodiversidad por la *Universitat de València*

Directores:

Dra. Amparo Latorre Castillo

Dr. Giuseppe D'Auria

Valencia 2012

Diseño de la cubierta: Montse Osuna Misser.

*“Esta tesis ha sido realizada en L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X. En su versión electrónica está dotada de enlaces que permiten navegar entre las varias secciones, figuras, bibliografía y otros elementos. También permite acceder directamente a páginas web así como a las versiones on-line de los artículos citados.”*

Doña Amparo Latorre Castillo, Doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática del Departamento de Genética de la *Universitat de València* y Don Giuseppe D'Auria, Doctor en Ciencias Ambientales e investigador del Sistema Nacional de Salud contratado “Miguel Servet” en el Centro Superior de Investigación en Salud Pública.

CERTIFICAN: Que Francesc Peris-Bondia, Licenciado en Ciencias Biológicas por la *Universitat de València*, ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título: “Fraccionando la microbiota gastrointestinal humana”, para optar al grado de doctor en Biodiversidad por la *Universitat de València*.

Y para que conste, en el cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado en Valencia, a 23 de Abril de 2012.

Fdo.: Amparo Latorre Castillo

Fdo.: Giuseppe D'Auria





# Agradecimientos

Quiero agradecer a mis directores su ayuda, sin ellos esta tesis no habría sido posible. A Amparo por su experiencia y consejos y a Giuseppe por su energía y dedicación, juntos hemos descubierto cómo funciona el citómetro. A Andrés por darme la oportunidad de entrar en este mundo. A toda la gente del CSISP, en concreto a Genómica y Salud, porque hacer que un laboratorio empiece a funcionar desde cero no es tarea sencilla. A Genética Evolutiva del Instituto Cavanilles porque se os echa de menos. A Ana y Maria Jesús del SCSIE, sin vosotras no habríamos separado nada. A los estudiantes que habéis colaborado con nosotros, por haberme enseñado a enseñar y tener que aprender para contestar vuestras dudas. Al CyberEsp, por financiar mi estancia en Leipzig, de la cual saqué un gran provecho. A Susann y a todo su grupo, por recibirme en su laboratorio, decirme las cosas como son y enseñarme citometría. A los compañeros del Master, con los que sufrí la novatada y también sufrirán el nuevo procedimiento de depósito. A los amigos que de verdad lo son. A Susi por la ingente cantidad de tupperes que me ha preparado. A Tula por la enorme compañía en la fase final. A mi familia, a mis padres, Francesc y Amparo, que me han apoyado en todo, a mi hermana Empar porque es una luchadora y una inspiración para mí, y a Montse por estar a mi lado y por su tremenda colaboración para que veáis este libro terminado. Y a todos los que no nombro pero os merecéis estar aquí, Gracias.

A mi tía, porque estaría muy orgullosa.



---

# *Abstract*

Human gut microbiota is one of the most diverse and complex microbial communities in nature. Next generation sequencing technologies allowed us to have a wide overview of intestinal microbiota diversity revealing a huge fraction of non-cultivable bacteria. In spite of the potential of modern high-throughput sequencing methods, metagenomics does not show the whole picture. Flow cytometry is a methodology which permits to describe and/or sort fractions of complex microbial communities basing on characters as DNA/RNA/protein contents as well as proper microbial taxonomy. Flow cytometry and cell sorting coupled with 16S rDNA sequencing can provide us a deeper level of knowledge about complex microbial communities as the ones inhabiting human gut.

The objectives of the Thesis are:

1. To characterize population structures of over represented and under represented bacteria in human gut microbiota using 16S rRNA fluorescent probes and flow cytometry to split the populations and 16S rDNA clone libraries to study its composition.
2. To study the variation of cellular components (DNA and RNA) along *Escherichia coli* growth curves using a single cell based approach.
3. To identify and characterize the active fraction of human gut microbiota.
4. To study the relationships of human gut microbiota with immunological system using flow cytometry to identify IgA-coated bacteria.

---

# Resumen

La microbiota gastrointestinal humana es una de las comunidades microbianas más diversa y compleja que se puede encontrar en la naturaleza. Las nuevas tecnologías de secuenciación permiten obtener una amplia visión de la diversidad microbiana, lo que ha revelado una gran cantidad de bacterias no cultivables. A pesar del potencial de estas tecnologías de alto rendimiento la metagenómica no muestra la imagen completa. La citometría de flujo es una metodología que permite describir y/o separar fracciones de comunidades microbianas basándose en características como el DNA, RNA o proteínas, así como de la misma taxonomía microbiana. La citometría de flujo y la separación de células junto con las secuenciación del gen 16S rDNA nos otorga una visión muy detallada de la compleja comunidad microbiana que habita el intestino humano.

Los objetivos de la Tesis son:

1. Caracterizar la estructura poblacional de las bacterias sobre- e infra-representadas en la microbiota intestinal humana, utilizando sondas fluorescentes contra el 16S rRNA, fraccionamiento por citometría de flujo y secuenciación de genotipas del 16S rDNA para estudiar su composición.
2. Estudiar la variación de componentes celulares (DNA y RNA) a lo largo de una curva de crecimiento de *Escherichia coli*, utilizando una aproximación basada en células individuales.
3. Identificar y caracterizar la fracción activa de la microbiota intestinal humana.
4. Estudiar la relación de la microbiota intestinal humana con el sistema inmune, utilizando citometría de flujo para identificar las bacterias marcadas con IgA.

---

# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	<b>IX</b>
<i>Abstract</i>	<b>XI</b>
<b>Resumen</b>	<b>XII</b>
<b>1. Introducción general</b>	<b>1</b>
1.1. La microbiota humana. . . . .	3
1.1.1. Nichos en el ecosistema humano. . . . .	7
1.1.2. Microbiota gastrointestinal. . . . .	19
1.2. Estudio de las poblaciones bacterianas. . . . .	36
1.2.1. Métodos clásicos de identificación y clasificación de microor- ganismos. . . . .	36
1.2.2. Técnicas moleculares. . . . .	38
1.3. Microbiología basada en células individuales: Citometría de flujo. . .	43
1.3.1. Principios generales de la citometría de flujo. . . . .	44
1.3.2. Uso general de la citometría. . . . .	51
<b>2. Objetivos</b>	<b>53</b>
<b>3. Material y Métodos</b>	<b>55</b>
3.1. Separación de la microbiota por filogrupos. . . . .	55
3.2. Ciclo Celular. . . . .	63
3.3. Microbiota intestinal activa. . . . .	68
3.4. Microbiota intestinal opsonizada con Inmunoglobulina A. . . . .	75

<b>4. Resultados y desarrollo argumental</b>	<b>79</b>
4.1. Separación de la microbiota por filogrupos. . . . .	79
4.1.1. Introducción. . . . .	79
4.1.2. Objetivos. . . . .	80
4.1.3. Resultados. . . . .	81
4.1.4. Discusión. . . . .	84
4.2. Ciclo celular. . . . .	86
4.2.1. Introducción. . . . .	86
4.2.2. Objetivos. . . . .	89
4.2.3. Resultados. . . . .	89
4.2.4. Discusión. . . . .	91
4.3. Microbiota intestinal activa. . . . .	95
4.3.1. Introducción. . . . .	95
4.3.2. Objetivos. . . . .	97
4.3.3. Resultados. . . . .	99
4.3.4. Discusión. . . . .	102
4.4. Microbiota intestinal opsonizada con Inmunoglobulina A. . . . .	108
4.4.1. Introducción. . . . .	108
4.4.2. Objetivos. . . . .	110
4.4.3. Resultados y Discusión. . . . .	110
<b>5. Conclusions</b>	<b>117</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>119</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>123</b>
<b>A. Short English version</b>	<b>157</b>
A.1. Splitting gut microbiota by phylogroup. . . . .	159
A.2. Cell cycle. . . . .	162
A.3. Active gut microbiota. . . . .	164
A.4. IgA-Opsonized gut microbiota. . . . .	167

---

<b>B. Protocolo detallado</b>	<b>171</b>
B.1. Preparación de células. . . . .	171
B.1.1. Recolección de muestras. . . . .	171
B.1.2. Obtención y limpieza de las células. . . . .	172
B.2. Separación por citometría de flujo. . . . .	173
B.2.1. Tinciones. . . . .	173
B.2.2. Fraccionamiento mediante citometría de flujo. . . . .	174
B.3. Extracción del DNA (Ausubel et al., 1992). . . . .	175
B.4. PCRs y purificación. . . . .	176
<b>C. Microbiota intestinal activa.</b>	<b>177</b>
<b>D. Microbiota intestinal opsonizada con IgA.</b>	<b>181</b>





---

# Capítulo 1

## Introducción general

Las bacterias y arqueas son organismos unicelulares que se agrupan convencionalmente como “procariotas” (sin núcleo), para diferenciarlos de los “eucariotas” (con núcleo). Su tamaño puede oscilar entre  $0,2\mu\text{m}$ , como algunas especies del género *Mycobacterium*, y  $5\mu\text{m}$ ; aunque existen excepciones como el enorme *Epulopiscium fishelsoni*, que puede llegar a alcanzar los  $700\mu\text{m}$ .

Poseen pared celular, compuesta principalmente por peptidoglicanos, tienen formas de esfera (coco), bastoncillo (bacilo) o hélice (espirilo) y generalmente se reproducen por bipartición.

Anton van Leeuwenhoek observó a los procariotas por primera vez en 1683. Desde entonces se han encontrado en un amplio rango de ambientes. Pueden ser aerobios o anaerobios y son capaces de vivir en ambientes tan diferentes como el fondo del mar (Zaballos et al., 2006), medios ácidos volcánicos (Wendt-Potthoff y Koschorreck, 2002), centrales nucleares (Rao, 2000) y habitaciones estériles de la NASA<sup>1</sup> (La Duc et al., 2007). Esto ha llevado a los científicos a plantearse la discutida hipótesis “*Everything is everywhere, but, the environment selects*” (Becking, 1934).

El número de procariotas en la tierra es de aproximadamente  $5 \cdot 10^{30}$  células, acumulando así la mitad del carbono de los seres vivos (Whitman et al., 1998).

El rango estimado de especies bacterianas va desde  $10^5$  a  $10^7$  (Finlay y Maberly, 1997; Oren, 2004).

Los procariotas son metabólicamente mucho más diversos que los eucariotas y

---

<sup>1</sup> *National Aeronautics and Space Administration.*

Tabla 1.1: Simbiosis entre animales y microorganismos (Dethlefsen et al., 2007).

Tipo de simbiosis	Sistema específico (Huésped/especies simbioses)	Afiliación filogenética del huésped	Tejido colonizado
Monoespecífico (1)*	<i>Euprymna scolopes</i> (Sepia hawaiana)/ <i>Vibrio fischeri</i> <i>Eisenia fetida</i> (Lombriz de tierra)/ <i>Acidovorax</i> spp. <i>Steinernema</i> spp./ <i>Xenorhabdus</i> spp. y <i>Heterorhabditis</i> spp./ <i>Photorhabdus</i> spp.	Cefalópodo, molusco Oligoqueto, anélido Nematodos entomopatógenicos	Órgano luminiscente Tejidos de excreción Región asociada a intestino
Consortios simples (2-25)*	<i>Hirudo medicinalis</i> (sanguijuela) <i>Lymantria dispar</i> (polilla) <i>Drosophila melanogaster</i> (mosca de la fruta) <i>Hydra oligactis</i> y <i>Hydra vulgaris</i>	Oligoqueto, anélido Insecto, artrópodo Insecto, artrópodo Hidrozoos, cnidario	Intestino Intestino larval Intestino Indeterminado
Consortios complejos (10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup> )*	<i>Mus musculus</i> (ratón) <i>Danio rerio</i> (pez cebra) <i>Microcerotermes</i> spp. y <i>Reticulitermes</i> spp. (termita)	Vertebrado, cordado Vertebrado, cordado Insecto, artrópodo	Intestino Intestino Intestino Grueso

\* Número de simbioses bacterianas

por lo tanto juegan un papel importante en el ciclo de los elementos como el del nitrógeno o el del carbono. Desde siglos, se emplean en la producción de alimentos y forman parte de muchos procesos industriales.

Los microorganismos pueden vivir en colonias compuestas por individuos de una sola especie o formando comunidades<sup>2</sup>. Entre las especies que forman una comunidad aparecen interacciones complejas. Éstas pueden ser de mutualismo, parasitismo o comensalismo según cómo afecta a cada uno de los componentes de la interacción. Estas interacciones provocan que la comunidad posea propiedades no explicables por la mera suma de las características de sus componentes.

Los microorganismos, o las comunidades formadas por éstos, pueden vivir libres en el ambiente o en simbiosis con animales o plantas. Pueden encontrarse algunos ejemplos en la Tabla 1.1. En la Figura 1.1 se puede observar la fluorescencia producida por una bacteria (*Vibrio fischeri*) que vive en simbiosis con la sepia hawaiana *Euprymna scolopes*.



Figura 1.1: *Euprymna scolopes*.  
<http://www.guardian.co.uk/>

<sup>2</sup> Una comunidad es el conjunto de especies que coexisten en el mismo espacio y tiempo.

## 1.1. La microbiota humana.

La microbiota humana es el conjunto de microorganismos que viven asociados al ser humano (Figura 1.2). Está formada principalmente por bacterias, aunque también pueden encontrarse eucariotas (Ghannoum et al., 2010), arqueas (Eckburg et al., 2003) y virus (Dinsdale et al., 2008). De hecho, eucariotas y arqueas, como componentes de la microbiota, pueden realizar funciones importantes relacionadas con la salud de los individuos. Así, por ejemplo, se ha demostrado en heces de individuos sanos que los hongos pueden alcanzar el millón de células por gramo de muestra, lo que representa el 0,00001 % del total (Musfeldt et al., 2008).

Por su parte, las arqueas metanógenas representan el 12 % de los anaerobios presentes en el colon distal, siendo la metanogénesis importante para prevenir la acumulación de ácidos y otros productos finales del metabolismo (Dridi et al., 2011).

Finalmente, la fracción viral, aunque menos estudiada, puede ser de utilidad para ayudar a regular la composición de la comunidad evitando la dominancia de una sola especie (Rodríguez-Valera et al., 2009).

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio, a diferentes niveles, de la fracción bacteriana de la microbiota gastrointestinal humana. Sin embargo en la introducción hemos revisado la información disponible sobre la microbiota humana en general, debido a que puede aportar información útil para comprender el funcionamiento de la microbiota gastrointestinal. De hecho, las divisiones entre nichos dentro de los humanos no son estancas y debe haber influencia entre las diferentes microbiotas, de manera que unas pueden determinar la composición de otras.

La microbiota humana, formada aproximadamente por 100 billones<sup>3</sup> de bacterias, supera en 10 veces el número de células de nuestro cuerpo (Savage, 1977). El conjunto de los genomas de la microbiota humana o microbioma, también sobrepasan con mucho al genoma humano. Su número de genes es un orden de magnitud supe-

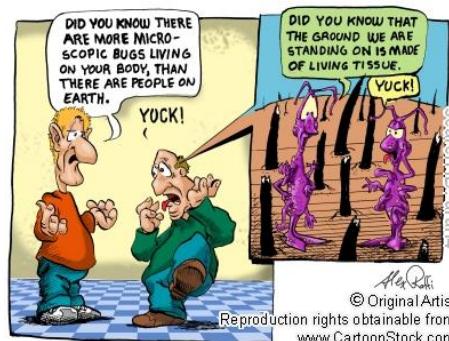


Figura 1.2: Más que humanos.

<sup>3</sup> Un billón =  $10^{12}$ .

rior. Nuestro genoma, en su última anotación, cuenta con unos 23.000 genes únicos<sup>4</sup> (Collins et al., 2004), mientras que el microbioma posee al menos varios cientos de miles (Yang et al., 2009).

Las informaciones codificadas en el microbioma humano permiten realizar una gran cantidad de funciones, muchas de ellas beneficiosas para el hospedador. Ya que el microbioma no está directamente relacionado con el genoma humano tiene más capacidades para adaptarse a las condiciones ambientales variando la composición de la comunidad o incluso adquiriendo nuevas funciones (genes) desde el exterior (Hehemann et al., 2010).

Esta “plasticidad” puede ser explotada manipulando la microbiota, mediante el uso de prebióticos<sup>5</sup> o probióticos<sup>6</sup>, con el objetivo de producir efectos beneficiosos para el organismo humano (Reid et al., 2011). Puede modificarse la composición de la microbiota para que ésta sea menos susceptible a la enfermedad, sea capaz de desplazar a los patógenos o evitar que sea colonizada por éstos.

La microbiota interviene en gran cantidad de procesos que afectan a la salud del hospedador. Por lo que conocer su funcionamiento puede ser de utilidad para paliar y/o evitar ciertas enfermedades. Es por ello que los esfuerzos hacia el estudio de la microbiota humana van en aumento (Prakash et al., 2011). Uno de los mayores beneficios que la microbiota aporta al hombre consiste en su participación activa en el desarrollo precoz de la respuesta inmunológica, como ha sido demostrado en modelos animales axénicos<sup>7</sup>. Estos animales presentan un pobre desarrollo de los diversos componentes de su sistema inmune (Cebra, 1999). Entre otras funciones la microbiota ayuda a evitar la colonización de la piel (Cogen y Nizet, 2008) o las mucosas (Stecher y Hardt, 2008) por bacterias que pueden ser patógenas. Para iniciar la infección una bacteria debe, en general, comenzar por colonizar los epitelios. Allí compite con los integrantes de la microbiota por factores tales como receptores celulares y nutrientes.

---

<sup>4</sup> En número no difiere mucho del genoma de *Caenorhabditis elegans* que cuenta con alrededor de 17.000 genes únicos (Wei et al., 2005).

<sup>5</sup> Los prebióticos son alimentos que poseen sustancias que estimulan el crecimiento de microorganismos beneficiosos en la microbiota intestinal humana.

<sup>6</sup> Los probióticos son alimentos que poseen microorganismos beneficiosos en la microbiota intestinal humana.

<sup>7</sup> Los animales axénicos son aquellos nacidos y criados en condiciones de esterilidad.

Los microorganismos han sido determinantes en la evolución del hombre (Fraune y Bosch, 2010) y son fundamentales para el desarrollo y mantenimiento de su salud. Ya en los años 70 Savage, con menos información y con técnicas mucho menos sofisticadas de las que disponemos en la actualidad, consideraba a los microorganismos como parte de nuestro cuerpo (Savage, 1977). Esta idea se ha retomado más recientemente definiendo al conjunto de nuestra microbiota más nuestras propias células como a un solo superorganismo (Sleator, 2010). La interacción entre microbiota y humano es muy estrecha. Mayoritariamente, la relación de cada microorganismo con el ser humano se puede considerar comensal<sup>8</sup> pero la microbiota en su conjunto aporta beneficios al hombre así como los recibe, resultando ser, pues, una relación mutualista (Bäckhed et al., 2005). De hecho, simplemente observando el número de sistemas funcionalmente inmaduros que tiene un animal axénico, nos podemos hacer una idea de la contribución de los microorganismos a la salud de su portador (Smith et al., 2007).

Para añadir más complejidad al estudio de la microbiota humana (Figura 1.3), se ha visto que su composición, en término de diversidad, es muy variable entre individuos, en cualquier región del cuerpo y relativamente estable dentro del individuo (Costello et al., 2009). Esta variabilidad en parte es debida a que constantemente estamos en contacto con infinidad de microorganismos presentes en el ambiente o en los alimentos que ingerimos. Por ello es conveniente diferenciar entre microbiota residente<sup>9</sup> y microbiota transitoria<sup>10</sup>. La microbiota residente es la característica de cada región del organismo y está constituida por microorganismos que siempre están presentes en ese sector. Por ejemplo: *Staphylococcus epidermidis* en la piel o *Escherichia coli* en el intestino. En cambio la microbiota transitoria es variable de un ser humano a otro y está compuesta por microorganismos que colonizan de forma intermitente un determinada región.

La microbiota humana difiere en cantidades y proporciones de microorganismos según la región del cuerpo, como se puede observar en la Figura 1.3. Antes de entrar a describir las características de la microbiota intestinal veremos un breve resumen

---

<sup>8</sup> En pocos casos se ha demostrado que una sola especie bacteriana actúa como mutualista (Bäckhed et al., 2005).

<sup>9</sup> La microbiota residente es la compuesta por las bacterias autóctonas.

<sup>10</sup> La microbiota transitoria es la compuesta por bacterias alóctonas.

de las microbiotas que habitan otras regiones del cuerpo humano.

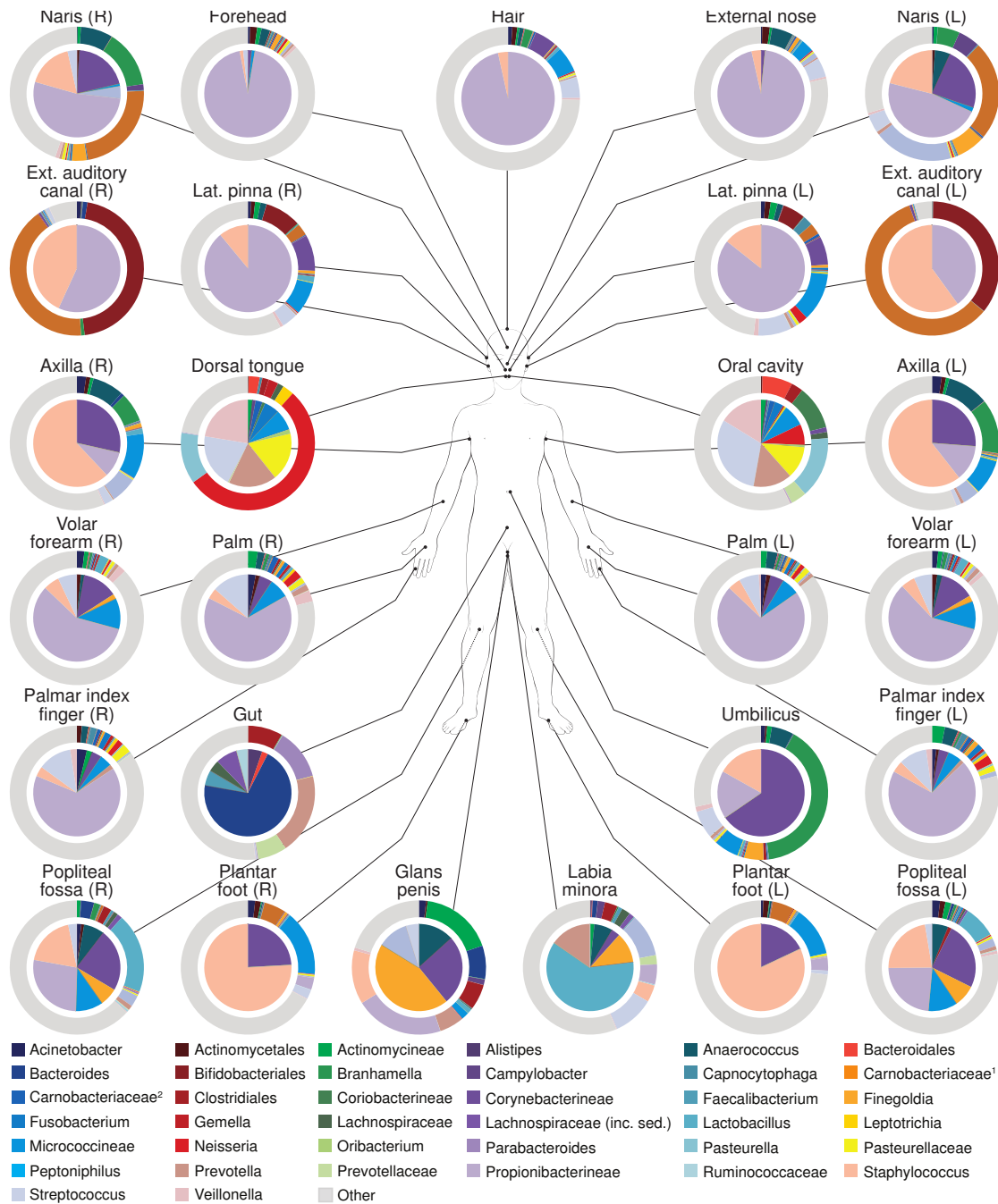


Figura 1.3: Distribución de la microbiota humana según distintas regiones del cuerpo (Costello et al., 2009).

### 1.1.1. Nichos en el ecosistema humano.

#### La piel.

La piel del ser humano es un extenso órgano cuya principal función es actuar como barrera física. Protege nuestro cuerpo del ataque de patógenos impidiendo la entrada de bacterias al cuerpo y dificultando el crecimiento de éstas sobre su superficie. A su vez, regula el intercambio de sustancias químicas con el exterior, interviene en la regulación térmica y actúa como filtro de los rayos ultravioleta.

El estrato córneo de la piel es rígido, seco, posee lisozima, defensinas y un pH de 5 (Harder et al., 1997). En este órgano la temperatura es algo inferior a 37°C y por lo tanto no es óptima para el crecimiento de la mayoría de los patógenos humanos. Además, el recambio de las células epiteliales muertas elimina las bacterias adheridas (Chiller et al., 2001).

A pesar de todas estas dificultades la piel es colonizada por diversos microorganismos de forma rápida después del nacimiento. En condiciones normales alberga una población bacteriana de  $10^{12}$  células repartidas en cientos de especies (Nelson, 2011).

La composición de la microbiota de la piel, tanto en sus aspectos cualitativos como cuantitativos, está influida por factores tales como el clima, las condiciones de higiene, la edad del hospedador, el sexo, etc. Además, la abundancia de pliegues, invaginaciones y características físico-químicas, determinan la existencia de una multitud de nichos especializados (Chiller et al., 2001). Como se puede observar en la Figura 1.4, además de las diferencias entre nichos, en la piel predominan las bacterias gram positivas como *Staphylococcus* y *Propionibacterium spp.* (Grice y Segre, 2011).

La microbiota basal se compone en general de miembros del *phylum* Actinobacteria como, por ejemplo *Corynebacterium sp.* y *Propionibacterium sp.* o del *phylum* Firmicutes como *Staphylococcus epidermidis* o *Streptococcus sp.* o Proteobacterias como *Acinetobacter sp.* (Gao et al., 2007). La microbiota transitoria está formada por *S. aureus* y menor cantidad de bacilos gram negativos (enterobacterias o especies del género *Acinetobacter*) en regiones como axilas, ingles y perineo.

Muchas infecciones como foliculitis o forunculosis tienen origen a nivel de folículos pilosos o glándulas. Además la microbiota cutánea puede ser responsable de infecciones cuando la piel presenta soluciones de continuidad. En cualquier caso la mayoría

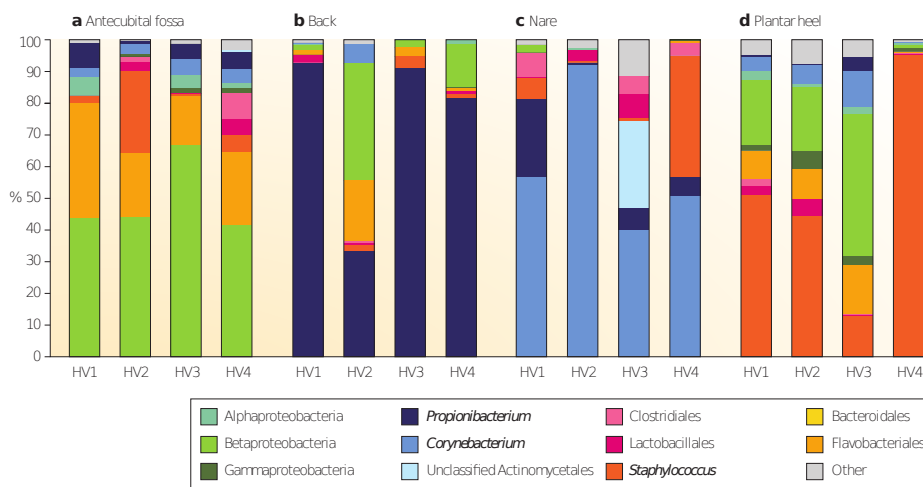


Figura 1.4: Variación interpersonal del microbioma de la piel. La distribución microbiana de 4 sitios de 4 voluntarios sanos (HV1, HV2, HV3 y HV4) ha sido obtenida de la fosa cubital (interior del codo; parte a); la espalda (parte b); las narinas (parte c); y la planta del pie (parte d). La variación de la microbiota de la piel es más dependiente de sitio que de individuo. Las barras representan la abundancia relativa de los taxones, determinado mediante secuenciación del 16S rDNA (Grice y Segre, 2011).

de los microorganismos de la microbiota de la piel no son perjudiciales, e incluso pueden ser beneficiosos, ocupando nichos y compitiendo con los patógenos y educando a nuestro sistema inmune.

Como ocurre en el intestino, las complejas relaciones de los microorganismos con el huésped o con otros microorganismos pueden determinar que algunas bacterias, que en ocasiones son causantes de enfermedades, acaben protegiendo al hospedador de la invasión de patógenos (Cogen y Nizet, 2008). Un ejemplo es el caso de *Staphylococcus epidermidis* que actúa impidiendo la colonización de *Staphylococcus aureus* (Lina et al., 2003), pero también parece estar involucrado en infecciones asociadas con el uso de catéteres intravenosos (O'Grady et al., 2002).

Otro ejemplo de protección mediado por la microbiota de la piel está representado por la Actinobacteria *Propionibacterium acnes*, un bacilo gram positivo anaerobio, que se encuentra colonizando glándulas sebáceas. Esta bacteria posee lipasas que degradan los lípidos secretados por esas glándulas. Los metabolitos resultantes son principalmente ácidos grasos insaturados que tienen actividad antimicrobiana pro-



porcionando así un mecanismo de defensa (Cogen y Nizet, 2008).

### La conjuntiva.

La conjuntiva es una membrana mucosa y transparente que cubre el ojo. Las glándulas lagrimales mantienen la conjuntiva húmeda, mientras que el parpadeo intermitente la lubrica y la limpia de materiales extraños (Armstrong, 2000). Las lágrimas contienen defensinas, inmunoglobulinas A y G secretoras (IgA y IgG), moléculas del complemento, lactoferrina, lisozima,  $\beta$ -lisinas, etc., que atacan o disminuyen la adherencia de bacterias evitando así la colonización de la superficie del ojo (Haynes et al., 1999; Seal et al., 1986).

Una bacteria que típicamente coloniza la mucosa es el *Staphylococcus* Coagulasa-Negativo (“*coagulase-negative staphylococci*” o CNS) (McCulley y Shine, 2003). Pero, al igual que ocurre en otros ecosistemas, con las nuevas tecnologías de secuenciación masiva se están descubriendo muchos más. Por ejemplo, en un artículo reciente de Dong et al. (2011) donde se explora la diversidad de esta microbiota mediante secuenciación del gen ribosomal 16S, encontraron que, en cada individuo estudiado, aparecían unos 200 filotipos diferentes. Éstos pertenecían a 59 géneros distribuidos entre 5 *phyla* y un 31 % de las secuencias eran de bacterias desconocidas. Doce de estos géneros aparecían en todos los individuos estudiados: *Pseudomonas*\*, *Propionibacterium*\*, *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*\*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Staphylococcus*\*, *Aquabacterium*, *Sphingomonas*, *Streptococcus*\*, *Streptophyta* y *Methylobacterium*<sup>11</sup>.

Algunos patógenos como por ejemplo *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis*, son capaces de infectar la conjuntiva, usando mecanismos específicos para ello. Los recién nacidos son particularmente propensos a la infección por bacterias habiendo estado en estricto contacto con la microbiota vaginal de la madre. En la queratoconjuntivitis seca, o síndrome del ojo seco, se detecta más cantidad de bacterias que en individuos sanos (Graham et al., 2007).

Mediante secuenciación también se han detectado en individuos sanos bacterias como *Rhodococcus erythropolis*, *Klebsiella* sp. y *Erwinia* sp. típicamente asociadas

---

<sup>11</sup> \* Géneros que aparecen también en otros estudios (Fernández-Rubio et al., 2010; Graham et al., 2007).

a enfermedades como endoftalmitis y queratitis (Graham et al., 2007). Esto indica que la sola presencia de estas bacterias no desencadena la enfermedad cuyo origen podría encontrarse en una disbiosis.

### La leche materna.

La leche materna es la primera fuente de alimentación de los recién nacidos antes de que sean capaces de comer y digerir otros alimentos y aporta beneficios a la salud, como una reducción del riesgo de contraer infecciones y protección frente a la diarrea o enfermedades respiratorias. Se ha visto, por ejemplo, que niños alimentados con leche materna tienen un menor riesgo de padecer obesidad o del síndrome de muerte súbita del lactante; incluso se asocia a un aumento en la inteligencia (Anderson et al., 1999), aunque hay trabajos posteriores que lo han desmentido (Der et al., 2006).

En los últimos años se está confirmando la hipótesis de que este fluido no es estéril como se creía (Martín et al., 2007) sino que más bien se encuentra poblado por bacterias que pueden llegar al intestino del recién nacido (Gueimonde et al., 2007).

Entre los géneros más representados se encuentran *Streptococcus* y *Staphylococcus*, también se han detectado *Serratia* y *Propionibacterium*, y comunes aunque en menor proporción, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Collado et al., 2009; Martín et al., 2007).

En el trabajo de Hunt et al. (2011), donde se analizaron mediante metagenómica 16 individuos, se observó que 9 OTUs<sup>12</sup> que representaban el 50 % de la microbiota de la leche materna estaban presentes en todas las muestras (Tabla 1.2). El origen de esta microbiota es desconocido, pero una de las posibles fuentes de colonización es el reflujo de la boca del bebé a la glándula mamaria de la madre (Ramsay et al., 2004). Aunque también la de la piel podría ser el origen de ésta. El estudio de Pérez et al. (2007) sugiere que incluso parte de la microbiota podría tener origen en el intestino de la madre. Esta microbiota viajaría a través de la sangre transportada por células mononucleares del sistema inmune. En la página 23 se habla con mayor detalle del origen de la microbiota intestinal.

Los esfuerzos para entender el porqué de los beneficios de la leche materna se ha

---

<sup>12</sup> *Operative Taxonomic Units.*

Tabla 1.2: Géneros asignados a los 9 OTUs identificados en todas las muestras (n=47) y su abundancia relativa (%) (Hunt et al., 2011).

Género	Abundancia relativa (%)
<i>Staphylococcus</i>	15,8
<i>Streptococcus</i>	8,2
<i>Serratia</i>	7,6
<i>Pseudomonas</i>	4,5
<i>Corynebacterium</i>	3,8
<i>Ralstonia</i>	3,7
<i>Propionibacterium</i>	3,6
<i>Sphingomonas</i>	2,4
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	1,9
Suma de los OTUs del “core”	51,5

dirigido históricamente a sus nutrientes, como ácidos grasos, vitaminas y minerales. Trabajos recientes han evidenciado que las comunidades bacterianas pueden ser el origen de los beneficios<sup>13</sup> de este alimento contribuyendo, entre otros, al mantenimiento de la salud de la glándula mamaria y a la del bebé. Se ha lanzado la hipótesis, que en los recién nacidos, las bacterias aportadas por la leche materna pueden afectar a la colonización bacteriana del intestino contribuyendo a la futura estructura de la microbiota.

### El Tracto Respiratorio.

El tracto respiratorio es el aparato encargado del intercambio de gases con el ambiente. Pasivamente, mediante difusión, enriquece la sangre en oxígeno y elimina el dióxido de carbono al exterior.

El aparato respiratorio está dividido en dos sectores anatómicos: alto y bajo. En el sujeto sano solamente el árbol respiratorio alto (fosas nasales y faringe) presenta microorganismos, mientras que los senos nasales, el oído medio, la tráquea, los bronquios pulmonares y la pleura son estériles (Flanagan et al., 2007). A nivel de las fosas nasales la estructura anatómica tortuosa hace que la corriente de aire sea

<sup>13</sup> A corto y largo plazo.

turbulenta. Al chocar contra las mucosas el aire se calienta y las partículas grandes son retenidas por el *mucus* y los pelos de las narinas. En sectores más distantes, las bacterias que ingresan por esta vía entran en contacto con el sistema inmune (Diamond et al., 2000).

El sistema mucociliar, la capa de *mucus* y los reflejos como la tos, el estornudo o la broncoconstricción son otros mecanismos de defensa importantes que actúan eliminando físicamente bacterias y partículas enviándolas otra vez hacia el exterior o desviándolas al sistema digestivo para que sean digeridas (Chaudhuri et al., 2005). El sistema inmune también interviene en la protección de las infecciones bacterianas. De hecho, la mucosa del epitelio respiratorio es rica en IgA, mientras que a nivel pulmonar los macrófagos alveolares se encargan de la protección fagocitando bacterias y otras partículas (Gerritsen, 2000).

En las fosas nasales se encuentran bacterias de tipo cutáneo: *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium sp.* y *Corynebacterium sp.* (Grice y Segre, 2011). A nivel de la faringe la flora está compuesta principalmente por especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Neisseria* (Cazzolla et al., 2006).

Varios estudios han demostrado que en condiciones normales no existen bacterias más allá de la glotis (Cabello et al., 1997). En el caso de infecciones pulmonares la microbiota orofaríngea puede verse implicada (Flanagan et al., 2007). En general, eso ocurre en pacientes que tienen alterados sus reflejos defensivos. Por ejemplo, el tabaquismo puede disminuir la capacidad de los macrófagos alveolares para fagocitar microorganismos que, junto con la depresión de la función ciliar, puede manifestarse en una bajada en la resistencia neta a la infección (Harris et al., 1970).

La colonización temprana por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis* aumenta las posibilidades de adquirir sibilancias<sup>14</sup> o incluso asma durante la infancia (Bisgaard et al., 2007). Como se puede ver en la Figura 1.5 de Wu y Chu (2009) hay más factores que juegan un papel importante en la inducción y mantenimiento del asma. Es destacable que ciertos tipos de microorganismos pueden aumentar los síntomas y otros pueden ser beneficiosos.

---

<sup>14</sup> Las sibilancias corresponden a un sonido silbante y chillón durante la respiración que ocurre cuando el aire fluye a través de las vías respiratorias estrechas (Szefer, 2010).

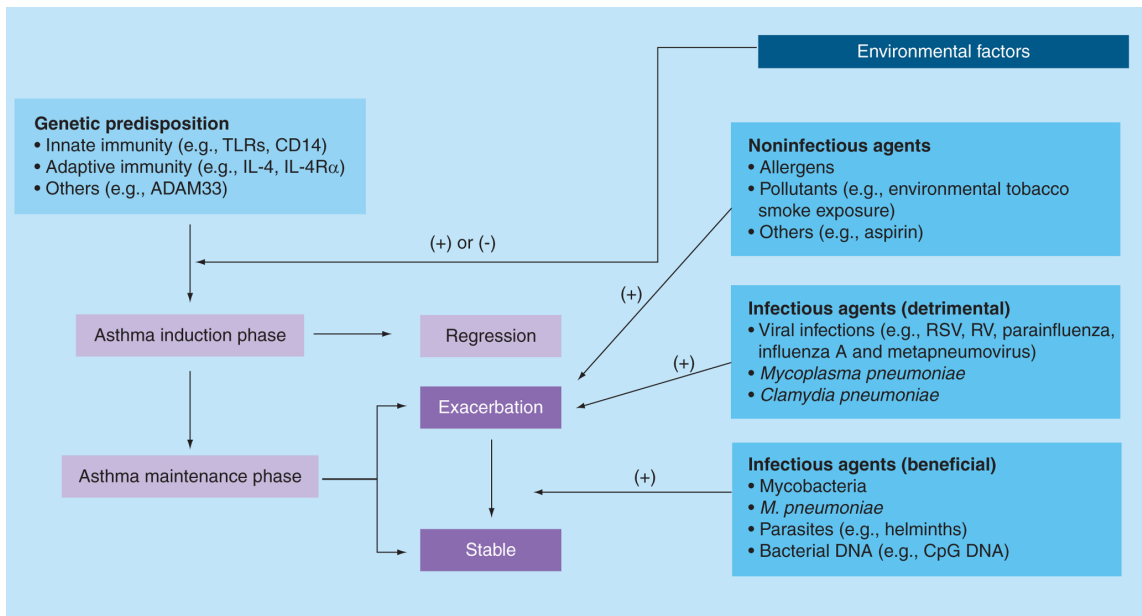


Figura 1.5: Interacciones de factores genéticos y ambientales que juegan un papel importante en la inducción y mantenimiento del asma. *ADAM33*: *A disintegrin and metalloprotease 33*; *CpG DNA*: *Cytosine-phosphate-guanosine DNA*; *IL-4R $\alpha$* : *IL 4 receptor- $\alpha$* ; *RSV*: *Respiratory syncytial virus*; *RV*: *Rhinovirus*; *TLR*: *Toll-like receptor* (Adaptado de Wu y Chu (2009)).

## La vagina.

La vagina es un canal muscular elástico que va desde el *cervix* hasta la vulva. Forma parte de los genitales femeninos y proporciona el canal del parto natural. La microbiota normal vaginal fue una de las primeras en ser reconocida en 1892 por Döderlein (Kulp y Rettger, 1924), ginecólogo de Leipzig (Alemania), quien describió el patrón normal que se observa en la mujer adulta.

En la niñez predominan microorganismos de origen cutáneo y perineal como *S. epidermidis* y *Propionibacterium spp.* y pueden aislarse levaduras, enterobacterias y algunos bacilos gram negativos anaerobios aunque en escaso número (Hill et al., 1995).

En la mujer adulta predominan distintas especies de *Lactobacillus*, aunque nunca se encuentra una población clonal sino más bien una mezcla de cepas y especies. En bajo número se pueden encontrar otras bacterias de los géneros *Corynebacterium*, *Pseudomonas* o *Anaerococcus* (Hyman et al., 2005). Si bien ésta es la distribución “clásica”, en estudios con mayor número de muestras se ha comprobado que la micro-

biota del 30 % de las mujeres sanas puede ser dominada por especies de *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Pseudomonas* o *Streptococcus* (Kim et al., 2009).

La composición de la microbiota depende del contenido de estrógenos (Wertz et al., 2008). Es por ello que el ciclo menstrual afecta a la microbiota vaginal (Figura 1.6).

El estímulo hormonal determina la proliferación de las células epiteliales que aumentan su contenido de glucógeno. Éste es utilizado por *Lactobacillus spp.*, siendo el ácido láctico el producto final del metabolismo que ocasiona un descenso importante del pH. La acidez resultante inhibe el crecimiento de muchas bacterias (Boskey, 2001). Algunas cepas de *Lactobacillus spp.* producen peróxido de hidrógeno que ayuda a eliminar patógenos asociados a vaginosis bacteriana, entéricos y uropatogénicos (Atassi y Servin, 2010). Otros mecanismos de defensa son la coagregación y las señales entre bacterias (Reid et al., 2009).

Durante la gestación, a medida que el embarazo progresa, aumenta la densidad de *Lactobacillus* y disminuyen los bacilos gram negativos anaerobios y facultativos, el resultado es un mecanismo que reduce el riesgo de bacteremia grave durante el parto y el postparto. También puede aumentar la cantidad de levaduras que, eventualmente, pueden ser problemáticas (Hernández-Rodríguez et al., 2011). La presencia de *Streptococcus agalactiae* que puede encontrarse en mujeres sanas implica un riesgo para el recién nacido (Apgar et al., 2005).

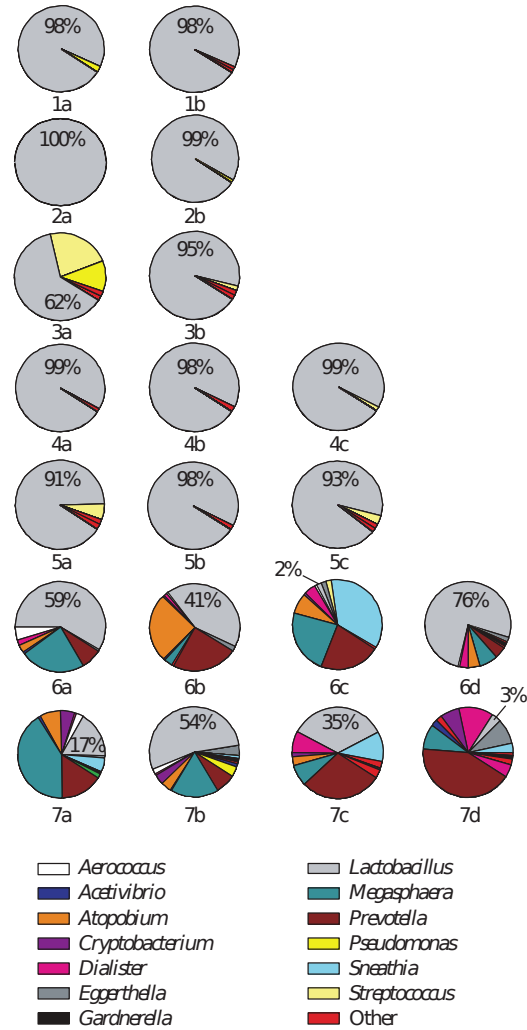


Figura 1.6: Representación de la estructura de la microbiota vaginal de diferentes mujeres (filas) en diferentes fases del ciclo menstrual (columnas) determinado por genotecas de 16S rRNA (Wertz et al., 2008).

En la mujer postmenopáusica, al cesar el estímulo hormonal, la microbiota retorna al patrón de la infancia (Hillier y Lau, 1997).

Como hemos visto una de las funciones más importante de la microbiota vaginal es proteger frente a infecciones vaginales, especialmente durante el embarazo. Además, como se explica en la página 23, esta microbiota afecta a la composición final de la microbiota intestinal del bebé.

### **El aparato urinario.**

El aparato urinario es el encargado de excretar el nitrógeno mediante la producción de urea. Salvo la uretra anterior, éste o bien es estéril o la cantidad de microorganismos presentes es muy baja (Dong et al., 2011). El flujo de la orina contribuye a mantener la vía urinaria libre de bacterias, debido al arrastre, al pH ácido y a su elevada osmolaridad (Chambers y Kunin, 1985). El sector anterior de la uretra se coloniza con bacterias que provienen de la piel, el colon, la vagina y/o el surco coronal del pene (Nelson et al., 2010). Esas bacterias son eliminadas al comenzar la micción. Existe una mayor incidencia de infección urinaria en la mujer debido a la menor longitud de la uretra así como a la proximidad del ano (Krieger, 2002).

Las bacterias más comunes en hombres sanos son *Lactobacillus iners*, *Corynebacterium sp.* y *Streptococcus anginosus* (Nelson et al., 2010). La variabilidad interindividuo se puede observar en la Figura 1.7.

Las infecciones del aparato urinario están causadas en general por bacterias que colonizan primero las zonas más exteriores y que por vía ascendente llegan a la vejiga o hasta el riñón. Las causas que favorecen estas infecciones, son todas las que conllevan alteraciones de los mecanismos de defensa: obstrucción a la circulación de la orina (cálculos, hipertrofia prostática), malformaciones de la vía excretora, sondas vesicales, etc (Krieger, 2002).

En mujeres los *Lactobacillus* evitan la entrada a la vejiga de patógenos (Boskey, 2001). Incluso se han suministrado como probióticos la cepa GR-1 de *Lactobacillus rhamnosus* y las B-54 y RC-14 de la especie *Lactobacillus reuteri* (Reid y Bruce, 2006). Algunos de los mecanismos de acción de estos microorganismos son: producción de bacteriocinas, regulación de la respuesta inflamatoria mediante IL-10, aumento de la respuesta inmunitaria del huésped, estimulación de la producción de

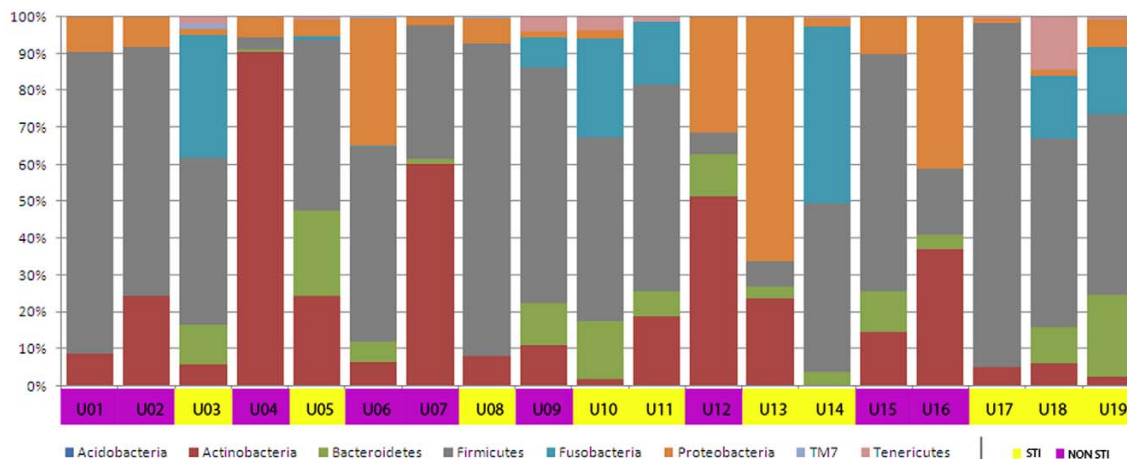


Figura 1.7: Variabilidad de clones del 16S rRNA de orina de diferentes voluntarios. 4.386 secuencias clasificadas a nivel de *phyla* usando el RDP Classifier al 90% de confianza. Los sujetos están indicados bajo las barras en el eje X y los porcentajes de clones que corresponden a cada *phyla* está indicada en el eje Y. La condición de STI de los sujetos está indicada bajo el eje X (Nelson et al., 2010).

mucina, inhibición de la expresión de factores de virulencia de *Staphylococcus* o disminución de la adherencia de *Escherichia coli* mediante surfactantes (Reid y Bruce, 2006).

Las personas afectadas por enfermedades de transmisión sexual tienen la microbiota de la orina alterada y es similar a la microbiota vaginal de mujeres que sufren vaginosis bacteriana<sup>15</sup> (Nelson et al., 2010).

## La boca.

La boca o cavidad oral es el inicio del canal alimentario. Es donde se realiza el primer procesamiento del alimento.

Existen diversos nichos dentro de la cavidad oral como por ejemplo los dientes, la lengua, la mucosa yugal o el surco periodontal. La microbiota de cada uno de estos nichos es ligeramente diferente.

<sup>15</sup> Esta microbiota está dominada por bacterias anaeróbicas como *Sneathia*, *Gemella*, *Aerococcus*, *Anaerococcus*, *Prevotella* y *Veillonella*.



La diversidad de la microbiota oral es grande; en ella se pueden encontrar cientos de especies (Tabla 1.3) entre los que predominan *Streptococcus*  $\alpha$  hemolíticos. *S. mutans* y *S. sanguis* se hallan a nivel de la

placa dentaria, *S. mitis* se adhiere tanto a los dientes como a las mucosas y *S. salivarius* predomina en la mucosa lingual. Entre las bacterias anaerobias gram positivas pueden hallarse especies del género *Actinomyces* en la placa dental, y en menor cantidad algunas especies de *Lactobacillus*. La mayoría de los gram negativos son anaerobios como *Bacteroides melaninogenicus* y especies del género *Fusobacterium*. También pueden encontrarse espiroquetas del género *Treponema*. Los cocos gram positivos anaerobios pertenecen a los géneros *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus*, entre otros. Pueden, además, aislarse especies del género *Mycoplasma* y levaduras del género *Candida*.

Los dientes presentan superficies de adherencia que no se renuevan de forma periódica, como lo hacen los epitelios. Esto provoca que la colonización pueda ser más estable. Las bacterias se adhieren a la superficie dental mediante un biofilm compuesto por diferentes polímeros (dextranos y levanos) de origen bacteriano. La formación de biofilms, sobretodo en el diente, es esencial para colonizar la boca. Es por ello que bacterias como *Fusobacterium nucleatum* juegan un papel importante en esta comunidad, ya que posee en la membrana adhesinas que le permiten unirse a otras bacterias, al tejido del huésped o incluso a IgA (Edwards et al., 2007). Los *Streptococci*, que como hemos visto son muy abundantes en la boca, también poseen un número muy elevado de mecanismos de adhesión (Nobbs et al., 2009).

La microbiota de la cavidad oral está involucrada en la patogenia de enfermedades como la caries y periodontitis (Avila et al., 2009).

En el desarrollo de la caries dental intervienen factores como el pH ácido resultante de la descomposición de hidratos de carbono de la dieta (Marsh, 2006) y las bacterias (Marsh, 2010). En el estudio de Belda-Ferre y colaboradores, basado en metagenómica, se demuestra que la composición de la microbiota oral está relacionada

Tabla 1.3: Géneros cultivables más abundantes de la microbiota oral (Avila et al., 2009).

<i>Streptococcus</i>	<i>Treponema</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Veillonella</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Eikenella</i>
<i>Fusobacterium</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Leptotrichia</i>
<i>Porphyromonas</i>	<i>Eubacteria</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Prevotella</i>	<i>Lactobacterium</i>	<i>Propionibacterium</i>

con la susceptibilidad a sufrir caries (Belda-Ferre et al., 2011) (Figura 1.8).

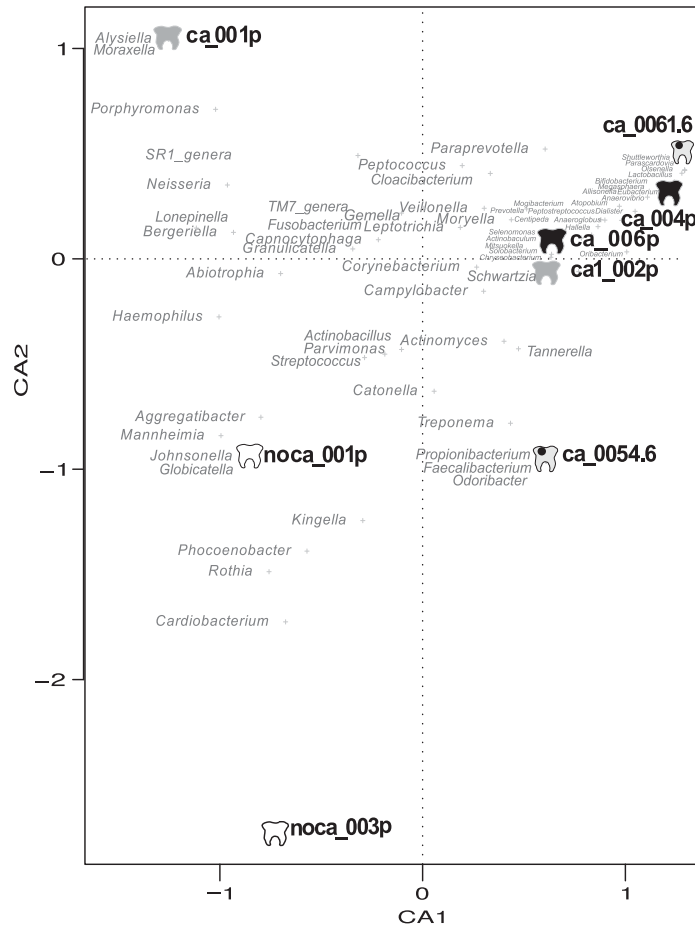


Figura 1.8: Análisis de correspondencia de la diversidad bacteriana en muestras orales basadas en lecturas de 16S rRNA extraídas de metagenomas.

La periodontitis resulta de la agresión de la microbiota normal a los tejidos de sostén del diente. Puede ocasionarse por un aumento en la complejidad y volumen de los biofilms localizados en la encía. La microbiota de la boca también causa procesos como abscesos periodontales y de cuello, entre otras enfermedades (Avila et al., 2009).

También puede jugar un papel importante en la carcinogénesis de la boca a través de los *Streptococci*. Estas bacterias producen peróxido de hidrógeno, el cual es cancerígeno. Las glándulas salivares secretan una peroxidasa que lo elimina, pero esta enzima es inhibida por el humo del tabaco (Rudney et al., 2010).

### 1.1.2. Microbiota gastrointestinal.

El sistema digestivo desempeña un papel esencial en la provisión de nutrientes mediante la digestión y absorción de alimentos, a la vez que elimina los productos tóxicos de la digestión y los materiales no digeribles. Estructuralmente es un tubo cuya luz es topológicamente externa al cuerpo. Posee esfínteres y otros dispositivos que controlan el tránsito en su interior. El alimento ingerido es sometido a distintos tratamientos mecánicos, químicos y bacterianos. Los nutrientes son absorbidos, pasando al sistema circulatorio. El material no digerido y no absorbido se almacena brevemente hasta que, junto con restos bacterianos, es expulsado en la defecación en forma de heces.

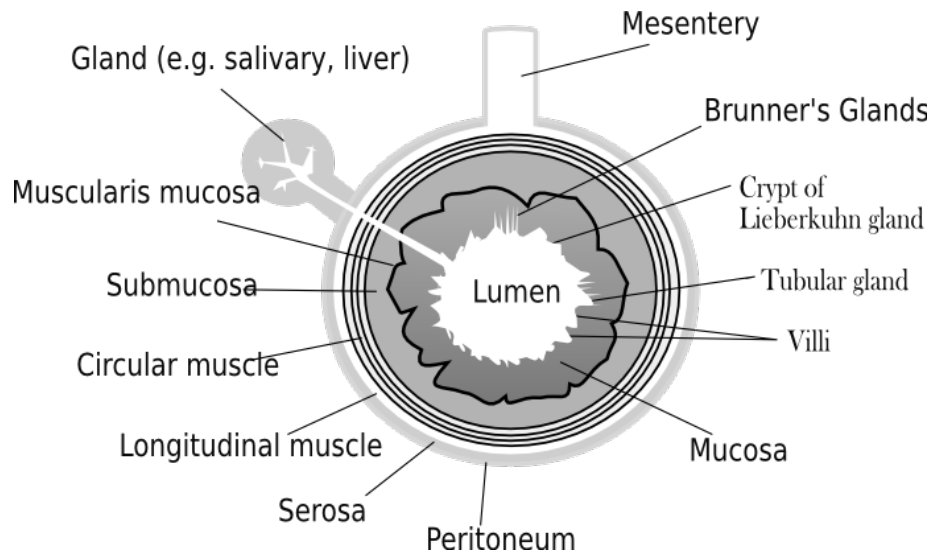


Figura 1.9: Corte transversal del tubo digestivo. En él se representan estructuras de diferentes regiones a lo largo de todo el tubo ([Wikipedia](#)).

A nivel transversal (Figura 1.9) hay distintos hábitats microbianos. Las bacterias pueden cubrir áreas del epitelio, habitar las criptas de Lieberkuhn<sup>16</sup> u otros nichos asociados a los tejidos y mucosas, o bien, pueden encontrarse en el *lumen* de forma libre o asociadas a partículas (Van Wey et al., 2011).

El *lumen* puede ser colonizado pero solo en áreas con relativa estabilidad como el *rumen cecum* o intestino grueso, donde el flujo no excede las tasas de duplicación de

<sup>16</sup> Glándulas que se encuentran en el epitelio que recubre el intestino delgado y el colon. Secretan varias enzimas, como por ejemplo sacarasa, maltasa y enteropeptidasas.

los niveles de población microbianos. Los epitelios son colonizados por una microbiota específica. Las criptas de la mucosa también pueden tener diferente microbiota. Cada uno de estos hábitats proporciona a sus colonizadores microbianos nichos diferentes.

Sin embargo, es a nivel longitudinal (Figura 1.10) donde se encuentran las mayores diferencias.

Veamos primero un breve resumen de la función y estructura de cada región del sistema gastrointestinal.

### El aparato digestivo.

El tracto gastrointestinal humano está compuesto por estómago e intestino, aunque a veces su definición incluye las estructuras desde la boca<sup>17</sup> al ano. El aparato digestivo abarca también otros órganos accesorios<sup>18</sup> a la digestión. En un humano adulto el tracto gastrointestinal tiene una longitud de 5 metros, o hasta 9 metros sin el efecto del tono muscular, y se divide en tracto gastrointestinal superior e inferior<sup>19</sup>.

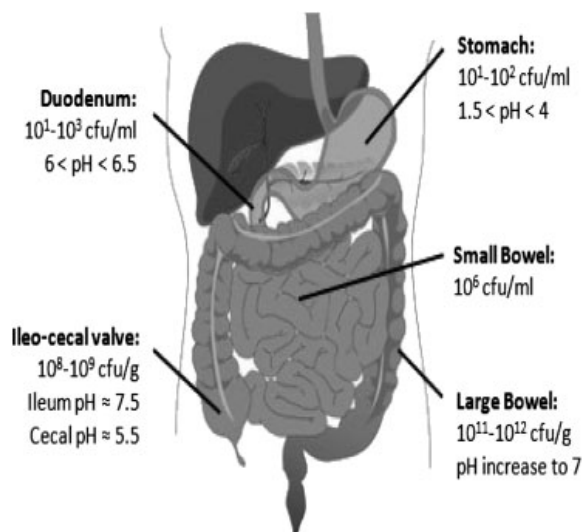


Figura 1.10: Cantidades de bacterias en el tracto gastrointestinal, incluyendo el estómago, el duodeno y el intestino delgado (unidades formadoras de colonia por mL del contenido del *lumen*) y en la válvula ileocecal y en el intestino grueso (Unidades formadoras de colonia por g del contenido del *lumen* (Van Wey et al., 2011)).

- El esófago conduce el alimento desde la boca hasta el estómago. El bolo<sup>20</sup> es conducido mediante movimientos peristálticos hasta el estómago.

<sup>17</sup> La boca, por la cantidad y distribución de microorganismos y sus características peculiares, se ha tratado separadamente en la página 16.

<sup>18</sup> Páncreas y vesícula biliar.

<sup>19</sup> El tracto gastrointestinal se puede dividir también en intestino anterior, intestino medio y intestino terminal, reflejando el origen embriológico de cada segmento.

<sup>20</sup> El bolo es el alimento masticado y mezclado con saliva.

- El estómago sirve como lugar de almacenamiento y es donde empieza la digestión. En él se secreta pepsinógeno<sup>21</sup> y ácido clorhídrico. Las contracciones de las paredes estomacales ayudan a la mezcla mecánica del alimento.
- En el intestino delgado es donde continúa la digestión. Se divide en tres partes:
  - Duodeno - Los jugos pancreáticos del páncreas y la bilis de las glándulas biliares se mezclan. Las enzimas digestivas rompen las proteínas y la bilis emulsiona las grasas en micelas. El duodeno contiene las glándulas de Brunner que producen bicarbonato y junto con el jugo pancreático se neutraliza el ácido clorhídrico del estómago.
  - Yeyuno - Es la sección media del intestino, conecta el duodeno al íleon. Contiene *plicae* circulares y *villi* para incrementar la superficie.
  - Íleon - Posee *villi*, donde todas las moléculas solubles son absorbidas pasando a la sangre (*capillaries* y *lacteals*).
- El intestino grueso tiene tres partes:
  - Ciego - Es la primera porción del intestino grueso. Reduce el flujo del contenido intestinal hacia el colon ascendente. Posee el apéndice vermiforme<sup>22</sup>.
  - Colon - La principal función del colon es absorber agua. Una de las principales funciones de la microbiota en esta región es la de producir vitaminas como la K o la biotina.
  - Recto - Las sustancias no digeridas y las bacterias que se han desarrollado se acumulan para formar las heces. A continuación son expulsadas a través del ano en la defecación.

**El estómago.** En condiciones normales y sin alimentos, el pH gástrico es ácido, alrededor de 4,5; disminuye hasta 1 justo antes de ingerir alimentos y rápidamente se tampona aproximándose a la normalidad. La densidad de bacterias es relativamente baja y con los métodos tradicionales de cultivo se detectan microorganismos típicos

---

<sup>21</sup> Que se transformará en pepsina y digerirá las proteínas.

<sup>22</sup> El apéndice es un cilindro sin salida conectado al ciego sin función conocida.

de la microbiota orofaríngea que han sido ingeridos como *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos, *Lactobacillus* sp., cocos anaerobios, *Candida* sp. y otras bacterias capaces de resistir el medio ácido. Con nuevos métodos independientes de cultivo, se ha detectado DNA de *Helicobacter pylori* y otras especies de este mismo género que se creen adaptadas a vivir en este ambiente. En humanos “sanos” se han encontrado hasta 128 filotipos diferentes, mientras que en individuos con infección aguda por *Helicobacter pylori* esta bacteria domina la comunidad estomacal llegando a ser un 70 % de la microbiota total (Bik et al., 2006).

**El intestino delgado.** La adaptación más notable del intestino es la amplificación de su superficie mediante pliegues. Pasa de una superficie cilíndrica bruta de 0,4m<sup>2</sup> a unos 300m<sup>2</sup> aumentando considerablemente la tasa de absorción. A pesar de toda esta superficie, el duodeno mantiene un pH bajo que, junto con la peristalsis, mantienen un reducido número de bacterias (Macfarlane y Dillon, 2007). También la bilis tiene propiedades antimicrobianas inhibiendo el crecimiento de muchos grupos bacterianos. Proteínas como la lisozima y las inmunoglobulinas (IgA secretoria), también contribuyen a controlar el número de microorganismos. La concentración bacteriana aumenta gradualmente hacia el íleon. En sectores distales del intestino delgado la composición de la microbiota se asemeja a la del colon. A nivel del íleon terminal se alcanzan concentraciones de 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> bacterias por mL de contenido intestinal, con predominio de los anaerobios.

**El intestino grueso.** Sirve para almacenar los restos del alimento digerido, absorber los iones inorgánicos y el agua. Es el lugar donde actúan principalmente las bacterias. Éstas representan la mayor parte de la masa que se encuentra en el colon llegando a significar hasta el 60 % del peso seco de las heces. El aumento del contenido bacteriano probablemente se explica por:

- disminución de la peristalsis;
- aumento del pH, cercano al fisiológico;
- disminución del contenido de agua.

Pasando la válvula ileocecal los microorganismos pueden alcanzar concentraciones de  $10^7$  hasta  $10^9$  células por mL, llegando al máximo de  $10^{11}$  por mL en el recto.

### Establecimiento de la microbiota.

El proceso de colonización del intestino se ha definido en su ecología como una “sucesión” (Savage, 1977). El establecimiento de las sucesiones de poblaciones microbianas colonizando el intestino acompaña el desarrollo del mismo (Figura 1.11).

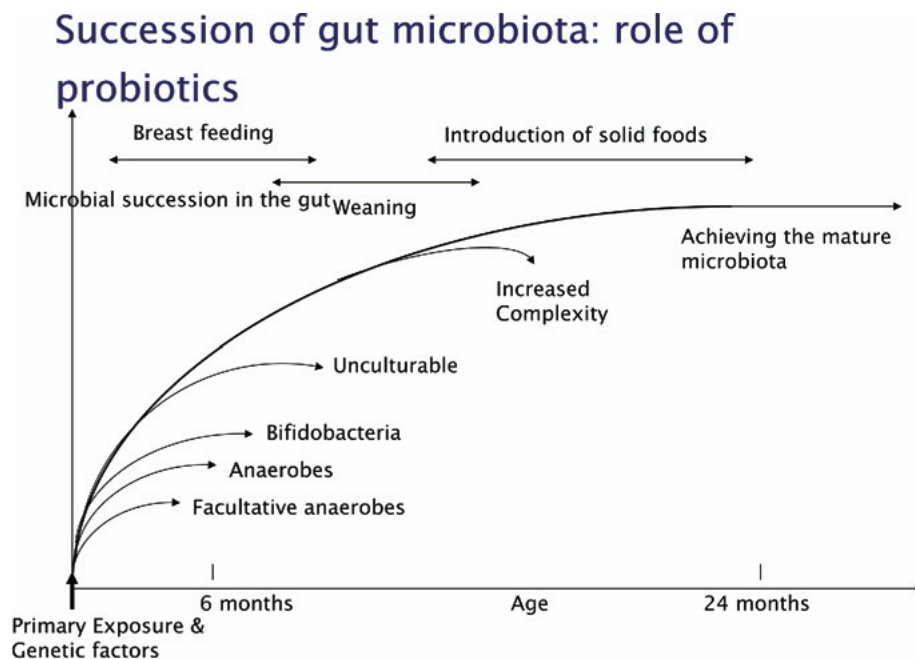


Figura 1.11: Sucesión de la microbiota intestinal en recién nacidos y la influencia de probióticos en el desarrollo (Salminen y Isolauri, 2006).

A lo largo de la colonización se observa un aumento de la diversidad microbiana. Además de esta tendencia gradual hacia la composición de la microbiota adulta, cada vez que hay eventos notables como cambios drásticos de dieta o tratamientos con antibióticos, se detectan variaciones importantes en la abundancia de las diferentes especies presentes en el intestino (Koenig et al., 2011).

En la Figura 1.11 podemos observar un esquema de los puntos más destacables del proceso.

El meconio<sup>23</sup> (*meconium*) es la sustancia almacenada en el intestino durante la etapa fetal y hasta hace poco se pensaba que era estéril (Savage, 1977). En la actualidad es una de las varias controversias abiertas acerca de la colonización del intestino. Como se está observando también para otros ambientes o fluidos (pulmones, leche materna, etc.), se ha demostrado que el tracto gastrointestinal del feto en realidad está habitado por microorganismos. Una de las nuevas hipótesis propone que el torrente sanguíneo de la madre puede transportar los primeros microorganismos al intestino del feto (Makino et al., 2011) y éstos podrían ser de importancia para el posterior desarrollo de la microbiota intestinal. A pesar de esto, durante el nacimiento, el bebé también recoge microorganismos a lo largo del canal del parto (Figura 1.12) (Dominguez-Bello et al., 2010). En el parto el tracto gastrointestinal del recién nacido está expuesto a una gran cantidad de microorganismos. Algunos de éstos no son capaces de colonizarlo y desaparecen al poco tiempo; otros, en cambio, pueden ser determinantes para la formación de la microbiota intestinal del adulto.

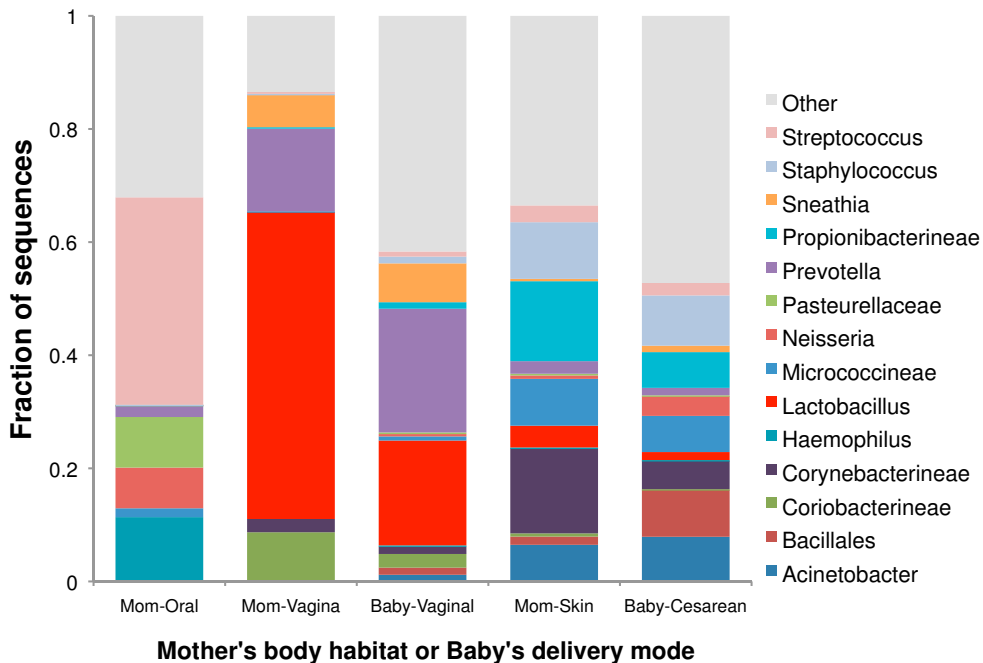


Figura 1.12: La secuenciación del gen 16S rRNA revela como las primeras microbiotas de los recién nacidos son diferentes según el tipo de parto. En la figura se observan las medias de abundancia de los taxones dominantes encontradas en varias muestras (Dominguez-Bello et al., 2010).

<sup>23</sup> Primera deposición del recién nacido.



El desarrollo de la microbiota gastrointestinal del recién nacido depende, por lo tanto, del inóculo original, de factores ambientales externos y, como ahora veremos, del tipo de alimentación temprana (Salminen y Isolauri, 2006).

*Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* se detectan desde el principio. Después del nacimiento, en la mayoría de los bebés, la microbiota está compuesta principalmente por bacterias lácticas. Según si el bebé está alimentado por leche materna o artificial, se pueden encontrar principalmente *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* respectivamente (Benno et al., 1984; Penders et al., 2006; Stark y Lee, 1982). Aún así hay estudios donde no se encuentra la relación entre alimentación con leche materna y bifidobacterias (Palmer et al., 2007).

Los anaerobios estrictos pueden ser detectados al inicio de la ingesta de sólidos. Algunas de las especies bacterianas que formarán parte de la microbiota del adulto ya aparecen en la lactancia. Éstas pueden estar en bajas concentraciones esperando a unas condiciones diferentes. Otras especies no pueden aparecer hasta que no se abandonan estas etapas. Por ejemplo, hasta que no se consigue un ambiente libre de oxígeno los anaerobios estrictos no pueden vivir.

A lo largo del establecimiento de la microbiota también se observan cambios e interacciones muy importantes entre las bacterias y el sistema inmune del individuo (Página 108).

### Composición de la microbiota intestinal.

La microbiota intestinal es, sin duda, el mayor y más complejo ecosistema microbiano asociado al hombre y se estima que a nivel del colon conviven más de 1.000 especies diferentes de bacterias, contando entre ellas con un gran número de anaerobios (Hooper y Macpherson, 2010). Entre los bacilos gram negativos la mayoría pertenecen a los géneros *Bacteroides* (*phylum* Bacteroidetes) y *Fusobacterium* (*phylum* Fusobacteria). Entre los cocos encontramos especies de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus* y *Sarcina* (*phylum* Firmicutes gram positivos) así como *Veillonella* y *Acidaminococcus* (Firmicutes gram negativo). Los bacilos gram positivos están representados por especies de los géneros *Bifidobacterium* y *Actinomyces* (Actinomycetes); *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Clostridium* (Firmicutes). Entre los anaerobios facultativos predominan las enterobacterias como *Escherichia*

*coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.

La composición de la microbiota intestinal se está estudiando principalmente a partir de la observación de la microbiota presente en muestras de heces, debido, básicamente, a su facilidad de recolección. No obstante, cabe destacar que varios estudios demuestran que la microbiota presente en las heces no es exactamente igual a la presente en el interior del intestino (Ahmed et al., 2007; Durbán et al., 2011; Ott et al., 2004).

Tabla 1.4: Abundancia media y variabilidad de las bacterias más frecuentes en heces.

<i>Phylum</i>	Género	Abundancia media (%)	Rango de abundancias (%)
Firmicutes		38,8	19,8 - 65,6
	<i>Faecalibacterium</i>	5,1	0,5 - 15,0
	Unclassified <i>Lachnospiraceae</i>	3,2	0,6 - 9,5
	<i>Roseburia</i>	2,6	0,2 - 25,1
Bacteroidetes		27,8	0,1 - 64,9
	<i>Bacteroides</i>	13,9	0,0 - 54,7
	<i>Prevotella</i>	4,4	0,0 - 35,5
	<i>Alistipes</i>	2,1	0,0 - 9,1
Actinobacteria		8,2	1,1 - 32,5
	<i>Bifidobacterium</i>	4,5	0,0 - 20,3
	<i>Collinsella</i>	1,8	0,0 - 7,6

Como se puede observar en la Tabla 1.4 los *phyla* Bacteroidetes y Firmicutes son los más abundantes en la microbiota intestinal (Kurokawa et al., 2007) (Tabla 1.5 para una descripción de los grupos), siendo *Bacteroides* el género más abundante y uno de los más variables. Los Firmicutes se adhieren a partículas de polisacárido de plantas, fibras y mucina (Cummings et al., 1987; Ley et al., 2006), y son más eficientes en la fermentación de carbohidratos insolubles (De Filippo et al., 2010). Especies de *Bacteroides*, que son más versátiles en la utilización de sustratos (Hooper et al., 2002; Macfarlane et al., 1992), utilizan oligosacáridos y polisacáridos solubles que provienen de la rotura de polisacáridos insolubles (Ley et al., 2006).

Como se puede observar en la Figura 1.13, la distribución típica de filogrupos bacterianos encontrados en el intestino humano muestra siempre un patrón de “cola larga”<sup>24</sup>, donde aparecen pocas especies de alta abundancia y muchas de baja (Arumugam et al., 2011). Esto puede ser explicado por la presión selectiva del hospedador y de los microorganismos (Dethlefsen et al., 2008). Este fenómeno es frecuente en

<sup>24</sup> ‘Long-tail’ effect.

Tabla 1.5: Descripción de los grupos bacterianos más frecuentes en heces.

---

<p><i>Faecalibacterium</i> es un gram negativo, no formador de esporas y anaerobio estricto. Son microorganismos no móviles que producen butirato, D-lactato y formiato y utiliza acetato (Duncan, 2002a).</p> <p>Las <i>Lachnospiraceae</i> son anaerobios no formadores de esporas, monotricas (presentan un solo flagelo), gram positivas, bacilos curvados que fermentan glucosa produciendo grandes cantidades de etanol y ácidos láctico, fórmico y acético (Bryant y Small, 1956).</p> <p><i>Roseburia</i> fermenta glucosa y acetato produciendo butirato, lactato, hidrógeno y dióxido de carbono (Duncan, 2002b).</p> <p><i>Bacteroides intestinalis</i> es un bacilo gram negativo, anaerobio estricto, que no forma esporas y no móvil (Bakir et al., 2006).</p> <p><i>Prevotella salivae</i> es un anaerobio estricto, no formador de esporas, no móvil y que produce ácido succínico y acético y pequeñas cantidades de ácido metilbutanoico (Sakamoto, 2004).</p> <p><i>Alistipes indistinctus</i> se tiñe como gram negativo y no forma esporas, de forma de coco a bastoncillo con terminaciones redondeadas y son anaerobias estrictas (Nagai et al., 2010).</p> <p><i>Bifidobacterium</i> son gram positivos, no móviles, bacilos formadores de esporas. Anaerobios facultativos y catalasa negativos. Fermentan glucosa produciendo ácidos acético y L-láctico (Hoyles, 2002).</p> <p><i>Collinsella</i> son gram positivos y anaerobios estrictos. No forman esporas y no tienen flagelos. Fermentan glucosa produciendo glucosa, hidrógeno, etanol, formiato y lactato (Kageyama y Benno, 1999).</p>
--

---

muchas comunidades microbianas y se ha descrito introduciendo el concepto de “rare biosphere” o “biosfera rara”. En el artículo de Lennon y Jones (2011) la “rare biosphere” define los taxones de una comunidad microbiana que se encuentran en extrema baja frecuencia<sup>25</sup>. Estas especies en baja frecuencia, por azar, podrían desaparecer fácilmente de la comunidad (Lawton et al., 1994). Para entender porqué se mantienen en la estructura global de la microbiota, se puede recurrir a diferentes hipótesis:

- Inmigración constante desde el exterior.
- Las funciones moleculares más abundantes se encuentran en las especies más representadas. Sin embargo hay grupos de genes ortólogos que son específicos de grupos de baja abundancia. Esto podría explicar porqué estos grupos no desaparecen a pesar de su bajo número (Arumugam et al., 2011).

---

<sup>25</sup> Textualmente: “A concept describing the observation that a very large proportion of the taxa in microbial communities are extremely uncommon” (Lennon y Jones, 2011).

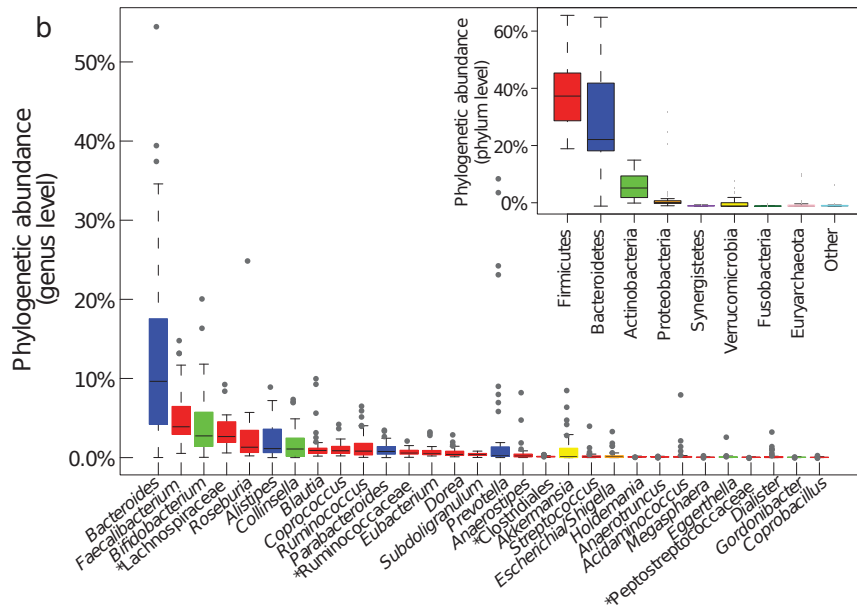


Figura 1.13: Distribución de los 30 géneros predominantes en la microbiota intestinal humana. Determinado por la abundancia de lecturas. Los géneros pertenecientes al mismo *phylum* están coloreados del mismo color. La figura incrustada representa la distribución de *phyla* (Arumugam et al., 2011).

- Las bacterias en baja frecuencia podrían estar en un estado de resistencia esperando a que las condiciones para su replicación mejoren (Sogin et al., 2006).
- Las bacterias en baja frecuencia son más activas y los cambios en el ambiente las afectan menos (Jones y Lennon, 2010).

Una descripción más detallada de la biosfera rara y del rol en la homeostasis de la microbiota gastrointestinal se encontrará en la página 79.

## Funciones.

La relación entre la microbiota intestinal y el hospedador parece no ser simplemente comensal. Sería comensal si solamente los microorganismos se beneficiaran de la relación. De hecho, se piensa que ésta es mutualista. Los microorganismos encuentran en el tracto gastrointestinal humano un ambiente amplio (400m<sup>2</sup>), una temperatura estable (37°C) y abundancia de nutrientes (Van Wey et al., 2011) y, como ahora veremos, aportan beneficios al humano. La microbiota intestinal juega

un papel importante tanto a nivel local como global (Nava y Stappenbeck, 2011).

La comunidad microbiana actúa como una barrera que previene la colonización de microorganismos no deseados o patógenos. La barrera se crea por la interacción entre los microorganismos y el hospedador (Salminen y Isolauri, 2006). Los microorganismos crean un ambiente resistente a la colonización basado en la limitación de nutrientes, la excreción de metabolitos que inhiben el crecimiento de patógenos, la producción de bactericidas, la competición por sitios de unión y otros factores desconocidos (Endt et al., 2010).

Otra cara del rol protector ofrecido por la microbiota intestinal está representada por su interacción con el sistema inmune. Esta interacción se establece de forma muy temprana en el desarrollo del organismo. La maduración del sistema inmune requiere la presentación de moléculas inmunomoduladoras. Por ejemplo bacterias como *Bacteroides fragilis* elaboran un polisacárido bacteriano que dirige el desarrollo de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Mazmanian et al., 2005). Además los peptidoglicanos de bacterias gram negativas son necesarias para inducir la génesis de folículos linfoides<sup>26</sup> que intervienen en el posterior mantenimiento de la comunidad microbiana (Bouskra et al., 2008). También se puede observar una selección y adaptación de las bacterias al organismo durante los primeros días del establecimiento de la microbiota.

Bacterias comensales ayudan a modular el nivel de IgA en el intestino, adaptándolo a las bacterias no patógenas habitualmente presentes en él (Hapfelmeier et al., 2010; Macpherson y Uhr, 2004).

En animales modelo para la esclerosis múltiple se ha visto que la microbiota intestinal afecta a la regulación de respuestas inmunológicas inflamatorias (Lee et al., 2011).

La interacción entre productos de las bacterias comensales y los receptores de reconocimiento de patrones microbianos como los receptores *toll-like* (TLRs) juegan un papel crítico en la resistencia al daño epitelial. Se ha demostrado que los TLRs, además de las funciones inmunológicas, inducen la expresión de varios factores que están involucrados en la protección celular, la reparación de tejidos y la angiogénesis (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Las bacterias mediante las células de Paneth<sup>27</sup> guían

<sup>26</sup> Los folículos linfoides están formados principalmente por linfocitos B, que sintetizan inmunoglobulinas A.

<sup>27</sup> Células de la base de las criptas del Lieberkuhn encargadas de secretar varios factores de

el desarrollo del sistemas vascular de los *villi* (Stappenbeck et al., 2002).

La microbiota afecta directamente a la arquitectura del intestino. En animales axénicos<sup>28</sup> el ciego es anormalmente largo. Esto se debe a la acumulación de *mucus* no degradados por la microbiota. Otros estudios con este tipo de animales demostraron que la microbiota aumenta la motilidad intestinal (Falk et al., 1998).

Uno de los efectos más conocidos y esperados es la participación de la microbiota en el metabolismo de nutrientes. Entre otros procesos, interviene en el almacenamiento de grasas, facilita la digestión de muchos nutrientes, permitiendo un procesado rápido de moléculas complejas y produciendo compuestos necesarios para el hospedador y ausentes en la dieta de éste (Bäckhed et al., 2005; Samuel et al., 2008). Por ejemplo, las bacterias del intestino grueso producen ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (Younes et al., 2001) y sintetizan vitaminas (Burgess et al., 2009).

Además del procesado de nutrientes las bacterias intestinales pueden intervenir en el metabolismo de fármacos, drogas o xenobióticos<sup>29</sup>, en general, afectando a su absorción y/o toxicidad (Wilson y Nicholson, 2009).

También afecta al curso de enfermedades metabólicas como la diabetes (Wen et al., 2008) o el síndrome metabólico (Vijay-Kumar et al., 2010). En este último puede ser determinante la primera microbiota para el desarrollo o no de los efectos perniciosos del síndrome.

### **Factores que afectan a la composición de la microbiota.**

La composición de la microbiota en el tracto gastrointestinal, y los cambios en ella, están regulados por procesos multifactoriales. La abundancia de bacterias de una especie se ve afectada por factores dependientes tanto del hospedador como de la microbiota misma (Savage, 1977).

**Fuerzas ejercidas por el hospedador, su dieta y su medio.** Como se puede observar en la Tabla 1.6 el hospedador afecta a la composición de la microbiota en áreas particulares.

---

crecimiento y lisozimas.

<sup>28</sup> Libres de bacterias.

<sup>29</sup> Los xenobióticos son compuestos químicos raramente encontrados en la naturaleza ya que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio.

Tabla 1.6: Condiciones impuestas por el hombre que pueden influenciar la composición de la microbiota en varias regiones del tracto gastrointestinal<sup>a</sup> (Savage, 1977).

Factor	Estómago	Intestino delgado	Intestino grueso
Temperatura	37°C	37°C	37°C
pH	Ácido	De neutral a alcalino	De neutral a alcalino
Estasis	Periódica	Periódica, pero solo en la parte baja	prolongada, especialmente en el ciego
Oxígeno	<i>b?</i>	?	poco, en el caso de que haya
Potencial redox	?	?	muy bajo cuando la microbiota está presente
Vitamina B <sub>12</sub> (Factor intrínseco)	?	parte superior	?
Enzimas (proteínas)	?	enzimas pancreáticas	?
Ácidos biliares	pocos	conjugados	deconjugados
Recambio epitelial	todas las áreas;	requiere del desplazamiento de los microorganismos unidos;	las células desprendidas pueden terminar como nutrientes para los microorganismos
Urea	?	?	en el ciego
Mucinas	todas las áreas;	puede actuar como nutriente para los microorganismos;	
	contribuye al ambiente viscoso		
Dieta	todas las áreas;	actúa como nutriente para los microorganismos	
Drogas	todas las áreas		
Anticuerpos	?	?	?
Células fagocíticas	?	en criptas de <i>Leiberkuhn</i>	?

<sup>a</sup> Alguna de estas condiciones puede ser alterada por la propia microbiota para ser más o menos efectiva influenciando la composición de la comunidad microbiana en conjunto(44,104)

*b?* No hay evidencias suficientes para sugerir que este factor puede operar en esta región

El pH es el factor principal que dicta qué microorganismos pueden colonizar el estómago (Bik et al., 2006). La peristalsis influye fuertemente evitando que los microorganismos se desarrollen en el *lumen* de las regiones superior y media del intestino delgado. Moody et al. (1995) demuestran cómo una disminución en el tránsito intestinal ocasiona un aumento de las bacterias en el *lumen*. Además existen otras fuerzas en todas las regiones del tracto digestivo.

La temperatura cercana a 37°C es el mayor atractivo para que los microorganismos crezcan en el intestino. Así mismo, la habilidad para crecer anaeróbicamente es una ventaja para los microorganismos que habitan cualquier localización del tracto intestinal (Onderdonk et al., 1976). Aún así, el efecto de otros factores no está claro.

Una parte de la microbiota utiliza las mucinas producidas por el epitelio intestinal como fuente de carbono y energía. Un claro ejemplo es *Bacteroides thetaiotaomicron*, el cual posee un repertorio enorme de enzimas para degradar estas mucinas (Xu y Gordon, 2003). Los animales axénicos excretan en sus heces mucha más mucina de lo normal (Carlstedt-Duke y Lingaas, 1986).

## **Respuestas inmunológicas que afectan a la composición de la microbiota.**

(Página 108)

Algunos antígenos de la microbiota se parecen mucho a los del hospedador (Foo, 1974), lo que indica la cercana relación que han tenido estos microorganismos con el hospedador durante la evolución, otorgando a estas bacterias una enorme ventaja a la hora de colonizar el intestino.

Uno de los mecanismos de los anticuerpos es evitar la adhesión del patógeno al epitelio. Este mecanismo evita, por ejemplo, que *Vibrio cholera* inicie la infección (Freter y Jones, 1976).

Asímismo, los macrófagos y algunos leucocitos pueden acceder al *lumen* desde la lámina propia y afectar a la composición de la microbiota (Gordon y Pesti, 1971).

El ambiente del hospedador también puede afectar a la microbiota intestinal (Savage, 1977). Por ejemplo, las emociones fuertes o la presión del aire durante cambios de altitud pueden afectar a la composición de la microbiota (Holdeman et al., 1976). Estos y otros factores que afectan a la fisiología pueden, por consiguiente, afectar a las comunidades bacterianas.

La dieta es otro factor que se ha demostrado que puede afectar a la composición



de la microbiota. Las microbiotas de diferentes mamíferos se agrupan por el tipo de dieta de estos y es probable que este concepto se pueda extender también a los humanos con diferentes dietas (De Filippo et al., 2010; Muegge et al., 2011). Se ha comprobado cómo cambiando la dieta en animales modelo varía rápidamente la expresión y la composición de la microbiota intestinal (Turnbaugh et al., 2009b). Este es un tema importante dado que se ha visto que ciertas dietas están ligadas a la predisposición a adquirir enfermedades (Cani et al., 2007). Esta relación entre dieta y enfermedad puede estar mediada por la microbiota (Cani y Delzenne, 2009).

La microbiota en general cambia según la cantidad de calorías ingeridas, adaptando la eficiencia en la extracción de energía de la dieta (DiBaise et al., 2008).

Los microorganismos que obtienen energía a partir de procesos de fermentación, pueden adquirir sus sustratos de la dieta o bien directamente del hospedador (por ejemplo de la mucina) (Xu y Gordon, 2003). Los aminoácidos también pueden ser una fuente importante de energía para la microbiota y éstos pueden provenir tanto de la dieta, como de la degradación de proteínas (enzimas, inmunoglobulinas, etc.) del hospedador, así como del recambio de las células epiteliales (Herbeck, 1974).

El amonio es, sin duda, una importante fuente de nitrógeno para la microbiota, que deriva o puede derivar de la ureólisis y la deaminación de aminoácidos (Ter-nouth, 1968). Otros microorganismos necesitan ácidos grasos para crecer que pueden obtenerse de la dieta o de las células epiteliales muertas (Morotomi et al., 1976).

**Fuerzas resultantes de actividades de los propios microorganismos.** Las poblaciones microbianas establecidas en el adulto, sin lugar a dudas ejercen fuertes influencias para mantener la estabilidad de la estructura de ésta. El efecto práctico es excluir los microorganismos alóctonos<sup>30</sup> de los nichos ocupados por la comunidad. Estas interacciones están mediadas por bacteriocinas, antibióticos, competición nutricional, metabolitos tóxicos como ácidos grasos o el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) y el mantenimiento de potenciales de óxido-reducción bajos (Savage, 1977).

Como se ha dicho anteriormente, los microorganismos no solo compiten directamente con los microorganismos alóctonos sino que afectan a la fisiología del hospedador interviniendo en procesos que regulan la comunidad. Pueden deconjugarse o alterar

---

<sup>30</sup> Microorganismos alóctonos son aquellos que no pertenecen a la comunidad y que podrían ser patógenos.

ácidos biliares e inducir la respuesta inmune del hospedador (Drasar y Hill, 1974). En el intestino delgado pueden provocar la peristalsis afectando a la colonización (Shooter, 1972).

Algunos microorganismos pueden utilizar el poco oxígeno disponible ocupando nichos que les reporten cierta ventaja (por ejemplo, instalándose cerca de las células epiteliales, donde algo de oxígeno de la sangre puede escaparse). Asimilando este oxígeno pueden contribuir al mantenimiento de un ambiente anaerobio estricto (Savage y Dubos, 1968).

Incluso dentro de la misma especie, mecanismos de *quorum sensing*<sup>31</sup> juegan un papel importante en la regulación de la adhesión (Sturme et al., 2002) y, por tanto, ayuda a limitar o potenciar la densidad de algunas bacterias en lugares determinados.

En resumen, la regulación de la microbiota es un proceso multifactorial donde algunas o todas las fuerzas descritas pueden afectar a la comunidad microbiana.

**Desequilibrios en la estructura poblacional de la microbiota.** Como ya hemos visto, la microbiota intestinal es parte integrante de la salud del huésped. Por el contrario, desequilibrios en su composición pueden derivar en enfermedades (Figura 1.14).

Estos desequilibrios en la microbiota humana son conocidos como disbiosis o disbacteriosis. Principalmente se refieren a cambios en el tracto gastrointestinal, piel, mucosa vaginal, etc.

Estos cambios pueden originarse por exposición a antibióticos, alcoholismo, etc. La microbiota normal produce determinada cantidad de productos de desecho y recicla otros productos; cuando ésta está desequilibrada pueden acumularse sustancias perjudiciales o faltar otras necesarias. Las alteraciones de las estructuras de poblaciones pueden encadenar unas cascadas de modificaciones que pueden volverse crónicas. Las disbiosis han sido asociadas a diferentes enfermedades, como la enfermedad inflamatoria intestinal o el síndrome de fatiga crónica (Logan et al., 2003).

---

<sup>31</sup> Mecanismo de comunicación entre bacterias que les permite coordinarse según la cantidad de éstas que hay en un lugar determinado.

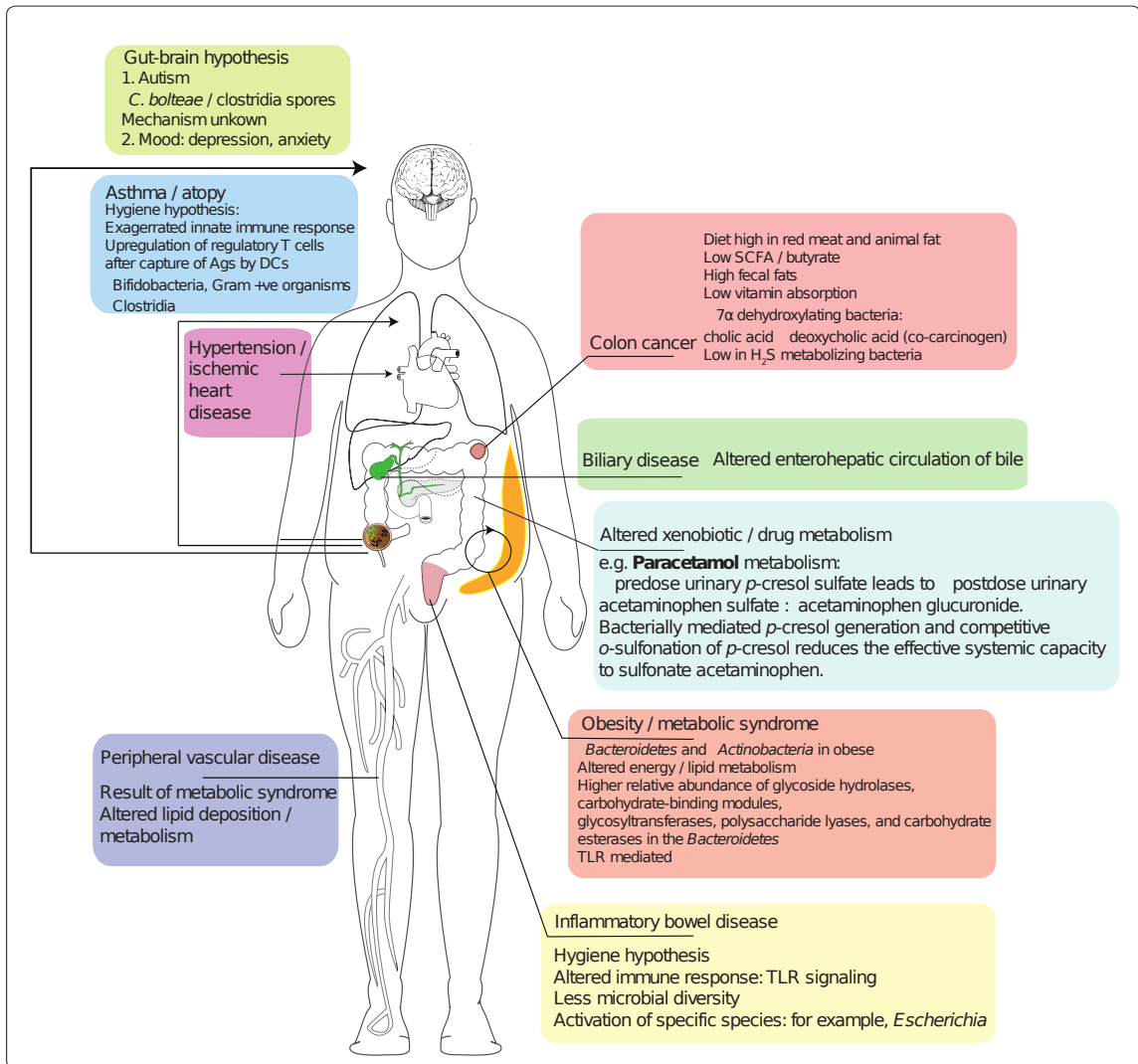


Figura 1.14: Enfermedades y rutas metabólicas influenciadas por la microbiota intestinal (Adaptado de Kinross et al. (2011)).

## 1.2. Estudio de las poblaciones bacterianas.

### 1.2.1. Métodos clásicos de identificación y clasificación de microorganismos.

Desde su primera edición en 1923 hasta la actualidad, el manual de referencia que recoge las características de los microorganismos es el “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*”<sup>32</sup>. A partir de la información disponible en la literatura académica, clasifica a los microorganismos no según sus relaciones evolutivas, sino basándose en varias características como la composición de la pared celular o la morfología, en tinciones diferenciales, en los requerimientos de oxígeno, en ensayos bioquímicos, etc. (Tortora et al., 1986) (Tabla 1.7)<sup>33 y 34</sup>.

Tabla 1.7: Métodos de clasificación y identificación de microorganismos.

---

Caraterísticas morfológicas - usando tinciones diferenciales (gram, Ziehl Neelsen, ...).
Ensayos bioquímicos para determinar la presencia de enzimas.
Ensayos serológicos como ELISA o Western Blot.
<i>Phage typing</i> , sirve para identificar cepas o especies.
Perfiles de ácidos grasos.
Características fisicoquímicas mediante citometría de flujo.
Contenido de GC en el DNA.
Otras características del DNA - perfiles de restricción mediante endonucleasas.
Identificación mediante PCR.
Hibridación de ácidos nucleicos - Southern blot, chips de DNA y FISH, etc.
Secuenciación del gen ribosomal 16S.

---

Estos esquemas de identificación y clasificación son ampliamente utilizados en microbiología médica. Aún así, de las más de 2.600 especies listadas (*Approved Lists of Bacterial Names*), menos de un 10 % son patógenos humanos. De hecho, la llegada

<sup>32</sup> En 1994 apareció la 9ª edición (Holt et al., 1994).

<sup>33</sup> PCR:Reacción en cadena de la polimerasa.

<sup>34</sup> El contenido de GC es el porcentaje en Guanina y Citosina del genoma de una bacteria calculado de la siguiente forma:  $\frac{G+C}{A+T+G+C} \cdot 100$ . Algunos grupos taxonómicos tienen contenidos en GC característicos.

de la biología molecular como método de estudio de la diversidad bacteriana aplicado a la microbiota humana, ha hecho posible que la visión de las bacterias como responsables de enfermedades haya cambiado. Como hemos visto, la mayoría de las bacterias que viven con nosotros no sólo no son perjudiciales sino que son necesarias para el correcto desarrollo y funcionamiento de nuestro cuerpo.

Como ejemplo, la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) ofrece los servicios de identificación de procariotas mostrados en la Tabla 1.8.

Tabla 1.8: Servicios ofrecidos por la colección española de cultivos tipo (CECT <http://www.cect.org/>).

---

La CECT ofrece un servicio de identificación de aislados de procariotas basado fundamentalmente en la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, junto con una caracterización morfológica y fenotípica básica. También es posible solicitar la secuencia completa del gen 16S rRNA, así como la realización de un estudio filogenético detallado mediante el estudio de dicha secuencia.

La CECT ofrece además la posibilidad de realizar pruebas adicionales, incluyendo el ribotipado automático (Riboprinter), la caracterización fenotípica mediante sistemas miniaturizados, la composición de ácidos grasos celulares (MIDI) y el análisis de proteínas mediante MALDI-TOF.

En la caracterización de cepas bacterianas utilizando los sistemas miniaturizados API e ID 32 de Biomérieux, la CECT adjuntará el perfil bioquímico obtenido y el informe que se genera al contrastar dicho perfil con los existentes en las bases de datos correspondientes. (nota: como en cualquier otro sistema de identificación algunos aislados dan lugar a resultados no concluyentes, que aparecerán comentados en el informe según se trate de baja discriminación, identificación no fiable, perfil dudoso o perfil inaceptable).

El sistema MIDI (Sherlock Microbial Identification System) para el estudio de la composición de ácidos grasos celulares permite la identificación de las cepas que pertenezcan a las especies registradas en las librerías de MIDI, así como la caracterización de aislados proporcionando la composición relativa de sus ácidos grasos celulares.

El análisis de proteínas celulares mediante MALDI-TOF permite la obtención de perfiles útiles para identificar y agrupar aislados.

---

La mayoría de estos métodos requieren no sólo que la bacteria sea cultivable sino que seamos capaces de aislarla, lo cual restringe enormemente el número de bacterias a estudiar. De hecho, somos incapaces de cultivar la mayoría de especies bacterianas y, según las últimas estimaciones, solamente en 8 de los 28 *phyla* bacterianos

conocidos hay especies cultivables en la actualidad (Achtman y Wagner, 2008). Uno de los argumentos que explican nuestra incapacidad para cultivar la mayoría de las bacterias es que no disponemos de información suficiente para el desarrollo de medios de cultivo, ya que no conocemos todas las concentraciones y proporciones de oligoelementos y sustratos requeridos (Schmidt y Konopka, 2009), aunque, de hecho, poco a poco se están haciendo avances en esta dirección (Kaeberlein et al., 2002; Stevenson et al., 2004). Otras especies bacterianas son capaces de entrar en un estado viable no cultivable o inactivo y, a pesar de tener las condiciones óptimas para crecer, necesitan una señal para activarse. Algunas de estas señales pueden ser moléculas involucradas en el *quorum sensing* y transducción de señales, como el AMP cíclico y las acil-homoserina-lactonas (Bruns et al., 2002; Stevenson et al., 2004; Zengler, 2009).

### 1.2.2. Técnicas moleculares.

En las últimas décadas, se han desarrollado técnicas moleculares de análisis que no dependen del cultivo. La aplicación de estas técnicas ha puesto de manifiesto una diversidad filogenética al menos 100 veces mayor que las estimaciones basadas en estudios dependientes de cultivo (Pace, 1997).

Como se puede observar en la Tabla 1.9, hay multitud de técnicas moleculares basadas en los ácidos nucleicos. De estas técnicas, los métodos indirectos pueden ofrecer información cualitativa sobre de la diversidad de un lugar, o bien, ayudar a decidir si dos bacterias pertenecen o no a la misma especie. Los análisis comparativos de secuencia son mucho más informativos y permiten, según el caso, llegar a identificar a nivel de especie o de cepa. Mediante PCR o usando sondas específicas pueden detectarse, e incluso cuantificarse, especies caracterizadas previamente.

#### Métodos basados en el estudio del gen 16S rDNA.

La mayoría de los estudios de diversidad bacteriana medioambientale están basados en el análisis de la subunidad pequeña del gen ribosomal 16S (Woese y Fox, 1977). Este gen codifica para un RNA que forma parte de la subunidad 30S del ribosoma de los procariontes. Está presente en todas las bacterias y está lo suficientemente conservado como para poder alinear de forma precisa las posiciones homólogas de

Tabla 1.9: Técnicas basadas en ácidos nucleicos (Ludwig, 2007).

Métodos indirectos	
Composición de los ácidos nucleicos y similaridad	
	Contenido genómico de G+C
	Hibridación cuantitativa de ácidos nucleicos
Patrones	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) <i>Amplified fragment-length polymorphism</i>
	Análisis de restricción de DNA amplificado (ADRA) <i>Amplified DNA restriction analysis</i>
	Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
Métodos directos	
Análisis comparativo de secuencias	
	Marcadores conservados
	rRNA
	Marcadores alternativos (de genes conservados)
	Marcadores para estudios por bajo del nivel de especie
	Espaciadores intergénicos del rDNA
	Tipado mediante secuencias multilocus (MLST) <i>Multilocus sequence analysis/typing</i>
Sondas y técnicas de PCR	
	Sondas contra rRNA
	Microarrays
	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) <i>Fluorescent in situ hybridisation</i>
Técnicas con sondas polinucleotídicas	
	Inmovilización celular específica de taxón
	RING-FISH
	PCR Diagnóstico
	PCR o sondas específicas de cepa

unas especies con otras. También posee suficiente variabilidad en determinadas regiones como para llevar a cabo los análisis filogenéticos<sup>35</sup> (Clarridge, 2004; Turnbaugh et al., 2007; Woese y Kandler, 1990). El uso del análisis comparado de la secuencia de dicho gen ha sido muy importante para el desarrollo de la taxonomía moderna de los procariotas. A pesar de varios posibles problemas de interpretación<sup>36</sup> hay dos motivos principales para ello, la información contenida en este marcador es muy superior a sus alternativas y la calidad de las bases de datos disponible<sup>37</sup> permite tener buena resolución prácticamente hasta nivel de especie (Ludwig, 2007).

### Secuenciación masiva.

La tecnología clásica de secuenciación (Método de Sanger) ya era suficiente para que la comparación de secuencias del gen 16S rDNA fuera la mejor estrategia a seguir si se quería caracterizar la composición de una comunidad bacteriana. Antes de la entrada de los nuevos métodos de secuenciación masiva el protocolo más utilizado en la descripción de comunidades microbianas se basaba en la construcción de librerías de clones a partir de amplicones del gen 16S rDNA obtenidos por PCR usando cebadores universales que abarcan la mayoría de la diversidad (Lane et al., 1991; Weisburg et al., 1991).

Los nuevos métodos de secuenciación masiva, como 454 (Roche), Solexa (Illumina) y SOLiD (ABI), no requieren el laborioso y costoso paso de la construcción de las librerías, ya que permiten secuenciar el DNA de forma directa. Otra ventaja de estos métodos es la enorme profundidad de secuenciación que se obtiene en tiempos mucho más reducidos.

Estos métodos han permitido el desarrollo de la metagenómica, llevada a cabo por primera vez por Tyson et al. (2004) y Venter et al. (2004), de forma independiente, los cuales secuenciaron DNA de muestras procedentes de minas ácidas y del mar de los Sargazos, respectivamente, sin seleccionar ni amplificar ninguna región o gen

---

<sup>35</sup> De hecho, el gen 16S rDNA se considera el marcador universal para el estudio del árbol de la vida.

<sup>36</sup> Como el uso de un solo gen, la transferencia horizontal, el número variable de copias de los genes ribosomales, etc.

<sup>37</sup> Algunas de las bases de datos más utilizadas son [Silva](#), [Greengenes](#) y [RDP](#) (Cole et al., 2009; DeSantis et al., 2006; Pruesse et al., 2007).



específico. Esta aproximación permite establecer la estructura poblacional<sup>38</sup> y a la vez permite reconstruir redes metabólicas. Incluso, teóricamente, sería posible reconstruir todos los genomas completos presentes en un ambiente (Konstantinidis y Tiedje, 2005; Ludwig, 2007).

La metagenómica que en sus primeros pasos con sanger ya era muy prometedora, el enorme aumento en el número de secuencias obtenidas con estos métodos de secuenciación masiva permitió abordar mucha más diversidad. Aún si una importante limitación era la longitud de las secuencias obtenidas<sup>39</sup>, hoy se alcanzan los 800bp<sup>40</sup>. A pesar del avance que esto implica, el cuello de botella está actualmente en nuestra capacidad de análisis.

**Limitaciones de la secuenciación masiva del DNA.** A pesar de todo el potencial de estas tecnologías, la mera comparación de secuencias no nos ofrece una visión completa. Se necesita de otras tecnologías complementarias u otras formas de “preguntar” a la vida. Hay varios puntos que está bien tener siempre en cuenta a la hora de analizar e interpretar los datos.

- La presencia de una bacteria no supone que ésta esté activa (Lewis, 2007).
- La presencia del DNA de un gen en concreto no quiere decir que éste se esté expresando (Göransson et al., 1990; Wanner, 1993).
- Encontrar una secuencia similar a otra (por comparación con una base de datos) no significa que realice la misma función, ya que, por ejemplo, un solo cambio en un nucleótido puede afectar de forma importante a la funcionalidad de una proteína (Kinch y Grishin, 2002).
- El 16S rDNA como marcador en especies no cultivables indica a que especie ya conocida está más próxima al fragmento secuenciado, pero no necesariamente da información de qué especie se trata (Janda y Abbott, 2007a).

---

<sup>38</sup> Aunque es necesario un mayor número de secuencias que con la amplificación del gen 16S rDNA.

<sup>39</sup> 454 empezó con tamaños de secuencia alrededor de los 100 nucleótidos.

<sup>40</sup> Pirosecuenciación 454 con la química Titanium Plus.

- Una misma especie, si posee un plásmido, virus o elemento móvil, puede convertirse en patógena o ganar una resistencia o función que cambien profundamente su forma de relacionarse con todo el resto de la comunidad (Janda y Abbott, 2007b; Kretschmer et al., 1975; Roberts y Mullany, 2009; Webb et al., 2004; Woodford, 2001).
- El genoma donde está localizado un gen afecta a su función mediante la relación con otros genes (contexto genómico), su regulación, etc. Es más, la localización final de una enzima puede afectar a su función (Wolf et al., 2001).
- La metagenómica da una visión de la diversidad en un lugar pero no puede dar una visión de lo que ocurre realmente. Se puede, por ejemplo, ver la sucesión de especies en un biofilm, pero el alto número de especies no cultivables limita el estudio de esta comunidad (Hojo et al., 2009).

Para tener una visión más completa y robusta de las comunidades microbianas, se deben considerar otros abordajes complementarios que proporcionen evidencias acerca de las funciones y actividad de las bacterias. Así, se han publicado varios artículos comparando, por ejemplo, librerías de clones obtenidas a partir de DNA contra otras obtenidas a partir de RNA (como índice de actividad bacteriana) (Gentile et al., 2006).

Otros ejemplos de aproximación funcional al estudio de una comunidad bacteriana está representado por la metatranscriptómica y la metaproteómica. Con la primera se pretenden obtener informaciones genéticas de los genes expresados secuenciando directamente los RNA mensajeros (mRNA)<sup>41</sup> (Gosalbes et al., 2011). Con la segunda se obtiene información de las proteínas presentes en un ecosistema, aunque aún tiene algunos inconvenientes en la extracción, separación e identificación (Wilmes y Bond, 2006).

En resumen, el desarrollo de métodos de secuenciación masiva nos ha permitido entrar en una era donde podemos alcanzar, con un limitado esfuerzo económico y de tiempo, un nivel de resolución genética impensable hasta hace pocos años. Pero también ha abierto las puertas al uso de otras tecnologías disponibles que se pueden adaptar a estas nuevas técnicas de secuenciación, lo que amplía de manera

---

<sup>41</sup> Se debe realizar un paso previo de retrotranscripción a DNA complementario.

considerable tanto el nivel de preguntas que podemos hacernos, como las respuestas que se obtengan.

### 1.3. Microbiología basada en células individuales: Citometría de flujo.

*Microscopy is difficult when cells are on the fly;  
It's lucky the cytometer's now quicker than the eye.  
This hasn't been the case throughout the gadget's evolution,  
But lasers and computers have provided a solution  
To problems of illuminating cells, at least a myriad  
Per second, and collecting ample data, in that period,  
To pick out some to keep, and destine others for rejection.  
For modern labs, the instrument's a natural selection!*

*Shapiro 2004, The evolution of cytometers.*

Shapiro y Leif (2003) en su libro “Practical flow cytometry” define la citometría de flujo como sigue:

La citometría es un proceso en el cual se miden las características físicas y/o químicas de células individuales, o por extensión, de partículas, biológicas o no, de tamaño similar. En la citometría de flujo estas medidas se hacen mientras las células o partículas pasan a través de un aparato de medida, el citómetro de flujo, en una corriente fluida. El “sorter” (separador), o “flow sorter”, es un citómetro de flujo que utiliza métodos eléctricos o mecánicos para desviar y recolectar las células (u otras partículas pequeñas) de unas características determinadas que coinciden con el rango de valores elegido por el usuario.

El primer prototipo conocido de un aparato parecido a un citómetro de flujo es de 1934, aunque nunca llegó a ser construido (Moldavan, 1934). Años después se presentó el primer citómetro que llegó a funcionar (Figura 1.15) (Gucker Jr et al., 1947). Se utilizó para detec-

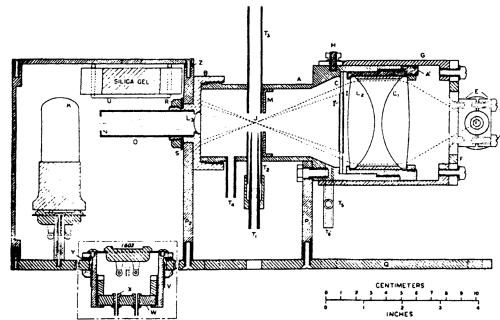


Figura 1.15: Esquema del primer citómetro de flujo en funcionamiento (Gucker Jr et al., 1947).

tar partículas en suspensión en el aire en la segunda guerra mundial, aunque su publicación se retrasó por motivos militares.

La citometría de flujo evolucionó junto con los ordenadores que permitían hacer su función con mucho mayor rendimiento. Otro de los hitos en la citometría fue la aparición del sorter (Figura 1.16) que permite separar físicamente las poblaciones de células con las características deseadas.

En la década de los 70 aparecieron los primeros citómetros comerciales y su uso se ha ido extendiendo, sobretodo en clínica, para medir células eucariotas.

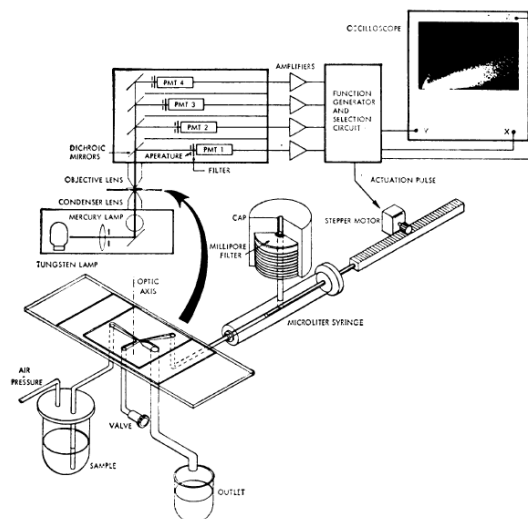


Figura 1.16: Esquema del primer citómetro de flujo con *Sorter* (Kamentsky y Melamed, 1967).

### 1.3.1. Principios generales de la citometría de flujo.

En un citómetro de flujo (Figura 1.17) la muestra inicial son células o partículas<sup>42</sup> en suspensión en un líquido. La muestra entra en el circuito del citómetro de flujo mediante una bomba o por diferencia de presión y es inyectada dentro de un flujo laminar. El sistema de flujo laminar es creado por el citómetro utilizando líquido ajeno a la muestra y éste discurre en láminas ordenadas sin mezclarse.

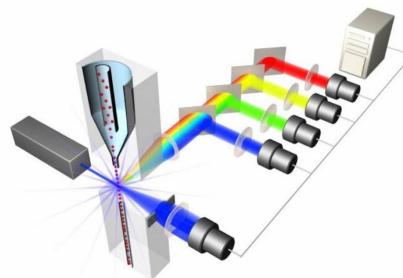


Figura 1.17: Esquema de un citómetro de flujo. [http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page\\_id=852](http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=852).

<sup>42</sup> Cada célula o partícula que es medida por el citómetro de flujo es denominada como evento.

Consigue, de esta forma, que las partículas o células inyectadas en él, se alineen y pasen una detrás de otra a través de uno o varios láser (Figura 1.18). Cada partícula desvía de forma diferente el haz de luz<sup>43</sup> y/o al absorber la energía de ésta, emite en diferentes longitudes de onda.

Esta luz resultante del encuentro de láser con la partícula es fraccionada y filtrada por un sistema de espejos<sup>44</sup> y recogida por sensores (Figura 1.19) que envían la información de intensidad a un ordenador. Dependiendo del citómetro y de la muestra, la velocidad de adquisición puede variar entre cientos y miles de eventos por segundo, recogiendo así, en cuestión de minutos, datos de cientos de miles de células.

Al ordenador llegan, para cada evento, los datos de fluorescencia de cada receptor y se obtiene una tabla como la Tabla 1.10.

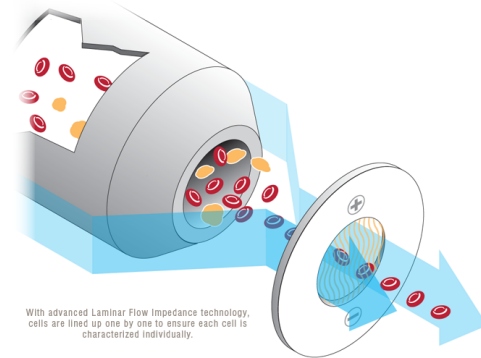


Figura 1.18: Creación del flujo laminar.

<http://www.idexx.com>

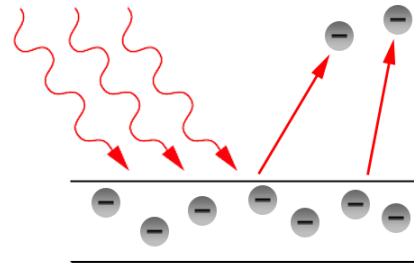


Figura 1.19: Efecto fotoeléctrico por el que funcionan los receptores de señal del citómetro de flujo. <http://physics.about.com/>

Tabla 1.10: Datos que obtiene el citómetro

	Rojo	Amarillo	Azul	...	Complejidad	Tamaño
Célula 1	2	1	1	...	2	3
Célula 2	5	2	2	...	3	2
Célula 3	1	7	1	...	5	5
Célula 4	1	2	2	...	4	2
...	...	...	...	...	...	...

<sup>43</sup> Difracción, refracción, ...

<sup>44</sup> Espejos dicróicos.

## Representación de los datos.

Para representar los datos se suele recurrir a diferentes tipos de gráficas que los hacen más visuales.

**Histograma de un parámetro** (Figura 1.20). Es una gráfica que representa el número de células en el eje  $Y$  y un parámetro en el eje  $X$ . Este parámetro es proporcional al voltaje generado por una luz específica detectada por el fotomultiplicador (PMT). En otras palabras, cuanto mayor es la intensidad de la fluorescencia de cada evento, mayor es la señal representada en el histograma (eje  $X$ ).

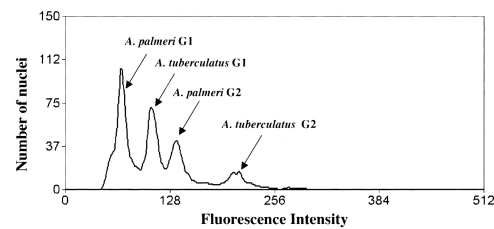


Figura 1.20: Representación de los datos de un parámetro de la citometría de flujo. El eje  $Y$  representa el número de eventos con una intensidad  $X$ . <https://www.crops.org/>

**Gráficos de dos parámetros** (Figura 1.21). El típico gráfico para representar más parámetros es el *dot-plot* (gráfico de puntos), representando en cada uno de los ejes un parámetro distinto. A este tipo de gráfico se le puede añadir una información de cantidad bien por un densitograma (el color de cada punto depende del número de eventos con estos mismos valores) o bien mediante contornos de cuantil en donde unas líneas o contornos unen los valores con el mismo número de eventos.

También pueden representarse los datos utilizando tres parámetros, dando como resultado representaciones tridimensionales.

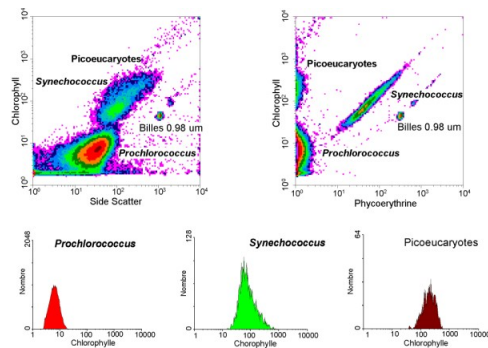


Figura 1.21: Representación de los datos de dos parámetros de la citometría de flujo. Cada uno de los ejes representa la intensidad de un evento en cada uno de los parámetros. El número de eventos en cada punto (con la misma intensidad de fluorescencia en ambos parámetros) se representa con una escala de colores. <http://en.wikipedia.org/>

### Tipos de datos.

**Forward scatter o luz dispersada hacia adelante.** El láser, al atravesar la partícula, sufre un proceso de refracción que depende de la longitud de dicha partícula. Como se puede ver en la Figura 1.22 el sensor *forward scatter* no recibe luz si ésta no es desviada, pero a mayor tamaño de la partícula más cantidad de luz refractada y mayor intensidad de la señal en el sensor. Por lo que el *forward scatter* nos da una idea de tamaño.

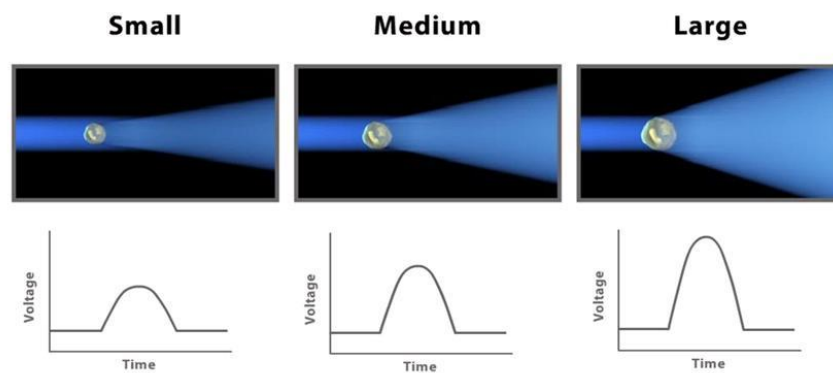


Figura 1.22: Diferencias en la dispersión de la luz por diferentes tamaños de partículas y la señal recibida en un citómetro de flujo. [http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page\\_id=852](http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=852)

**Side scatter o luz dispersada lateralmente.** Otra parte de la luz es reflejada al chocar con gránulos, membranas, etc (Figura 1.23), a mayor heterogeneidad de la partícula más luz es reflejada (sufrir difracción). Por lo tanto el *side scatter* nos da una idea de la complejidad de la partícula.

Solo con el uso de el *forward scatter* y el *side scatter* se pueden diferenciar las poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos sin necesidad de tinción o tratamiento (Figura 1.24).

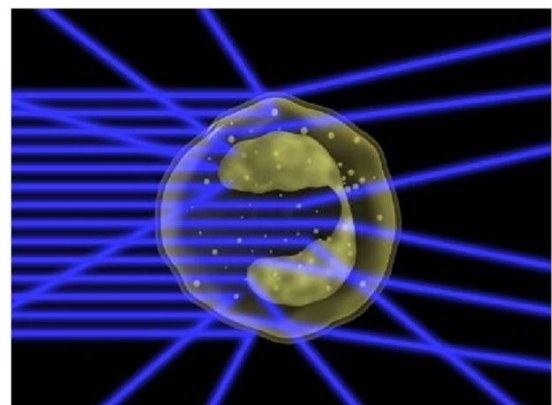


Figura 1.23: Una célula según el número de elementos en su interior dispersa en mayor o menor medida el haz de luz. [http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page\\_id=852](http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=852)

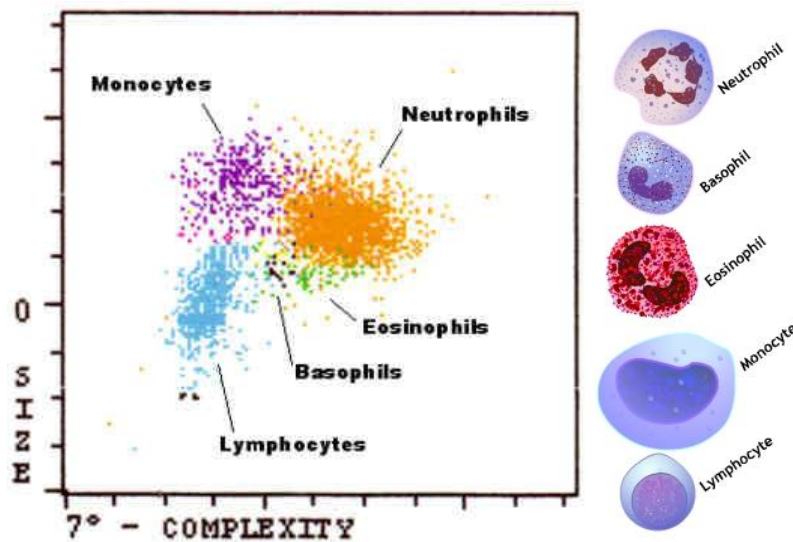


Figura 1.24: Representación de un histograma de dos parámetros y la posición de diferentes células sanguíneas en el según el *forward scatter* (Tamaño) y el *side scatter* (Complejidad). <http://www.pathology.vcu.edu/> y <http://www.rnceus.com/cbc/cbcwbc.html>

**Fluorescencia.** Las sondas fluorescentes permiten detectar los componentes marcados de forma sensible y selectiva.

La fluorescencia es el resultado de un proceso de tres fases que ocurre a las moléculas llamadas fluoróforos. El proceso responsable de la fluorescencia se puede observar en la Figura 1.25.

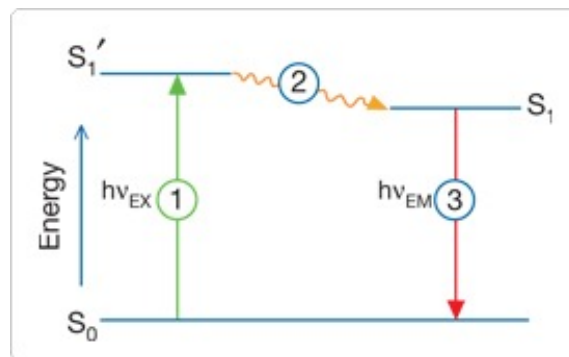


Figura 1.25: El diagrama de Jablonski ilustra el proceso involucrado en la creación de un electrón excitado debido a absorción de luz y a la posterior emisión de fluorescencia. <http://www.calm.ed.ac.uk/left%20nav%20page-fluorescence%2001.html>



**Etapa 1: Excitación.** Un fotón de energía  $h\nu_{EX}$  que proviene de una fuente exterior, como una lámpara incandescente o un láser, es absorbido por el fluoróforo y excita a un electrón.

**Etapa 2: Estado excitado.** El estado excitado existe un tiempo limitado<sup>45</sup>. Durante este tiempo el fluoróforo pasa por cambios conformacionales y está expuesto a multitud de interacciones con moléculas de su entorno. Estos procesos tienen dos importantes consecuencias. La primera es que la energía absorbida se disipa parcialmente<sup>46</sup>, resultando así un estado excitado de menor energía. El “*Quantum yield*” es la ratio entre el número de fotones emitidos (en la etapa 3) y el número de electrones absorbidos (en la etapa 1).

**Etapa 3: Emisión de fluorescencia.** Se emite un fotón de energía  $h\nu_{EM}$ , devolviendo al fluoróforo a su estado relajado  $S_0$ . Debido a la energía de disipación durante el estado excitado, esta energía es menor y por lo tanto su longitud de onda es mayor que la del fotón de excitación  $h\nu_{EX}$ . La diferencia de energía o de longitud de onda, representada por  $h\nu_{EX}-h\nu_{EM}$  es conocida como “*Stokes shift*”. Esta diferencia es fundamental para la sensibilidad de las técnicas de fluorescencia debido a que permite la detección de los fotones emitidos sin el ruido de fondo de los fotones de la fuente de excitación.

**Espectro de fluorescencia.** El proceso de la fluorescencia es cíclico, generando miles de fotones a partir de un fluoróforo. Este hecho es fundamental para la alta sensibilidad de las técnicas de detección de fluorescencia. En la Figura 1.26 se pueden observar los espectros de excitación y emisión. El ancho de banda es un parámetro importante para las aplicaciones donde se utilizan varios fluoróforos.

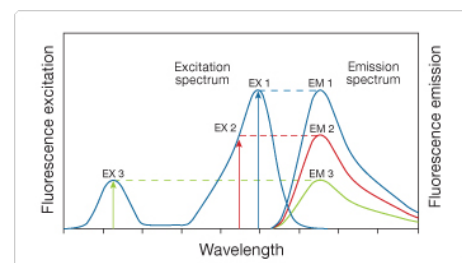


Figura 1.26: La excitación de un fluoróforo a diferentes longitudes de onda (EX 1, EX 2, EX 3) no cambia el espectro de emisión pero varía la intensidad de la emisión (EM 1, EM 2, EM 3) que corresponde a la amplitud del espectro de excitación.

<sup>45</sup> Típicamente 1-10 nanosegundos.

<sup>46</sup> Incluso puede disiparse completamente mediante otros procesos como el quenching o el FRET.

En el caso de que haya partículas/células que emitan autofluorescencia, o esté marcada con fluoróforos, y el láser sea capaz de excitarlas, la emisión podrá ser captada por el sensor correspondiente. Utilizando espejos dicróicos<sup>47</sup> y filtros se consigue dirigir longitudes de onda específicas a cada receptor, y estos sensores medirán la cantidad de luz emitida a ciertas longitud de onda. De esta manera se consigue determinar la presencia de, por ejemplo, clorofilas, carotenoides o DNA teñido con DAPI<sup>48</sup>.

### *Gating.*

El *gating* (Figura 1.27) permite seleccionar una subpoblación de células con unas condiciones<sup>49</sup> específicas y resaltarlos en otras gráficas o restringir el análisis a poblaciones de interés.

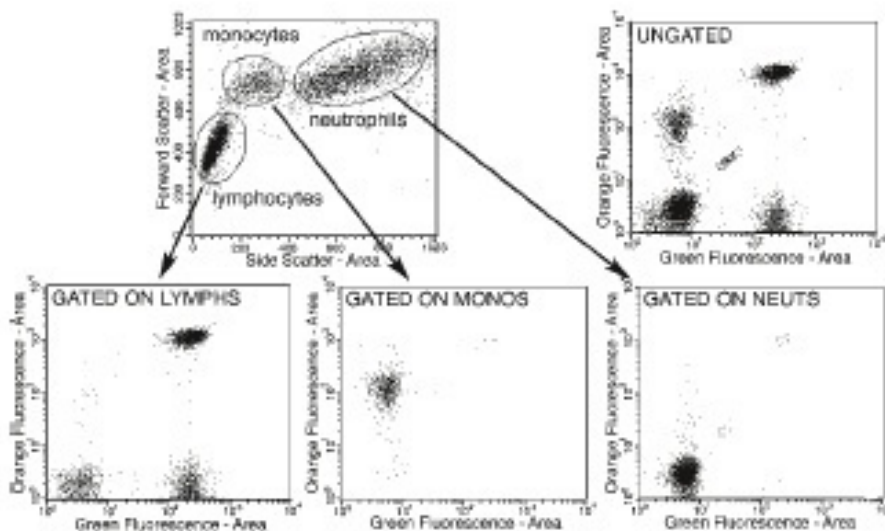


Figura 1.27: Efecto de diferentes gates del *forward-scatter plot* en el *orange-green plot*. <http://www.springerimages.com/>

<sup>47</sup> Permiten que ciertas longitudes de onda los atraviesen y reflejan otras.

<sup>48</sup> 4',6-diamidin-2-fenilindol.

<sup>49</sup> Intensidad de señales en diferentes PMTs.

### Sorting.

El *sorter* permite separar físicamente los eventos que cumplen las características seleccionadas por el investigador. El citómetro mide las señales que provienen de cada evento. El fluido en el que van inmersos los eventos atraviesan una boquilla que vibra de forma constante. Esta vibración rompe siempre en el mismo punto el fluido en gotas independientes. El *sorter* está calibrado para reconocer estas distancias y saber en qué gota va el evento medido. Según los parámetros de cada evento y según el *gating* determinado por el operador, las gotas que reúnan unas determinadas características serán cargadas positiva o negativamente, y al pasar por un campo electromagnético se desviarán según su carga y se dirigirán a un tubo u otro (Figura 1.28). En resumen, el operador puede elegir mediante el *gating* los eventos a separar.

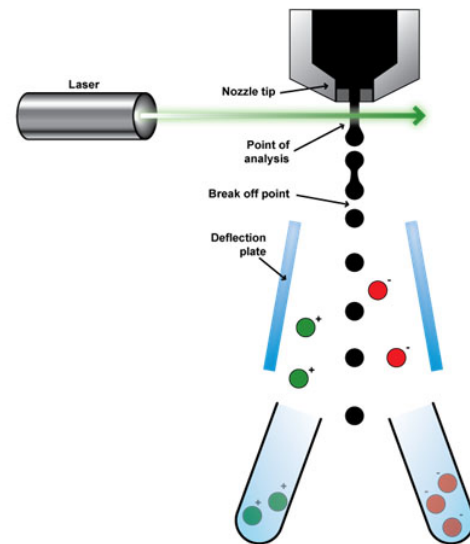


Figura 1.28: Diagrama de los componentes principales de un sorter. <http://cba.musc.edu/>

### 1.3.2. Uso general de la citometría.

Una de las aplicaciones más comunes en citometría de flujo es en clínica para medir células sanguíneas humanas, pero está ampliándose su campo de aplicación y se empieza a utilizar extensamente en microbiología.

#### Aplicaciones de la citometría de flujo.

Mediante citometría de flujo se puede:

- Monitorizar la biomasa de autótrofos en una comunidad (Figura 1.29) (Durand et al., 2001).
- Obtener tasas de crecimiento y actividad metabólica (Del Giorgio et al., 1997).

- Determinar qué bacterias utilizan cierto metabolito (Lomas et al., 2011).
- Determinar el momento en que se expresa y cuándo se activa cierta proteína (Jochem et al., 2000).
- Determinar relaciones de predación entre microorganismos (Sherr et al., 2002).
- Separar célula a célula para realizar “*single cell genomics*” (Stepanauskas y Sieracki, 2007).
- Ver cambios en comunidades enteras (Günther et al., 2009).
- Estudiar cómo afecta un antibiótico a la membrana de una bacteria (Novo et al., 2000).
- etc.

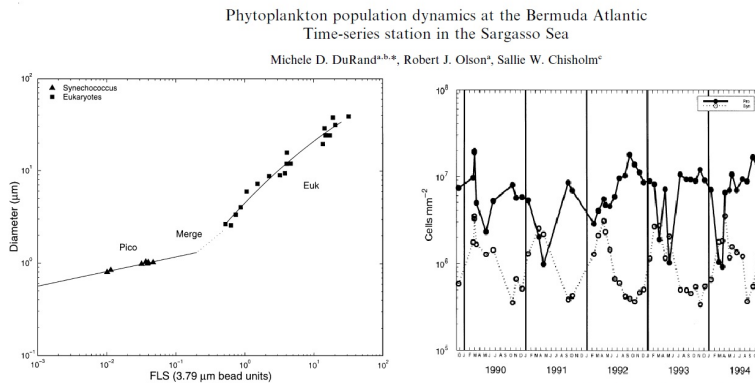


Figura 1.29: Calibración del *forward scatter* y el tamaño de diferentes bacterias y eucariotas y la serie temporal de las concentraciones de dos bacterias en medio marino (Durand et al., 2001).

---

# Capítulo 2

## Objetivos

La elevada complejidad de la microbiota intestinal humana deja insuficientes las metodologías de secuenciación masiva. La combinación de estas metodologías con la citometría de flujo puede dar información tanto estructural como funcional sobre esta comunidad microbiana.

Los objetivos de esta tesis son utilizar la citometría de flujo para abordar distintos problemas no resueltos por métodos de NGS.

1. Caracterizar la estructura poblacional de las bacterianas mayoritarias y minoritarias mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) sobre filogrupos específicos. Se separarán fracciones bacterianas concretas mediante citometría de flujo y se estudiará la estructura taxonómica de dichas fracciones mediante secuenciación del gen ribosomal 16S utilizando librerías de clones y sanger.
2. Estudiar la variación de componentes celulares (DNA y RNA) a lo largo del ciclo celular bacteriano mediante citometría de flujo.
3. Identificar y caracterizar la fracción activa de la microbiota intestinal humana. Se separarán fracciones bacterianas concretas mediante citometría de flujo y se estudiará la estructura taxonómica de dichas fracciones mediante secuenciación del gen ribosomal 16S utilizando pirosecuenciación.
4. Estudiar las relaciones entre la microbiota intestinal humana y el sistema inmune. Se separarán fracciones bacterianas concretas mediante citometría de

flujo y se estudiará la estructura taxonómica de dichas fracciones mediante secuenciación del gen ribosomal 16S utilizando pirosecuenciación.

---

# Capítulo 3

## Material y Métodos

Esta tesis tiene un fuerte componente metodológico. Por ello, hemos hecho una descripción precisa de los métodos utilizados. En la mayoría de los casos ha supuesto una puesta a punto de los mismos, ya que no se disponía de esta tecnología en el grupo de genómica y salud del CSISP.

### 3.1. Separación de la microbiota por filogrupos.

#### Recolección y preparación de la muestra (FS).

Se recolectó una muestra de heces de un voluntario sano, en un contenedor de 30mL con rosca (25x90 mm; PP SPOON; DELTALAB), con 8mL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*, Sigma-Aldrich #P4417-100TAB) estéril. La muestra se llevó al laboratorio en menos de 24 horas y se almacenó a -80°C. Alrededor de un gramo de materia fecal fue homogeneizado mediante un vortex (2min). La suspensión fecal fue centrifugada (5.500rcf) durante 15min con el fin de sedimentar los agregados, fibras y otros restos sólidos no digeridos. El sobrenadante se pipeteó y se separó en otro tubo. Éste se centrifugó (7.500rcf) durante 2min para recoger las células microbianas de la suspensión fecal. El *pellet* se limpió dos veces en PBS (fracción FS, por “*fecal suspension*”).

## Obtención de las células desagregadas mediante gradiente discontinuo (R).

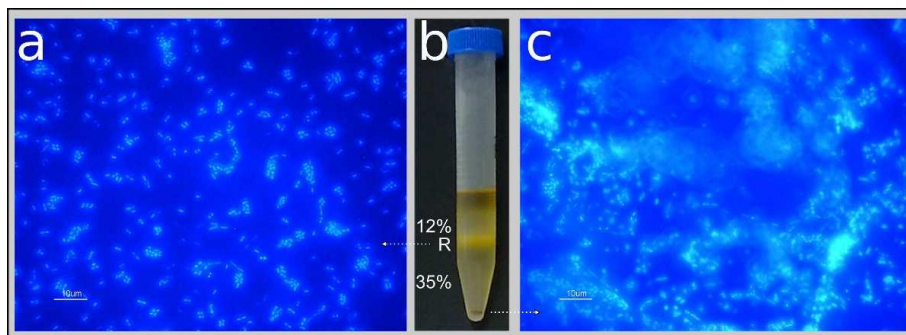


Figura 3.1: Separación mediante gradiente de densidad. En b se muestran las diferentes fases que aparecen después de la centrifugación. En a y c se muestra fotografías tomadas por microscopía de fluorescencia de células marcadas con DAPI del estrato R y el *pellet* respectivamente.

Las heces contienen materiales no digeridos, fibras y agregados que pueden bloquear la fluídica del citómetro. Con el objeto de evitarlo hemos optimizado un método de centrifugación en gradiente discontinuo. Éste nos permite obtener células bacterianas sueltas desde una suspensión fecal, eliminando así toda la fracción más gruesa y agregada. Este método ha sido empleado para la obtención de bacterias a partir de muestras de suelo (Podar et al., 2007). El gradiente utilizado está formado mediante dos fases de concentraciones distintas de Hystodenz (Sigma-Aldrich #D2158) en PBS. El gradiente se crea depositando 2ml del Hystodenz más concentrado (35 %) en la base y, muy suavemente, colocando otros 2ml al 12 % en la parte superior del anterior. Encima de estas dos fases se deposita la suspensión fecal (FS). Los dos porcentajes de Hystodenz se han fijado después de una ronda de optimización con el objetivo de encontrar las concentraciones que mejor retenían la fracción bacteriana de muestras de heces (datos no mostrados). En la Figura 3.1 está representado el fraccionamiento después de la centrifugación (4.000rcf 15min). Por encima de la fase al 12 % se encuentran restos celulares de baja densidad (a); encima de la fracción R (“Ring”) se estratifican las células bacterianas sueltas (b), exactamente lo que se necesita para trabajar en citometría; el *pellet* está formado principalmente por agregados y fibras, aunque un gran número de células sigue estando presente (c).



El PBS superior y la fase de 12 % se eliminaron cuidadosamente con una pipeta. La siguiente fase, la que está sobre el Histodenz al 35 % y que posee las células limpias, fue aspirada y depositada en un tubo de 1,5mL estéril. Se lavó dos veces con PBS y finalmente se resuspendió en PBS. La centrifugación en gradiente se realizó dos veces. Finalmente las células se limpiaron en PBS para eliminar el Histodenz residual, y se resuspendieron en 900 $\mu$ L de PBS.

### Fijación.

Una vez limpias las bacterias se fijaron con formaldehído al 4 % a 4°C durante toda la noche. Las células fijadas se limpiaron en PBS para eliminar los restos de formaldehído. Finalmente se almacenaron en etanol:PBS (50:50) a -20°C (fracción R).

### Permeabilización de la pared celular bacteriana.

Las paredes de las bacterias gram positivas pueden dificultar la entrada de las sondas al citoplasma (Sekar et al., 2003). Para mejorar la permeabilidad de éstas, la muestra se trata con lisozima (Sigma-Aldrich #L7651 aproximadamente 120 u/mg), aunque este tratamiento podría debilitar demasiado las paredes de las bacterias gram negativas. Con el objetivo de llegar a un compromiso entre el marcaje de las gram positivas y la destrucción de las gram negativas, se probaron diferentes tiempos de incubación.

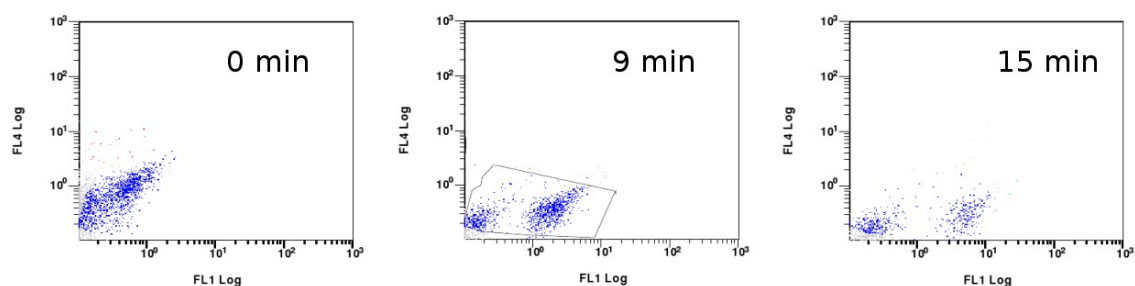


Figura 3.2: Dotplots de muestras hibridadas con sondas del 16S rRNA con diferentes tiempos de incubación con lisozima (0min, 9min, 15min).

En la Figura 3.2 se pueden observar imágenes de citometría con muestras hibridadas con sondas y diferentes tiempos de tratamiento con lisozima (0min, 9min 15min). Sin dicho tratamiento con lisozima se puede observar cómo la fluorescencia de las bacterias en el canal FL1 no se incrementa, lo que indica una escasa penetración de las sondas al interior de la célula. Con tiempos 9min y 15min se puede observar una mayor fluorescencia y una mejor hibridación. Sin embargo, a tiempo 15min también es posible observar una disminución significativa en el número de células.

Una vez optimizado el protocolo queda como sigue. Las células de la fracción R fueron permeabilizadas utilizando un tratamiento con lisozima durante 9min a 37°C. Al finalizar la incubación los tubos se enfriaron en hielo y se lavaron dos veces en PBS.

### Hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de filogrupos bacterianos (LC y HC).

Tabla 3.1: Sondas FISH utilizadas para marcar los *phyla* Firmicutes y Bacteroidetes.

Sonda	Filogrupo	Secuencia	Referencia
LGC354B	Firmicutes	CggAAgATTCCCTACTgC	(Meier et al., 1999)
Erec482	Grupo <i>Clostridium coccooides-Eubacterium rectale</i>	gCTTCTTAgTCARgTACCg	(Franks et al., 1998)
Fprau645	Firmicutes	CCTCTgCACTACTCAAgAAAAAC	(Rochet et al., 2004)
CFB560	Subgrupo de Bacteroidetes	WCCCTTTAAACCCART	(Osullivan et al., 2002)
CFB719	Mayor parte de la clase Bacteroidetes, algunas Flavobacteria y Sphingobacteria	AGCTGCCTTCGCAATCGG	(Weller et al., 2000)

Para el marcaje de Firmicutes y Bacteroidetes se utilizaron varias sondas, marcadas con el fluorocromo Cy5, que cubren la mayor parte de las especies de estos grupos (Tabla 3.1). Mediante citometría de flujo separaremos dos fracciones, una con poca señal en Cy5 “*Low Cy5*” (LC) y otra con mucha señal en Cy5 “*High Cy5*” (HC).

### Pruebas con cultivos tipo.

Se utilizaron cultivos de *Escherichia coli*, *Pedobacter aquatilis* y *Bacillus subtilis* para probar la hibridación de las sondas a utilizar. En la Figura 3.3 *B. subtilis*

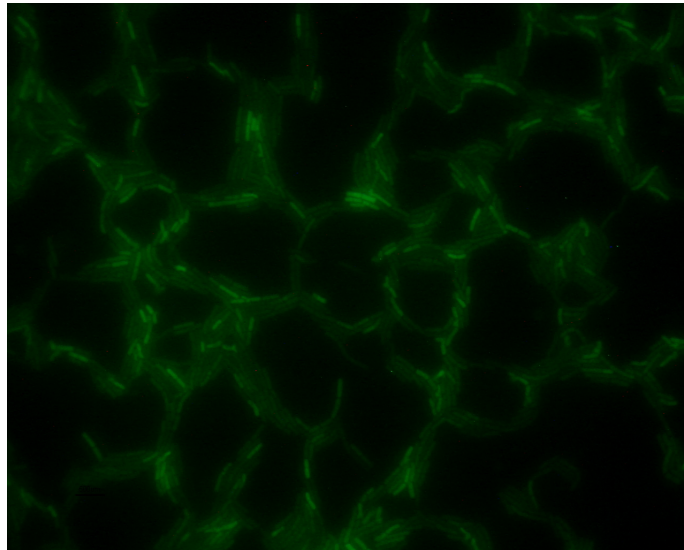


Figura 3.3: Imagen de microscopia de fluorescencia de *B. subtilis* marcado con sonda FISH con Cy3 como fluorocromo.

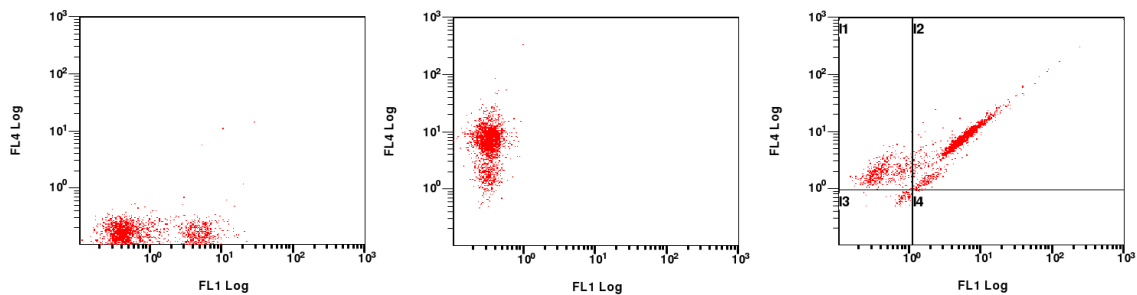


Figura 3.4: Gráficas de citometría donde el eje X representa la fluorescencia recogida en FL1 y el Y en FL4. A la izquierda cultivos de *E. coli*, *P. aquatilis* y *B. subtilis* mezclados con sondas contra Bacteroidetes y Firmicutes (FL1). En el centro, estos cultivos con sonda contra 16S rRNA de eubacterias (FL4) y a la derecha con sondas contra eubacterias (FL4) y contra Bacteroidetes y Firmicutes (FL1).

está teñido con la sonda que marca el grupo Firmicutes con el fluoróforo Cy3, mientras que en la Figura 3.4 puede observarse el marcaje mediante citometría de flujo de las tres bacterias y las sondas del trabajo.

El protocolo final queda como sigue. Las células microbianas de los pasos previos se resuspendieron en  $50\mu\text{L}$  de tampón de hibridación (Concentración final de: NaCl 0,9M; TrisHCl 0,02M; SDS 0,01 %).  $1\mu\text{L}$  ( $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de cada sonda se añadió a

la mezcla (Tabla 3.1). La hibridación se llevó a cabo durante tres horas a 56°C. Para eliminar las sondas unidas inespecíficamente, se añadió 1mL de tampón de hibridación y se aumentó la temperatura a 58°C durante 15min. Se lavó dos veces en PBS y al final se resuspendió en 1mL de PBS. Se añadió 1 $\mu$ L de pironina Y (Sigma-Aldrich #P9172, 10 mg/mL) a la muestra para la tinción del RNA y se incubó durante 20min a 4°C. Las células hibridadas y teñidas fueron limpiadas 2 veces en PBS y se resuspendieron finalmente en 50 $\mu$ L de PBS. Se almacenaron a 4°C para los siguientes pasos de citometría de flujo.

### **Tinción del RNA (PA).**

El tamaño de las bacterias es muy pequeño y en citometría de flujo es difícil diferenciarlas del ruido de fondo. Con el objetivo de resaltar las células del ruido, se realizó una tinción del RNA. Se probaron tinciones con sondas contra rRNA específico para bacterias y también con pironina Y específica de RNA. Se eligió la tinción no específica de secuencia y específica de RNA para evitar solapamiento de sondas FISH y una mayor señal. Ésta es la fracción PA (Pironina Y activa).

### **Separación de las fracciones mediante citometría de flujo.**

La fracción R, obtenida por centrifugación en gradiente discontinuo que se estratificó por encima del nivel del 35%, se ha empleado para la hibridación con sondas fluorescentes y tinción con pironina Y.

El fraccionamiento de la comunidad microbiana mediante citometría de flujo fue llevado a cabo utilizando el *MoFlo<sup>TM</sup> XDP Cell Sorter*. 1 $\mu$ L de cada muestra fue diluido en 10mL de PBS (filtrado por 0,5 $\mu$ L para la citometría de flujo). La fluorescencia emitida por la pironina Y se detectó con el canal FL2. El FL8 se utilizó para detectar la fluorescencia emitida por las sondas con Cy5.

Las células de la fracción R que contienen RNA se marcan con pironina Y y emiten fluorescencia detectable en el FL2. Todos los eventos no teñidos con pironina Y (células muertas, inactivas o en forma de espora así como los desechos) no pasaron el discriminador y se eliminaron. Un experimento control para determinar el nivel del discriminador fue llevado a cabo con muestra no teñida. Esto restringe el análisis a

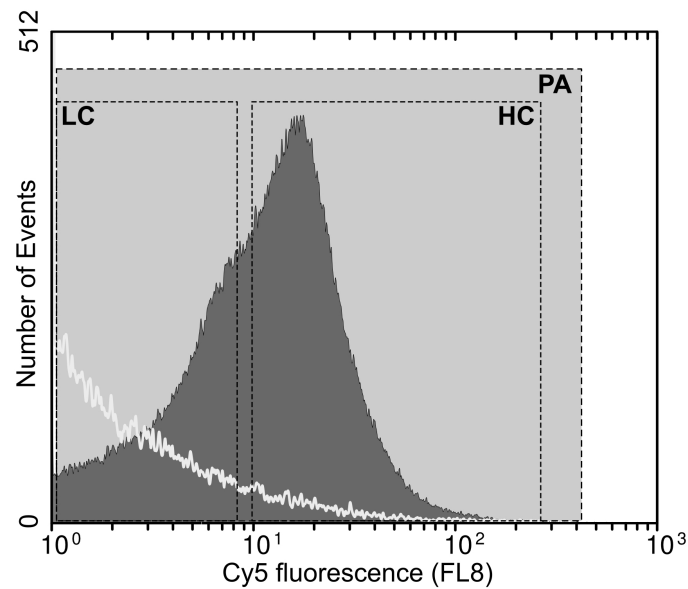


Figura 3.5: Histograma de la fluorescencia emitida por las sondas de hibridación. Los eventos están filtrados por FL2, teniéndose en cuenta sólo aquellos que tengan señal elevada en pironina Y. La línea blanca representa el perfil de los eventos de un control negativo (muestra sin marcar con sondas). En gris oscuro se puede observar la distribución de los eventos de la muestra. Mediante HC, LC y PA se marcan las ventanas (gates) utilizados en la separación (las fracciones HC y LC se separaron en un sorting y la PA en otro.).

las células con alta concentración de RNA. Se llevó a cabo un control negativo con pironina Y y no hibridado con sondas Cy5 para determinar la posición de las fracciones de células no hibridadas (LC) y las hibridadas (HC) (Figura 3.5, línea blanca). Se recogieron las tres fracciones de células: i) células marcadas con pironina Y (PA), ii) células con baja fluorescencia en Cy5 (LC), y iii) células con alta fluorescencia en Cy5 (HC). Estas fracciones se recogieron en tubos de plástico estériles para las aplicaciones posteriores (Figura 3.5, panel PA).

## Extracción del DNA.

La extracción de DNA de todas las fracciones se llevó a cabo mediante el método CTAB (Ausubel et al., 1992).

## Secuenciación Sanger.

El gen para la subunidad pequeña del ribosoma se amplificó para cada fracción utilizando los cebadores universales 27F y 1492R (Lane et al., 1991; Yakimov et al., 2004). Los productos de PCR se purificaron con las placas de filtrado “*NucleoFast® 96 PCR filter plates*” (Macherey Nagel #74310050) y se clonaron con el kit “*TOPO® XL PCR cloning kit*” (Invitrogen #K4700) siguiendo las indicaciones del fabricante.

## PCR de colonia.

Se cultivaron a 37°C 24 horas en placa en LB agar con IPTG, Xgal y kanamicina para seleccionar las colonias con plásmido e inserto y se seleccionaron las colonias blancas con las que se realizó una reacción de PCR (Tablas B.1 y B.2).

## Secuenciación.

Tabla 3.2: Fracciones utilizadas, células obtenidas y número de clones por fracción.

Fracción	Descripción	Número de células	Número de clones
FS	<i>Fecal Suspension</i>	N/A	133
R	12% - 35% del gradiente	N/A	141
PA	Células teñidas con pironina Y	113.145	181
LC	Baja fluorescencia Cy5	125.574	159
HC	Alta fluorescencia Cy5	190.008	96

N/A: No aplicable

Se determinó qué clones tenían vector mediante amplificación PCR con los cebadores M13R y M13R. Los clones positivos fueron secuenciados utilizando el kit “*BigDye Terminator V3.1*” y el cebador 27F. En la Tabla 3.2 se pueden observar el número de clones.

## Análisis bioinformático.

Las secuencias Sanger se obtuvieron en el servicio de secuenciación de la universidad de Valencia (SCSIE).

### La asignación taxonómica.

Las secuencias fueron corregidas manualmente utilizando el programa Gap4 del paquete Staden (Staden y Beal, 2000) y se comprobaron las quimeras mediante la herramienta *ChimeraCheck* de *Ribosomal Database Project* (Cole et al., 2003). La asignación filogenética fue llevada a cabo por el *RDP-classifier* del *RDP* (Wang et al., 2007). El dataset final fue desreplicado utilizando el programa CD-HIT-EST con 99 % de similaridad y el 90 % de solapamiento (Li y Godzik, 2006).

### Número de acceso de las secuencias.

Las secuencias se depositaron en la base de datos de *GenBank* con números de acceso del GU939195 al GU939593.

## 3.2. Ciclo Celular.

### Prueba de concentraciones DAPI y pironina Y.

Para estas pruebas se ha empleado la cepa de *E. coli* K12. Las concentraciones de pironina Y utilizadas son 0,2; 0,5; 1,0 y 5,0  $\mu\text{M}$ . La concentración de DAPI es de 0,24 $\mu\text{M}$ .

*E. coli* teñida en concentraciones crecientes de pironina Y no se satura al menos hasta 5 $\mu\text{M}$  (Figura 3.6). La concentración de 2 $\mu\text{M}$  es suficiente para diferenciar la población teñida de las células sin teñir. Evitar concentraciones muy elevadas disminuye las uniones inespecíficas<sup>1</sup> reduciendo también el ruido de fondo (Guilbault, 1990).

La tinción con DAPI no se ve afectada por las concentraciones de pironina Y de 0,2 $\mu\text{M}$  y 1,0 $\mu\text{M}$ , y sólo ligeramente por la concentración de 5,0 $\mu\text{M}$  (Figura 3.7). Se fija entonces a 2 $\mu\text{M}$  la concentración óptima de pironina Y ya que concentraciones superiores podrían afectar a la tinción con DAPI.

---

<sup>1</sup> Tanto a otras moléculas de la propia muestra como interacciones con otros colorantes.

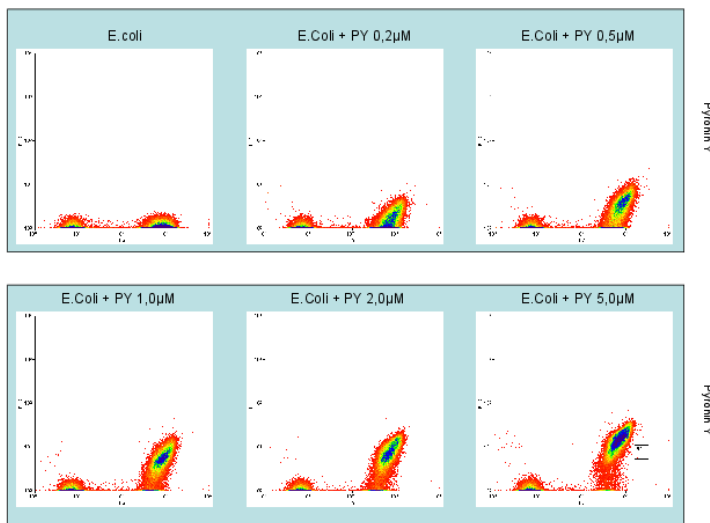


Figura 3.6: Cultivo de *E. coli* en LB durante 24 horas teñido en concentraciones crecientes de pironina Y.

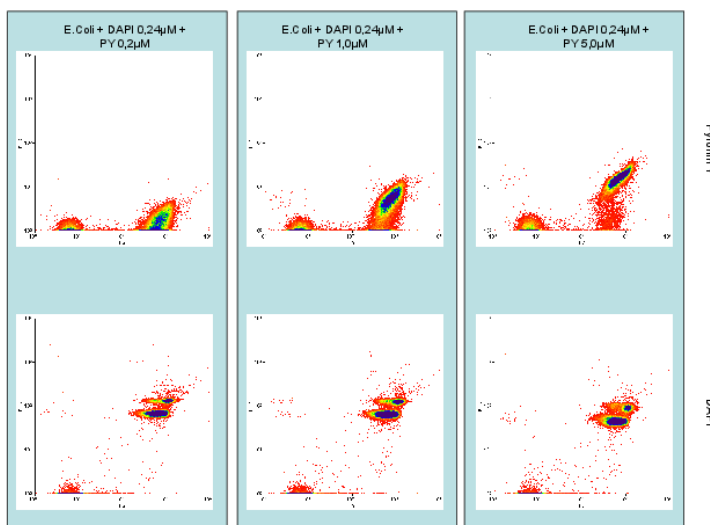


Figura 3.7: Cultivo de *E. coli* en LB durante 24 horas teñido en concentraciones crecientes de pironina Y y  $0,24\mu\text{M}$  de DAPI. Se muestran las gráficas de citometría FL2-FS (Pionina Y-Tamaño) en la parte superior y FL4-FS (DAPI-Tamaño) en la inferior.



### Tinción en otras especies.

El comportamiento de la tinción final se probó en las siguientes especies bacterianas: *Acidovorax facilis*, *B. subtilis*, *Lactobacillus spp.*, *Xanthomonas campestris*.

En la Figura 3.8 se puede observar el comportamiento de la tinción con PY-DAPI en diferentes especies bacterianas y con las mezclas de éstas a la misma OD. Pueden distinguirse diferencias de tamaño, cantidad de DNA y de RNA. En la mezcla se pueden distinguir las diferentes especies. También se observa una mayor concentración de las especies más pequeñas debido a que, para alcanzar una misma OD, éstas necesitan un mayor número de células.

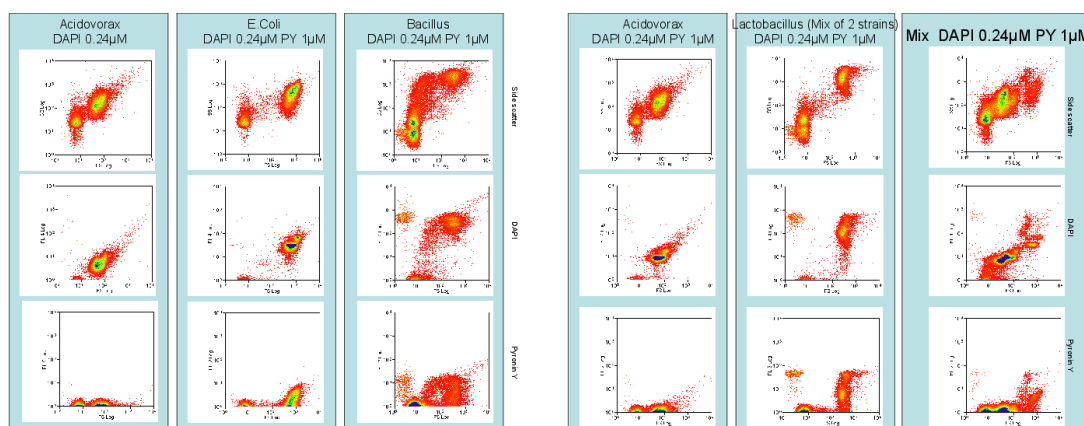


Figura 3.8: Cultivos de varias bacterias en LB durante 24 horas teñido con pironina Y y DAPI. Se muestran las gráficas de citometría del SS-FS (Complejidad-Tamaño), FL4-FS(DAPI-Tamaño) y FL2-FS (Pironina Y-Tamaño).

### Prueba de la especificidad de la pironina Y.

Se probaron diferentes tiempos de cultivo para maximizar la señal y obtener un control óptimo, para determinar el funcionamiento de la RNasa. En la Figura 3.9 pueden observarse las imágenes de citometría de las diferentes pruebas. La señal de pironina Y es mayor con 3h de cultivo. La azida sódica da una señal más homogénea teniendo en cuenta la fluorescencia en pironina Y, que podría ser debido a que la célula viva impidiese la entrada del colorante o lo bombeara fuera. El etanol modifica el tamaño de las células, pero no disminuye la señal de pironina Y, y teniendo en

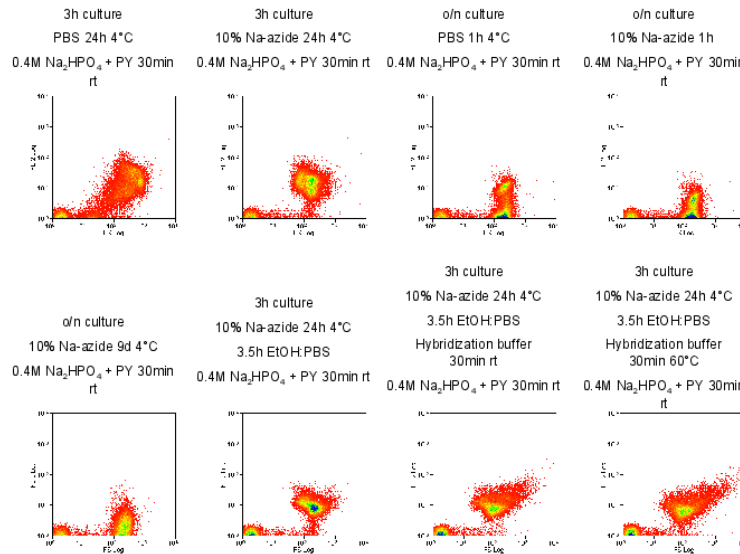


Figura 3.9: En la figura pueden observarse diferentes medios, condiciones de cultivo y fijación de *E. coli* y las gráficas FL2-FS (Pironina Y - Tamaño) de la muestra teñidas con pironina Y.

cuenta que podría ser importante para mejorar la permeabilidad de la membrana es el que finalmente se utilizó. Así, la enzima que degradará el RNA podrá entrar al interior de la célula.

En la Figura 3.10 puede observarse cómo al administrar un tratamiento de RNasa a la bacteria la señal en pironina Y disminuye considerablemente. Esto indica que no hay unión inespecífica y que la señal que se observa es debida al RNA intracelular.

### RNasa en otras especies bacterianas.

Se probó el mismo protocolo de la RNasa utilizado en *E. coli* en otras especies bacterianas. En la Figura 3.11 puede observarse cómo, al aplicar la RNasa en *Lactobacillus spp.* y *B. subtilis*, disminuye una parte de la señal mientras que la otra permanece en el mismo sitio. Esto puede ser debido a dos cosas: la RNasa no afecta a toda la población, o bien, la pironina Y se une a otra molécula que no es RNA.

En el caso de *A. facilis* (Figura 3.12) la señal que aumenta por la pironina Y no parece disminuir por la RNasa. Esta señal no es excesiva y deberían probarse

otras condiciones dónde la señal sea más alta, por ejemplo consiguiendo una mayor cantidad de RNA probando otras condiciones de cultivo, tiempos de muestreo, etc.

En la Figura 3.12 *X. campestris* parece comportarse como *E. coli*, aunque con una menor señal de partida y con un comportamiento de la señal de DAPI que también disminuye. Sería recomendable intentar conseguir una mayor señal para comprobar con una mayor confianza la hipótesis.

### Curva de crecimiento.

Se cultivó *E. coli* K12 con un plásmido con resistencia a ampicilina en 50mL de LB a 37°C con agitación. Durante 10 horas, en intervalos de una hora. A las 24 horas se recogió una muestra del cultivo, midiéndose la OD y fijándose en azida sódica. Posteriormente se almacenó a 4°C durante toda la noche.

Con cada muestra se realizó una tinción de DAPI y Pironina Y y se midió mediante citometría de flujo. Los archivos producidos por el citómetro se analizaron utilizando el programa ofrecido por la compañía del citómetro de flujo y posteriormente utilizando el paquete FlowCore y FlowViz de R (Ellis et al., 2009; Gentleman y Temple Lang, 2004; R-Team, 2010; Sarkar et al., 2008).

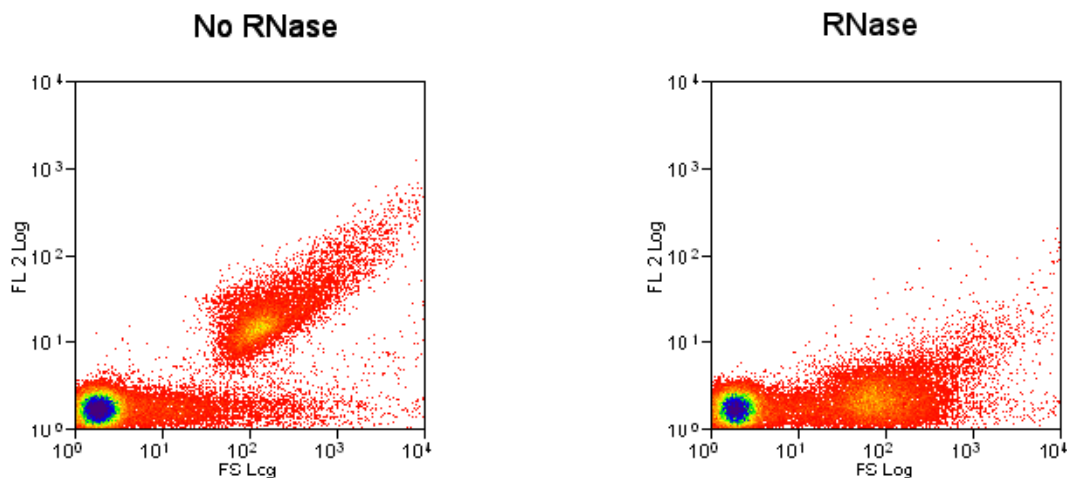


Figura 3.10: Efecto de la RNasa. Las gráficas representan la fluorescencia en pironina Y frente al tamaño.

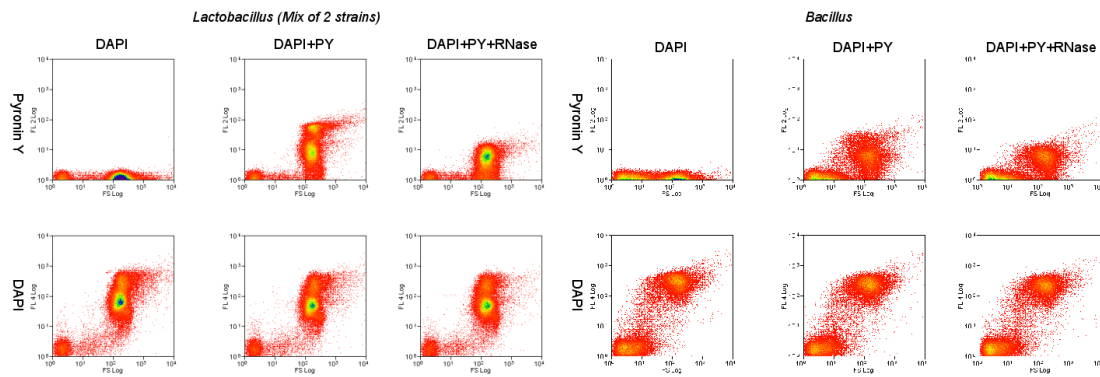


Figura 3.11: Densitogramas pironina Y - FSC (superior) y DAPI - FSC (inferior) con *Lactobacillus spp.* (izquierda) y *B. subtilis* (derecha) teñidos con DAPI (izquierda), DAPI y pironina Y (centro) y DAPI y pironina Y tratadas con RNasa (derecha).

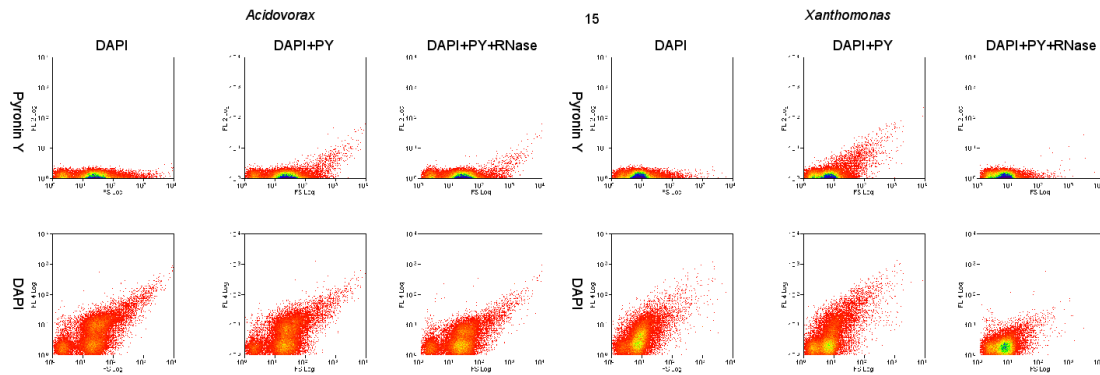


Figura 3.12: Densitogramas pironina Y - FSC (superior) y DAPI - Tamaño (inferior) con *Acidovorax facilis* y *Xanthomonas campestris* teñidos con DAPI (izquierda), DAPI y pironina Y (centro) y DAPI y pironina Y tratadas con RNasa (derecha).

### 3.3. Microbiota intestinal activa.

#### RNA en inanición y cultivo enriquecido.

Se cultivó *E. coli* en LB durante 24h y después de limpiar el cultivo en PBS se cultivó en medio M9 durante una semana. Una parte se fijó con formaldehído y se marcó con pironina Y (*E. coli* en inanición) y el resto se volvió a cultivar en LB durante 24 horas. Tras este tiempo se fijó con formaldehído y se marcó con pironina Y

(*E. coli* “recuperada”). Ambas *E. coli* marcadas se midieron mediante un citómetro de flujo (FC500) (Figura 3.13).

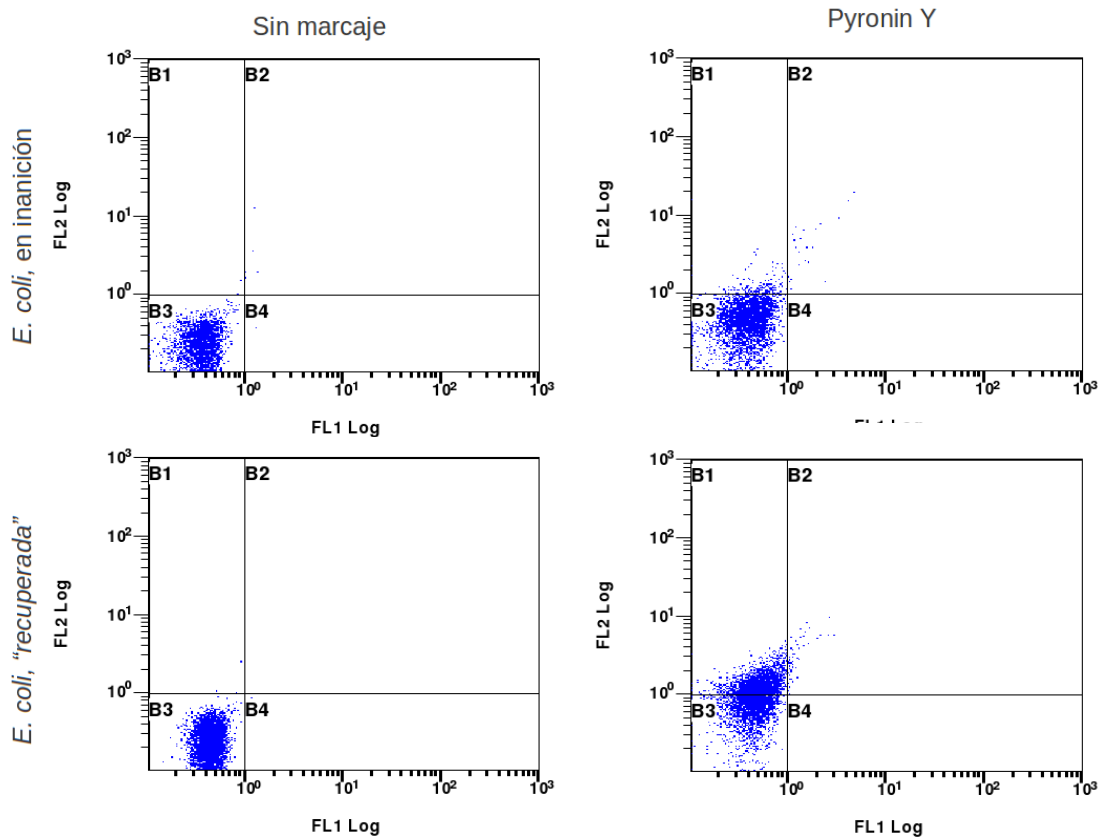


Figura 3.13: Dot-plots del experimento de inanición. El eje y (FL2) recoge la fluorescencia de la pironina Y, que marca la cantidad de RNA. La parte superior es un cultivo de *E. coli* en medio mínimo y la parte inferior un inóculo del anterior en LB. A la izquierda sin marcar y a la derecha con Pironina Y.

### Recolección y preparación las muestras (FS).

Se recogieron muestras fecales de 4 voluntarios “sanos” (3♂y 1♀) entre 25 y 35 años y residentes en Valencia y siguen una dieta mediterránea. Los voluntarios han presentado su consentimiento informado. El estudio se aprobó por el comité ético y de investigación del “Centro Superior de Investigaciones en Salud Pública” (CSISP) de Valencia, España. Ninguno de los voluntarios tenía enfermedades intestinales diag-

nosticadas, ni habían tomado antibióticos recientemente. Las muestras se recogieron en un contenedor de 30mL con rosca (25x90 mm; PP SPOON; DELTALAB), con 8mL de RNAlater (Ambion #AM7020) para preservar el RNA. La muestra se llevó al laboratorio en menos de 24 horas y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Alrededor de 1g de material fecal fue homogeneizado mediante un vórtex (2min). La suspensión fecal fue centrifugada (800rcf) durante 2min con el fin de precipitar los agregados, fibras y otros restos sólidos no digeridos. El sobrenadante se separó en otro tubo. Este se centrifugó a 7.500rcf durante 7min para recoger las células microbianas de la suspensión fecal. El *pellet* se limpió dos veces en PBS. Una alícuota de la FS se almacenó, para considerarla como control de la microbiota total de cada muestra y para describir la comunidad microbiana fecal (como las aproximaciones estándar de metagenómica).

## **Obtención de las células desagregadas mediante gradiente discontinuo (R).**

Para la obtención de la fracción bacteriana se ha empleado el protocolo basado en centrifugación en gradiente discontinuo explicado en la página 56.

## **Fijación.**

Como ya se ha explicado en la página 57, una vez limpias las bacterias, se fijaron con formaldehído al 4% a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Las células fijadas se limpiaron en PBS para eliminar los restos de formaldehído. Finalmente se almacenaron en etanol:PBS (50:50) a  $-20^{\circ}\text{C}$  (fracción R).

## **Permeabilización de la pared celular bacteriana.**

Una submuestra de  $100\mu\text{L}$  de células de la fracción R, con una densidad óptica ( $\text{OD}_{600}$ ) alrededor de 1, fue permeabilizada con lisozima, siguiendo el mismo protocolo de la página 58.

## Hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de filogrupos bacterianos (LC y HC).

La hibridación se realizó con las mismas sondas y siguiendo el mismo protocolo de la página 58. El intento de distinguir entre grupos de Firmicutes y Bacteroidetes del resto, no funcionó como se esperaba. Las sondas no hibridaron resultando una distribución indiferenciada entre HC y LC.

## Tinción del RNA (PA).

Se añadió 1 $\mu$ L de pironina Y (Sigma-Aldrich #P9172, 10mg/mL) a la muestra para la tinción del RNA y se incubó 20min a 4°C. Las células hibridadas y teñidas se limpiaron dos veces en PBS y se resuspendieron finalmente en 50 $\mu$ L de PBS. Se almacenaron a 4°C para los siguientes pasos de citometría de flujo.

## Separación de las fracciones mediante citometría de flujo.

El fraccionamiento de la comunidad microbiana mediante citometría de flujo se llevó a cabo utilizando el *MoFlo<sup>TM</sup> XDP Cell Sorter*. El filtro de emisión fue el 580/30. El trigger estaba en FL2. Los láser eran el Argon 488nm (azul) (200mW de potencia) y 635nm (rojo) diode láser (25mW power). Los láser se alinearon usando las bolitas *Flow-Check<sup>TM</sup>* (10 $\mu$ m) y *Flow-Set<sup>TM</sup>* (3 $\mu$ m) de Beckman Coulter.

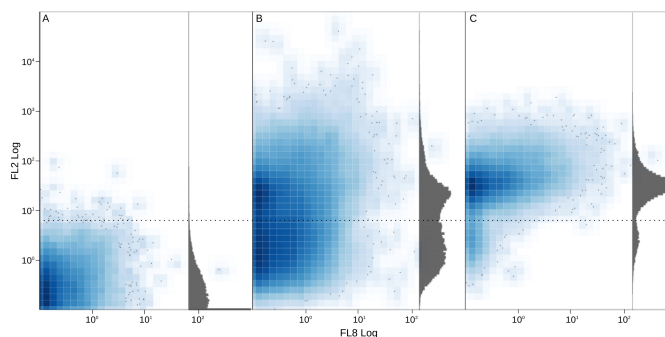


Figura 3.14: Gráficos de citometría FL2 (pironina Y) - FL8 (Cy5). A) Muestra de heces sin tinción. B) Muestra de heces con pironina Y. C) Muestra de heces con pironina Y y con el discriminador en FL2 activado para eliminar las bacterias no marcadas.

1 $\mu$ L de cada muestra fue diluido en 10mL de PBS (filtrado por 0,2 $\mu$ L para la citometría de flujo). La fluorescencia emitida por la pironina Y se detectó con el canal FL2. Se realizaron controles para determinar el nivel del discriminador con muestras sin teñir con pironina Y (Figura 3.14). Todas las partículas no teñidas con pironina Y (esporas, células inactivas o muertas y desechos) fueron discriminadas y eliminadas. Esto restringe el análisis a las células con gran concentración de RNA. Fracción llamada PA (Figura 3.14). El número de células separadas en cada fracción se reportan en la Tabla 4.1.

Intentamos separar las células teñidas con Cy5, obteniendo células sin sondas (LC) y células con sondas (HC). Todas las fracciones fueron separadas en tubos de plástico estériles para las aplicaciones siguientes.

## Extracción del DNA.

La extracción de DNA de todas las fracciones fue llevada a cabo usando el método CTAB (Ausubel et al., 1992).

## Secuenciación 454.

El 16S rDNA de cada fracción fue amplificado usando los cebadores universales 27F y 530R (Lane et al., 1991). A estos cebadores se les añadió un identificador de muestra multiplex identifier (MID) y un “PERMUTAG” (WGNGNNGW) (Peris-Bondia et al., 2011), una señal combinatoria para discriminar entre las secuencias artefacto del 454 (Niu et al., 2010). Los PERMUTAGs permiten 256 combinaciones, pudiendo así discriminar entre los productos de PCR originados desde la misma amplificación. Se trata de no eliminar las secuencias que siendo idénticas, no poseen el mismo PERMUTAG. La estructura final de cada cebador fue MID-PERMUTAG-TC(linker)-Primer (Tabla 3.3).

Los productos de PCR de cada fracción muestra se purificaron con “*NucleoFast*<sup>®</sup> 96 PCR filter plates” (Macherey Nagel #74310050), se mezclaron en concentraciones equimolares y se secuenciaron por pirosecuenciación mediante 454 (Roche) en 1/8 de placa (*Titanium chemistry*).



Tabla 3.3: **Multiplex Identifiers (MIDs) list**

MID	Secuencia
MID1	TAACCAACC
MID2	TAACCGGAA
MID3	TAACCTTCC
MID4	TAAGCCGAA
MID5	TAAGCGGAT
MID6	TAAGGTTCC
MID7	TAATACGCC
MID8	TACACCACA
MID9	TACATCTCT
MID10	TACAGACTC
MID56	TGAAGTGCA
MID57	TGACAGAGT
MID58	TGAGATGTG
MID59	TGAGTGACA
MID60	TGATCTGCA
MID61	TGCAACGAA
MID62	TGCATAATG
MID63	TGCCGTAAT
MID64	TGCGGTTAT
MID65	TGCTACCAA

Estructura final.

Forward:

MID - WGNGNNGW (Permutag) - TC (linker) - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG  
(Forward Primer (Lane et al., 1991))

Reverse:

MID - WGNGNNGW (Permutag) - TC (linker) - CCGCGGCKGCTGGCAC  
(Reverse Primer, (Lane et al., 1991))

### **Análisis bioinformático y estadístico.**

Cada fracción fue inicialmente desreplicada usando software CDHIT (Li y Godzik, 2006) para eliminar las lecturas con la misma longitud de secuencia, considerando el Permutag como parte de la secuencia. Los MIDs y las PERMUTAGs fueron elimina-

dos dejando una base de datos de 42.582 lecturas limpias con una longitud media de 492 nucleótidos. La asignación filogenética fue llevada a cabo con software desarrollado *ad-hoc* en nuestro laboratorio y basado en el algoritmo de *last common ancestor* (LCA) (disponible en la página web <https://github.com/emepyc/Blast2lca>).

El análisis descriptivo y estadístico fue llevado a cabo con el paquete estadístico R (R-Team, 2010).

El análisis de la varianza (Tabla 4.2) se realizó con una tabla normalizada de taxonomía, teniendo las muestras en filas y columnas. Se calcularon las distancias de Bray-Curtins. La matriz obtenida fue usada para realizar el análisis de la varianza seguido por varios criterios de agrupación. “ACTIVAS vs TOTALES” muestra los análisis de la varianza, donde las fracciones ACTIVAS son aquellas que han sido marcadas con pironina Y (PA, LC y HC) y las fracciones TOTALES son FC y R.

De la lista ordenada por abundancia de las familias se tomó el valor del punto de inflexión como valor límite para distinguir entre las bacterias sobrerrepresentadas (ORB) y las infrarepresentadas (URB). Los datos de distribuciones relativos a las fracciones activas (HC, LC y PA) y a las fracciones totales (R y FS) se resumieron y los valores de las medias se utilizaron para realizar el *Welch Two Sample t-test* con una adaptación de la *Student's t-test* al uso con muestras con varianzas diferentes.

Los datos de citometría de flujo fueron analizados usando los paquetes de R flowCore y flowViz de Bioconductor (Ellis et al., 2009; Gentleman y Temple Lang, 2004; R-Team, 2010; Sarkar et al., 2008).

### Número de acceso de las secuencias.

Las secuencias están depositada en la base de datos “*Sequence Read Archive*” del NCBI con el número [SRP005393](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRP005393).

## 3.4. Microbiota intestinal opsonizada con Inmunoglobulina A.

### Recolección y preparación de las muestras.

Se recibió muestra a diferentes días (0,3,10,13) de un enfermo sospechoso de colitis asociada a *Clostridium difficile*. En el día 3 el paciente empezó un tratamiento con antibióticos de amplio espectro que duró hasta el día 10. Alrededor de 1g de material fecal fue homogeneizado mediante un vórtex (2min). La suspensión fecal fue centrifugada (800rcf) durante 2min con el fin de precipitar los agregados, fibras y otros restos sólidos no digeridos. El sobrenadante se separó en otro tubo. Éste se centrifugó (7.500rcf) durante 7min para recoger las células microbianas de la suspensión fecal. El *pellet* se limpió dos veces en PBS. Una submuestra de la suspensión fecal FS se almacenó, para considerarla como control de la microbiota total de cada muestras y para describir la comunidad microbiana fecal<sup>2</sup>.

### Fijación.

Se procedió como en la página 57.

### Marcaje de las células opsonizadas con IgA.

Se marcó con SYTO62<sup>®</sup> el DNA de la muestra con el objetivo de separar las bacterias del ruido de fondo. Para marcar las IgA se utilizaron Ig anti IgA humana marcadas con un fluoróforo (Invitrogen, *Catalog Number* 62-7411). Para delimitar el marcaje específico se utilizó un control isotipo<sup>3</sup> que consiste en un marcador de las mismas características pero con *target* diferente, en este caso anti-mouse (Invitrogen, *Catalog Number* M31001). En la Figura 3.15 puede observarse como la muestra sin marcar no superar más que en casos puntuales la fluorescencia de 1.000. El control de isotipo se separa un poco de la base y la muestra marcada con Ig anti IgA humana supera en las máximas concentraciones el nivel del isotipo.

<sup>2</sup> Como las aproximaciones estándar de metagenómica.

<sup>3</sup> Típico de inmunología.

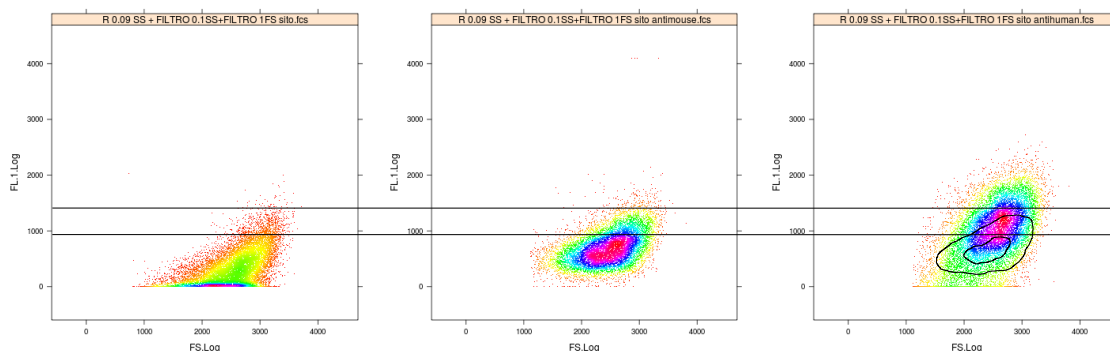


Figura 3.15: Density plots donde se muestran el tamaño (FS.Log) y la fluorescencia (FL1.Log) de los eventos de la muestra sin marcar, el control isotipo IgA-antimouse y el IgA-antihuman.

## Separación de las fracciones mediante citometría de flujo.

El fraccionamiento de la comunidad microbiana mediante citometría de flujo se llevó a cabo utilizando el *MoFlo<sup>TM</sup> XDP Cell Sorter*. El filtro de emisión para recoger el FITC fue el 520/30 (FL1) y para el SYTO62<sup>®</sup> el 680/30 (FL4). El trigger estaba en el *Side Scatter*. Los láser eran el Argon 488nm (azul) (200mW de potencia) y 635nm (rojo) diode láser (25mW power). Los láser se alinearon usando las bolitas *Flow-Check<sup>TM</sup>* (10 $\mu$ m) y *Flow-Set<sup>TM</sup>* (3 $\mu$ m) de Beckman Coulter.

## Extracción del DNA.

La extracción de DNA de todas las fracciones fue llevada a cabo usando el método CTAB (Ausubel et al., 1992).

## Secuenciación 454.

La secuenciación se llevo a cabo mediante el protocolo de la página 72. En este caso los MIDs añadidos fueron como los de la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: **Multiplex Identifiers (MIDs) list**

MID	Sequencia	Tiempo (Días)	Fracción
MID1	TCGCTTCCTATC	0	FS
MID2	TCTAATGCGCTC	3	FS
MID3	TCGCTGCTTGTC	10	FS
MID4	TCTACGAACCTC	13	FS
MID5	TCGGATAACGTC	0	IgAPos
MID6	TCTAGCGGAATC	3	IgAPos
MID7	TCGGCGTTATTC	10	IgAPos
MID8	TCTAGGTACCTC	13	IgAPos

Estructura final.

Forward:

MID - TC (linker) - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (Forward Primer (Lane et al., 1991))

Reverse:

MID - TC (linker) - CCGCGGCKGCTGGCAC (Reverse Primer, (Lane et al., 1991))

### **Análisis bioinformático y estadístico.**

Se han utilizado las herramientas descritas en la página 73.



---

## Capítulo 4

# Resultados y desarrollo argumental

### 4.1. Separación de la microbiota por filogrupos.

#### 4.1.1. Introducción.

Como ya hemos dicho en la introducción, la microbiota intestinal humana presenta una enorme diversidad y, al igual que otras comunidades microbianas, posee una distribución de especies característica. Unos pocos grupos filogenéticos son muy abundantes y el resto, presentes en bajo número, muestran una diversidad enorme. Los Firmicutes y los Bacteroidetes, son los *phyla* mayoritarios y cuentan con una abundancia media de aproximadamente el 70% del total de la microbiota. Esto ha provocado que en los primeros muestreos<sup>1</sup> se obtuviesen principalmente secuencias de estos grupos mayoritarios. La alta dominancia de estos grupos, junto con el desconocimiento del resto y la gran proporción de especies no cultivables, llevó a postular hipótesis basándose en su proporción relativa. Un ejemplo de ello es la correlación de la proporción de Firmicutes/Bacteroidetes con la obesidad (Ley et al., 2005).

Sin embargo, los taxones que están presentes en bajo número representan un reservorio de información genética desconocido hasta el momento. Su interacción con el hospedador humano puede jugar un papel significativo.

---

<sup>1</sup> Contaban con cientos de secuencias en el mejor de los casos.

Recientemente, algunos desequilibrios en la microbiota (disbiosis) se han asociado a un gran abanico de problemas en la salud. Enfermedad inflamatoria intestinal (Collins et al., 2009), obesidad (Sanz et al., 2008), enfermedades atópicas, varias formas de colitis (CAMPIERI, 2001; Guarner y Malagelada, 2003) e incluso autismo (Finegold, 2008) han sido asociados a alteraciones en la microbiota o a alteraciones en su interacción con el sistema inmune (Furrie et al., 2006). En cuanto a la obesidad, Turnbaugh y colaboradores observaron una mayor proporción de Actinobacteria que normalmente está presente en bajo número y una menor cantidad de Bacteroidetes (Turnbaugh et al., 2009a).

También las enfermedades inflamatorias intestinales, la colitis ulcerosa y la *pouchitis* han sido relacionadas con cambios en la microbiota gastrointestinal. Por ejemplo, un incremento de bacterias anaerobias gram negativas ha sido considerado como una microbiota potencialmente “dañina” (Tamboli, 2004).

Para estudiar un grupo que esté en baja proporción en una comunidad se puede aumentar el esfuerzo de secuenciación, o bien, se puede fraccionar y secuenciar los grupos obtenidos por separado.

Con las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, alcanzar un gran número de secuencias no es una tarea complicada. Aún así la realización de “16S rDNA gene surveys”, utilizando PCR, acarrea distorsiones en la proporciones de las poblaciones raras (Gonzalez et al., 2012).

Como hemos visto, el 16S rRNA es el gen más utilizado para los estudios filogenéticos. Marcando este gen, mediante sondas fluorescentes, se pueden diferenciar Firmicutes y Bacteroidetes del resto de grupos bacterianos (Amann et al., 1995).

Utilizando citometría de flujo, objetivo del presente capítulo, separaremos físicamente los grupos y posteriormente secuenciaremos el 16S rDNA para observar la estructura poblacional de cada fracción.

#### **4.1.2. Objetivos.**

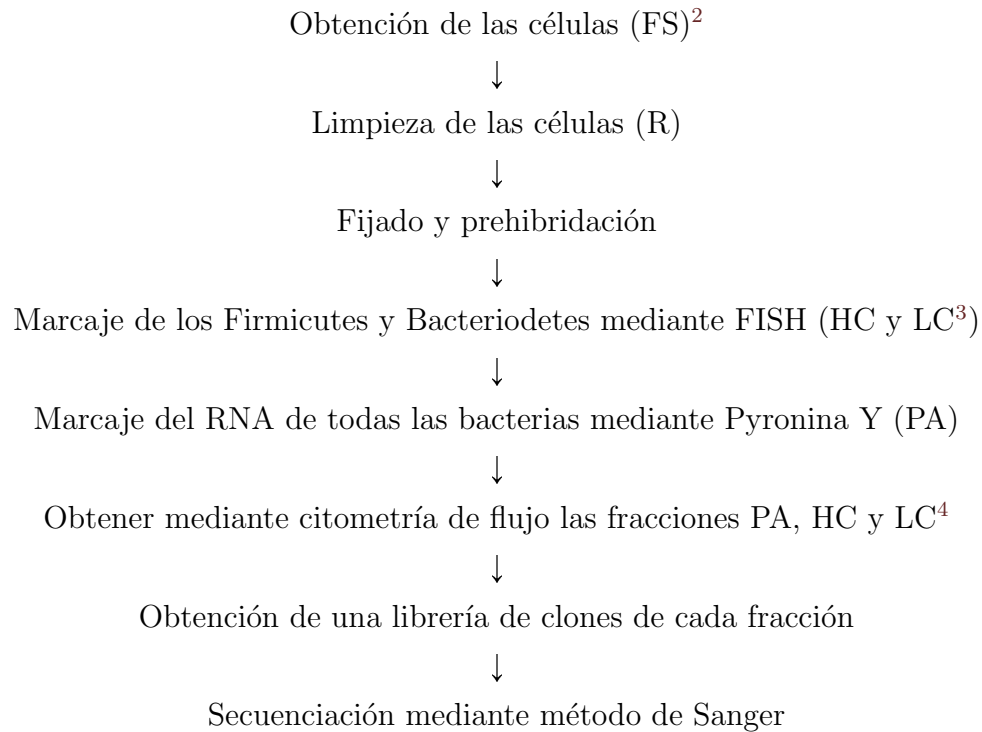
En éste capítulo planteamos dos objetivos:

1. Desarrollar y optimizar técnicas de citometría de flujo para poder separar subpoblaciones deseadas de la microbiota gastrointestinal.



2. Caracterizar, así, la fracción minoritaria de la microbiota intestinal.

### Esquema final de trabajo.



### 4.1.3. Resultados.

Las dos primeras librerías de clones, obtenidas desde el producto de PCR (gen 16S rDNA) del DNA extraído directamente desde FS y R, no presentan diferencias importantes al comparar sus distribuciones de secuencias (Figura 4.1). Como es típico, en las distribuciones taxonómicas obtenidas de muestras fecales humanas, los grupos Firmicutes y Bacteriodetes son los predominantes. Aunque la cobertura de las librerías de clones obtenidas no es muy alta, se pueden observar un número pequeño de filogrupos minoritarios. El abordaje de estudio aplicado a la fracción FS

<sup>2</sup> Entre paréntesis se muestra la “fracción” que se obtiene en este paso y que será secuenciada.

<sup>3</sup> La fracción LC se obtendrá porque las células no quedarán marcadas con la sonda.

<sup>4</sup> La muestra procesada en el paso anterior se separa en dos fracciones. De la de la primera se obtiene la fracción PA y de la segunda se obtienen las fracciones HC y LC. Siendo en total dos pasos de citometría de flujo.

es el protocolo normalmente empleado en la mayoría de los estudios de diversidad de comunidades microbianas.

La librería de clones de 16S rDNA realizada a partir de las fracciones separadas por citometría cuya emisión estaba en el rango de la pironina Y (fracción activa, PA) mostraba un incremento en el número de clones relacionados con Proteobacteria (desde aprox. 0% hasta el 22%), y una reducción de la abundancia de Firmicutes y Bacteroidetes (Figura 4.1).

El fraccionamiento de células híbridadas con sondas específicas para ORB nos ha permitido profundizar en los detalles de distribución taxonómica de las bacterias sobre-representadas y, por primera vez, en las distribuciones de las bacterias infra-representadas. Se obtienen dos fracciones, LC y HC, la primera con baja emisión en Cy5, contiene principalmente URB (Figura 3.5 panel LC), y la segunda, que contiene células con alta fluorescencia en Cy5, mayoritariamente contiene células de los ORB (Figura 3.5, panel HC).

La fracción LC recogió alrededor del 73% de los clones relacionados con Proteobacteria, mientras que Firmicutes y Bacteroidetes se obtuvieron en menor medida (23%). También se obtuvieron secuencias de otros filogrupos en esta fracción como OD1, Actinobacteria y Crenarchaeota. La diversidad de Proteobacterias fue también alta, con la identificación de al menos un clon de 2, 4 y 5 diferentes familias de Alpha-, Beta- y Gammaproteobacteria respectivamente. Al contrario de lo que se observa en la fracción LC, la fracción HC agrupa la mayoría de las células que emiten Cy5 y, como es de esperar, éstas son bacterias que pertenecen a los grupos Firmicutes (70%) y Bacteroidetes (11%). Además, en esta fracción también se encontró un 14% de Proteobacteria.

En las fracciones PA y LC encontramos al menos 14 familias de Proteobacteria,

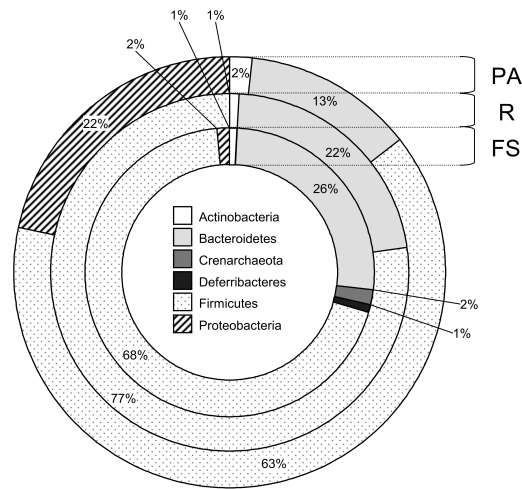


Figura 4.1: Distribución de los *phyla* encontradas en las fracciones FS, R y PA.

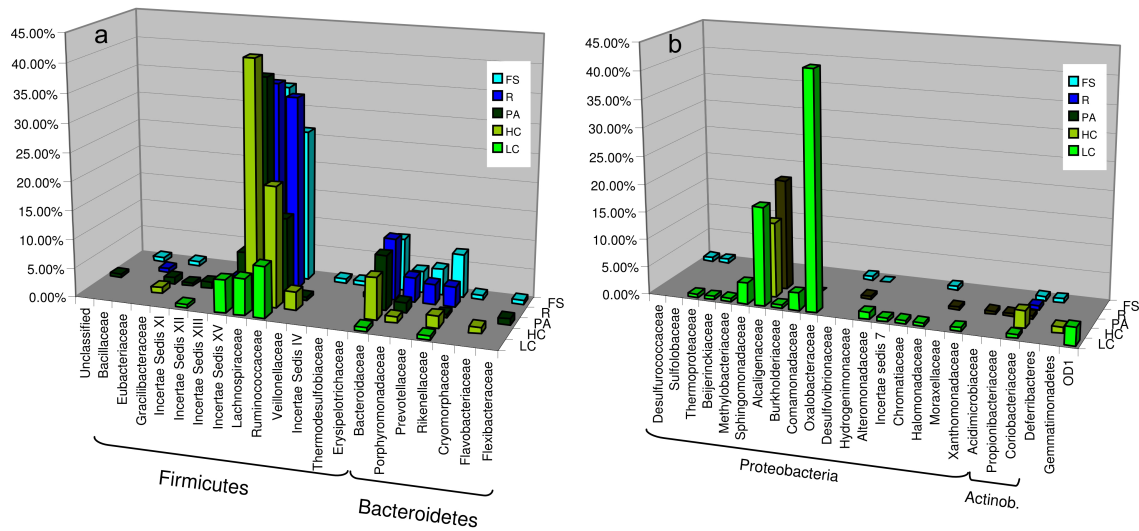


Figura 4.2: Composición a nivel de familia de cada fracción (color). En el panel a se muestran los *phyla* más representados y en el panel b los menos abundantes.

que contrasta con los dos clones encontrados en la fracción FS. También hay que destacar la disminución de Bacteroidetes (13.6%) y Firmicutes (5.1%), así como el incremento en Proteobacteria (20.1%) cuando comparas las fracciones FS y PA. Dentro de Bacteroidetes, las Prevotellaceae y Rikenellaceae son las dos familias que sufren la reducción más grande (Figura 4.2 a). Sobre los Firmicutes, al menos 4 familias, que previamente se observaban a baja concentración, desaparecen por completo, mientras que dentro de Clostridiales se observa una menor cantidad de Ruminococcaceae (Figura 4.2 a). Por otro lado, muchas familias se hacen visibles cuando la selección está basada en RNA (fracción PA). Por ejemplo, dentro de los Firmicutes, se observa un incremento del número de clones relacionados con Incertae Sedis XI, XII, XIII, XV, y Veillonellaceae. Además, dentro de Betaproteobacteria, aparece una población dominante formada casi exclusivamente por Alcaligenaceae cuando se considera la fracción activa PA (Figura 4.2 b).

El resultado más destacable es que el método empleado ha permitido encontrar en la fracción LC muchos grupos taxonómicos pertenecientes a bacterias infra-representadas (Figura 4.2 b). Los clones pertenecientes al *phylum* Proteobacteria están relacionados con 12 familias, particularmente Alteromonadaceae, Alcaligenaceae, Comamonadaceae, Oxalobacteraceae y Sphingomonadaceae. También se han

encontrado muchas familias representadas solamente por un clon: Beijerinckiaceae, Burkholderiaceae, Chromatiaceae, Halomonadaceae, Incertae Sedis 7, Methylobacteriaceae y Xanthomonadaceae. Cabe destacar que de todas estas familias, ninguna aparece en las fracciones FS y R, en las cuales no se ha aplicado el método de separación por niveles de actividad. Otro de los grupos poco representados pertenece a los *phyla* de Crenarchaeota, Actinobacteria y OD1.

#### 4.1.4. Discusión.

Como es típico en las muestras fecales humanas, los grupos Firmicutes y Bacteroidetes son los predominantes. Sin embargo, y a pesar de que la cobertura de estas librerías de clones no es muy alta, se puede observar un número pequeño de estos filogrupos.

Aunque la microbiota intestinal humana está claramente dominada por Firmicutes y Bacteroidetes y se asume que tienen un papel importante en la homeostasis la relevancia funcional no está necesariamente relacionada con la dominancia numérica y los grupos que están en poco número pueden jugar un papel fundamental. Por ello creemos importante desarrollar métodos como el aquí presentado para detectar y enriquecer subgrupos específicos y de interés, para poder aplicar más adelante otras metodologías de estudio específicas sobre ellos, como por ejemplo metatranscriptómica o metagenómica.

El protocolo de separación por gradiente elimina de impurezas la muestra. Sería de esperar que este proceso afectara a la distribución observada de especies, debido a diferencias en la agregación de bacterias, en la unión a partículas y de densidad, por poner algunos ejemplos. Sin embargo en nuestros resultados no observamos diferencias significativas de la muestra sin procesar con la muestra limpia mediante histodenz. En la página 99 puede observarse esta misma comparación pero con un mayor número de muestras y secuencias.

La fracción PA<sup>5</sup> y las fracciones R y FS son distintas. La cantidad de RNA se puede correlacionar con la actividad (Kemp et al., 1993a) y de esta forma la fracción PA puede considerarse como la parte activa de la microbiota. Esta cuestión se desarrolla con mayor profundidad en los siguientes capítulos.

---

<sup>5</sup> La fracción PA tiene el RNA marcado con PY.

Es de destacar que la separación por filogrupos no ha sido perfecta<sup>6</sup>, el enriquecimiento en grupos no-Firmicutes-Bacteriodetes ha sido notable, permitiendo encontrar una gran diversidad con un mínimo esfuerzo de secuenciación.

**Errores y limitaciones conocidas.** Cabe destacar dos tipos de errores debidos a la hibridación. Por un lado, la hibridación inespecífica, que incluiría no-Firmicutes-Bacteriodetes en la fracción HC, y por otro las bacterias que no se han marcado, que introduciría Firmicutes-Bacteriodetes en la fracción LC. Según los objetivos del estudio podría eliminarse alguno de los errores a costa del otro.

**Desarrollo futuro.** Se está trabajando en la optimización y mejora en la detección de los eventos por citometría en relación con la emisión de fluorescencia y especificidad de los fluorocromos. Esto ayudará a desarrollar experimentos de metagenómica, metatranscriptómica o proteómica de grupos específicos, lo que sin duda permitirá una mayor precisión a estos estudios. Además no habrá que depender de estudios filogenéticos para asignar a grupos las secuencias obtenidas<sup>7</sup>, ya que de esta forma se podrá obviar por ejemplo sucesos de transferencia horizontal.

---

<sup>6</sup> Han aparecido Firmicutes y Bacteriodetes en las fracciones donde no se esperaban.

<sup>7</sup> Binning.

## 4.2. Ciclo celular.

### 4.2.1. Introducción.

En un sentido muy general, nuestro conocimiento sobre la fisiología bacteriana está limitado, en gran parte, a las especies que se pueden cultivar, ya que es muy difícil evaluar las condiciones fisiológicas de comunidades naturales complejas.

Hace unos años, la observación conocida como “*The great plate count anomaly*”<sup>8</sup> llevó a Staley y Konopka (1985) a proponer que no somos capaces de cultivar la mayoría de los microorganismos. Las nuevas tecnologías de secuenciación lo están confirmando en la actualidad, ya que la mayoría de las secuencias de 16S rDNA que aparecen continuamente en las bases de datos pertenecen a especies no cultivables. Rappé y Giovannoni (2003) estimaron que al menos en la mitad de los *pyhla* bacterianos conocidos no existe ninguna especie cultivable. Eckburg et al. (2005) reportaron, estudiando la microbiota del tracto gastrointestinal, que el 80 % de las secuencias pertenece a filotipos que no han sido cultivados.

Otro problema en el estudio de la fisiología bacteriana en comunidades naturales complejas, es que las bacterias tienen una gran capacidad de dispersión y es probable que lleguen a lugares donde no puedan encontrar las condiciones fisicoquímicas compatibles con su crecimiento y desarrollo. Es más, las bacterias pueden sobrevivir en lugares donde las condiciones ambientales no son estables. O simplemente están obligadas a sufrir los cambios de los ciclos naturales<sup>9</sup> (Auldrige y Forest, 2011; Lenz y Søggaard-Andersen, 2011; Pando y van Oudenaarden, 2010). Esto indica que las bacterias no están siempre creciendo en condiciones óptimas, y cuando están expuestas a condiciones realmente adversas para su metabolismo, la única alternativa a morir es entrar en un estado de inactividad o resistencia. De hecho, como ya hemos visto, podemos encontrar un 20 % de las bacterias en el intestino, un 50 % en el agua, o incluso un 80 % en el suelo en estado no activo (Lennon y Jones, 2011). Por ello, simplemente encontrando DNA de una bacteria en un lugar dado, no es un dato suficiente para saber si está activa o en qué manera lo está. Además el comportamiento

---

<sup>8</sup> *The great plate count anomaly* describe el hecho por el cual solamente una pequeñísima parte de todos los microorganismos que se pueden observar bajo el microscopio en una muestra dada crecen en una placa de cultivo.

<sup>9</sup> diarios, estacionarios, ...

de un microorganismo en un ambiente natural no es sólo dado por sus capacidades genéticas, sino que está también bajo el efecto de otras variables como la interacción con el ambiente o con otros organismos de la misma comunidad (Hammerstrom et al., 2011; Livorsi et al., 2011; Reis et al., 2011). Günther et al. (2009) mostró como las bacterias que acumulan fosfato en condiciones de laboratorio no tienen la misma función en condiciones naturales. De hecho, se observó que la acumulación de fosfato la realizaban otras bacterias (Figura 4.3).

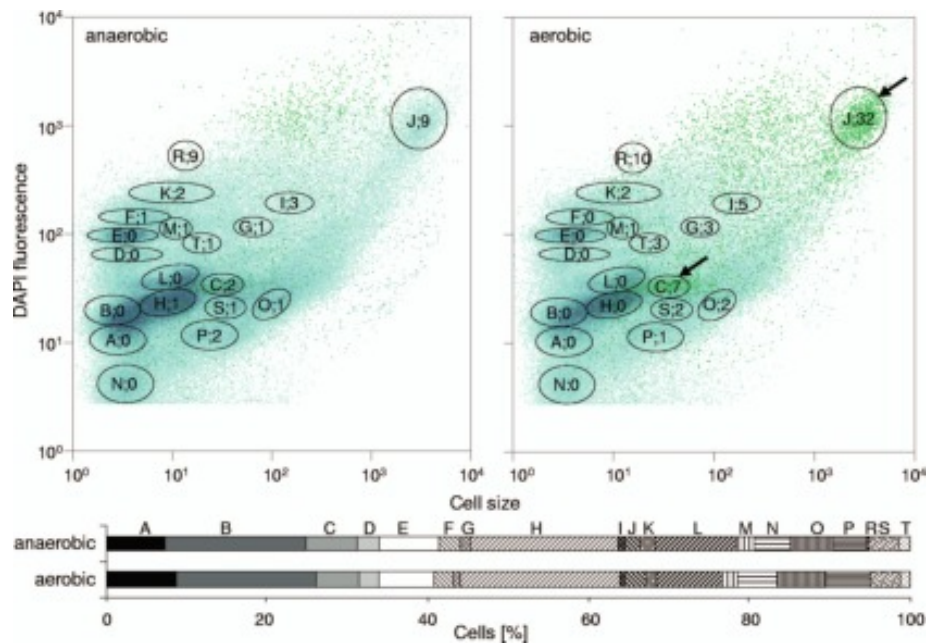


Figura 4.3: Patrón de distribución de DNA y organismos acumuladores de fosfatos (puntos verdes) (Günther et al., 2009).

Desde el comienzo de la microbiología la mayoría de los estudios de fisiología bacteriana estaban, y aún están, basados en curvas de crecimiento. Las curvas de crecimiento nos permiten observar cambios de actividad y han sido usadas desde siempre para predecir la velocidad y condiciones óptimas de crecimiento, máximos de biomasa, utilización de nutrientes y otras características útiles para campos como la microbiología alimentaria, procesos industriales e incluso la salud humana (Buchanan et al., 1997; Science et al., 1990).

Clásicamente, el crecimiento bacteriano ha sido principalmente estudiado midiendo parámetros como la tasa de duplicación, el máximo número de células, el número

de colonias, etc. Estos datos han sido usados para construir modelos matemáticos y predecir el comportamiento bacteriano bajo diversas condiciones. A menudo, bajo un análisis más profundo, se ha observado la aparición de subpoblaciones y heterogeneidad en cultivos originados a partir de un único clon bacteriano (Shank y Kolter, 2011), lo que aumenta la dificultad para modelizar y predecir.

En un intento de resolver esta complicación se han utilizado cultivos sincrónicos para mantener todas las células en el mismo estado de crecimiento. Este método permite llevar a cabo experimentos cuantitativos sobre toda la población (Brostrom y Binkley, 1969; Noack et al., 2008), que son trasladados al caso de células únicas. De todas formas, se ha visto que la sincronía sólo puede mantenerse un número finito de generaciones (Müller et al., 2010). Es más, este tipo de aproximación puede llevarnos a aceptar conclusiones que pueden no corresponder con el crecimiento real *in vivo*. Es interesante, pues, poder estudiar la fisiología bacteriana independientemente de la heterogeneidad en los cultivos.

Como ya hemos dicho anteriormente, la citometría de flujo es un método que permite calcular varios parámetros por cada célula de una población y puede ser utilizado para obtener datos fisicoquímicos de miles de células por segundo (Shapiro y Leif, 2003). Esto permite medir directamente, sin introducir sesgos ni estimaciones, la composición de comunidades complejas. Alguno de los parámetros que se pueden medir simultáneamente es la concentración de componentes microbiano como el DNA, RNA o las proteínas (Lomas et al., 2011; Molin y Givskov, 1999).

En este capítulo usamos la citometría de flujo para describir el crecimiento bacteriano típico y observar como varía la cantidad de DNA y de RNA en el interior de cada una de las células del cultivo. Durante el crecimiento de cultivos puros de varias bacterias se ha seguido su OD<sup>10</sup> y se ha medido mediante citometría la cantidad de proteínas DNA y RNA en intervalos regulares de 2h hasta alcanzar la fase estacionaria. Esta aproximación nos ha permitido tener una visión clara de la dinámica de subpoblaciones que ocurre a lo largo del crecimiento bacteriano.

---

<sup>10</sup> Densidad Optica, “*Optical density*”.



### 4.2.2. Objetivos.

1. Desarrollar protocolos de ensayos de parámetros fisiológicos en células individuales.
2. Observar la existencia de subpoblaciones a lo largo del crecimiento de una bacteria desde un clon aislado.
3. Comprobar la eficiencia de la pyronina Y como marcador de actividad.
4. Observar dinámicas de subpoblaciones en distintas especies bacterianas basadas en contenido de biomasa y actividad.

### 4.2.3. Resultados.

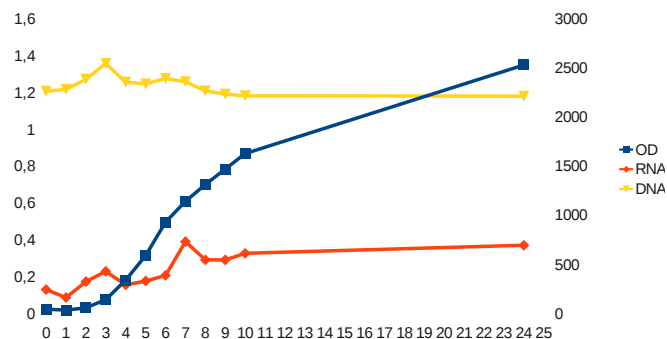


Figura 4.4: Variación de diferentes parámetros durante el crecimiento de *Escherichia coli* en LB a 37°C. El eje X representa el tiempo en horas. El eje izquierdo Y mide la densidad óptica del cultivo. El eje derecho Y recoge la fluorescencia media en unidades arbitrarias de RNA (Pyronina Y) y de DNA (DAPI).

El análisis de la turbidez durante el crecimiento bacteriano de *E. coli* (Figura 4.4 línea azul) muestra cómo hay un aumento exponencial en el número de células a partir de la segunda hora. A las 24 horas parece haber alcanzado la fase estacionaria<sup>11</sup>. La abundancia relativa de DNA de todo el cultivo, medida con el citómetro como fluorescencia media de todas las células, muestra un pico alrededor de la hora 3 y

<sup>11</sup> Aunque no podamos decirlo con certeza por la falta de medidas tomadas alrededor de las 24h.

otro menor alrededor de la 6 (Figura 4.4 línea amarilla). Esta tendencia también la podemos encontrar en la fluorescencia del RNA (Figura 4.4 línea naranja). Mientras que el contenido de DNA medio por célula vuelve al final a valores iniciales, el RNA permanece en valores mayores que al principio.

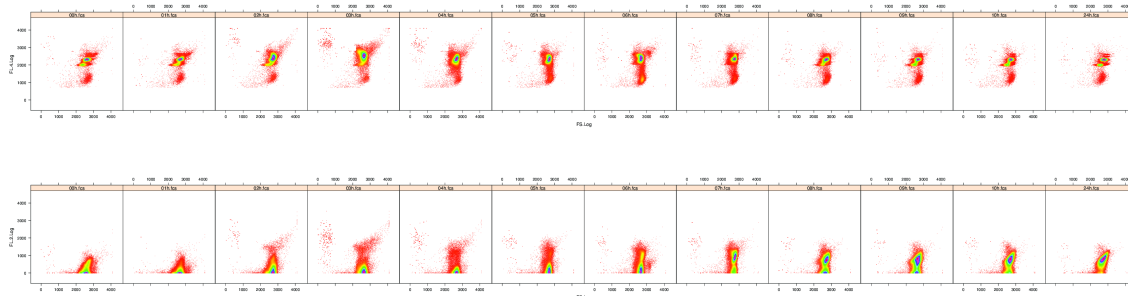


Figura 4.5: Densitogramas DAPI - FS en la parte superior (DNA-Tamaño) y Pyronina Y - FS en la parte inferior (RNA-Tamaño) de cada muestra durante el crecimiento de *Escherichia coli* en LB a 37°C.

En las Figuras 4.5 y 4.6 puede verse la evolución de la cantidad de DNA-Tamaño y RNA-Tamaño y RNA-DNA, respectivamente, de cada célula durante el crecimiento bacteriano. Así, mientras que la media da una idea de homogeneidad, la observación de los densitogramas revela que no todas las células tienen el mismo comportamiento. En el DNA (Figura 4.5) el patrón observado al inicio se recupera al final, después de pasar por subpoblaciones con mayor cantidad de fluorescencia y con valores más distribuidos. El marcaje del RNA (Figura 4.5) empieza en un nivel bajo. En las primeras horas aparece un pequeño subgrupo con muy alta fluorescencia. El resto va aumentando poco a poco hasta la hora 7, donde aparece una población muy grande con fluorescencia media. Esta se mantiene como predominante<sup>12</sup> hasta el final. Para estudiar numéricamente estas subpoblaciones dividimos los densitogramas (Figura 4.5). El DNA lo dividimos en cuatro regiones, dos que corresponden con las subpoblaciones discretas principales observables al principio y al final de la curva, y otras dos que recogen la parte inferior y superior de éstas<sup>13</sup>. El RNA se dividirá en 3 regiones, la de menor fluorescencia (L), que corresponde con las fases iniciales del

<sup>12</sup> Aunque bajando ligeramente la fluorescencia.

<sup>13</sup> En total 4 (1-4).

crecimiento; la de mayor fluorescencia (H), de las fases intermedias, y la media de las fases finales (M). Pueden observarse las regiones definidas en la Figura 4.6.

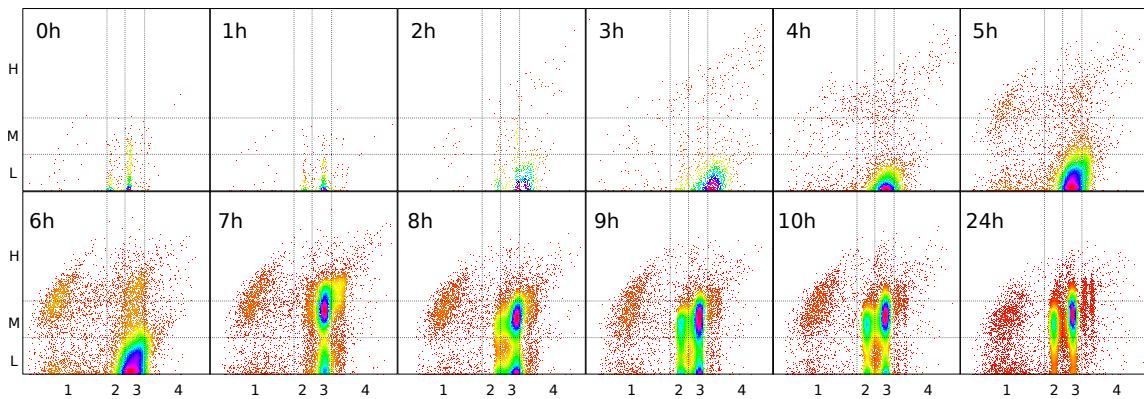


Figura 4.6: Densitogramas Pyronina Y - DAPI (RNA-DNA) de cada muestra durante el crecimiento de *Escherichia coli* en LB a 37°C. El número de eventos de cada hora que se muestra es proporcional a la OD de cada hora. Cada densitograma está dividido en sectores que intentan recoger las subpoblaciones discretas principales.

La fluorescencia media de RNA de cada región permanece en la mayoría constante excepto en las H<sup>14</sup> (Figura 4.7 izquierda). En las fases iniciales la mayoría de las células están en la región 3L, pasando rápidamente a dominar la 4L por un corto periodo de tiempo. Al final, y de forma gradual, van dominando las que aparecen en la región 3M. Las regiones 1M y 1H pasan de ser prácticamente nulas, a aumentar un poco entre las horas 5 y 7, para terminar volviendo a los valores iniciales. En la región 2, al comienzo del crecimiento, la mayoría de eventos tienen poca fluorescencia en pyronina Y (principalmente L). Con el tiempo el porcentaje respecto a las otras regiones va disminuyendo poco a poco para aumentar a partir de la hora 7, terminando con valores iniciales pero con un valor de fluorescencia de pyronina Y medio (región M) (Figura 4.7 derecha).

<sup>14</sup> El límite superior es más alto e intenta recoger todo. Además, el menor número de eventos en estas regiones hace que el cambio en una célula tenga un peso mayor.

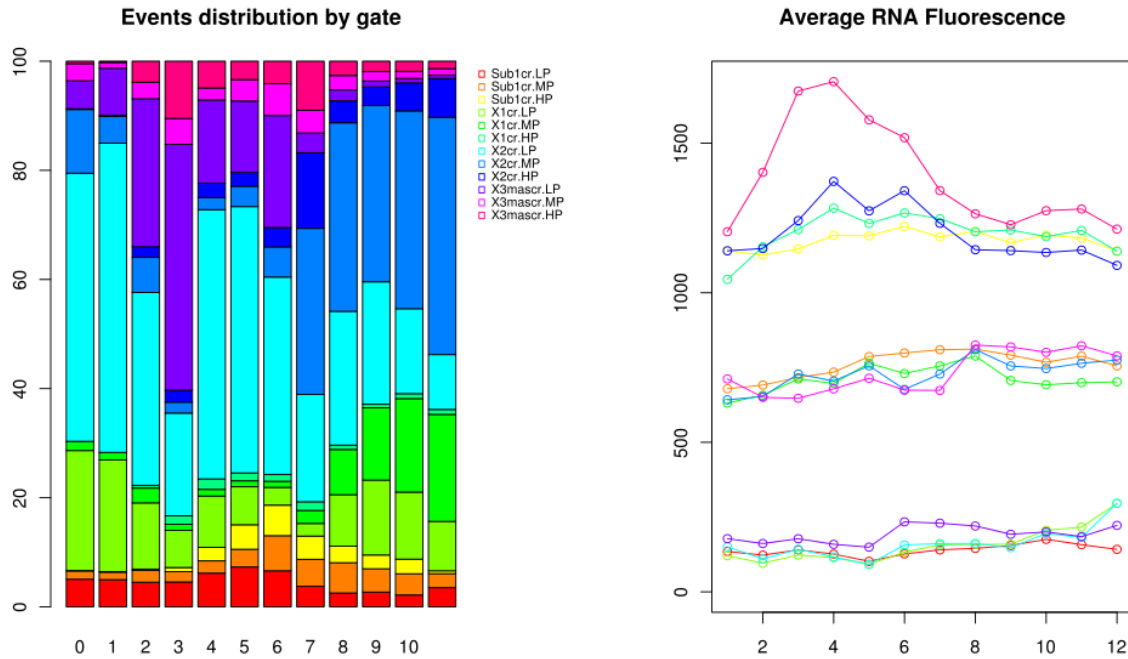


Figura 4.7: Distribución de las células por regiones. Cada barra representa las diferentes horas durante el crecimiento bacteriano. Cada región representa cada una de las regiones de la figura anterior. Media de la fluorescencia de Pyronina Y (RNA) de cada región.

#### 4.2.4. Discusión.

Las medias de fluorescencia de DNA y RNA aumentan rápidamente al inicio de la fase exponencial para, a las pocas horas, bajar. Podríamos pensar, observando estas medias, que las células dejan de crecer, pero la turbidez de todo el cultivo sigue aumentando. Aparece un nuevo pico más acusado en el RNA, del que podríamos esperar un aumento de la actividad y el crecimiento del cultivo, aunque no parece que éstos se disparen. Esto, en cambio, podría ser debido a un cambio en la expresión de las bacterias.

Durante el crecimiento bacteriano se ha comprobado que el número de cromosomas por célula en fase log es de alrededor 2,1 (Bremer et al., 1996). Por lo tanto asignamos este número de cromosomas a la media de fluorescencia de DNA en fase

log. En fase estacionaria<sup>15</sup> el número de cromosomas en cada bacteria será un número entero, por lo que podrían reconocerse grupos discretos de intensidad de fluorescencia mediante citometría (Akerlund et al., 1995). Esto es lo que podemos observar en la Figura 4.5.

Al inicio del crecimiento pueden verse, en cuanto a DNA, dos grupos discretos principales, que pueden ser bacterias con una o dos copias del genoma bacteriano. Se observan algunas poblaciones más pequeñas de bacterias con tres y con cuatro cromosomas (Figura 4.5). Desde la primera a la tercera hora, la cantidad de DNA en cada bacteria aumenta, y después parece disminuir, probablemente, por una mayor número de bacterias que se han dividido.

Si observamos el RNA (Figura 4.5), de unos niveles muy bajos en el inicio, hay una pequeña subpoblación que eleva mucho su cantidad de RNA. Esta subpoblación está formada por bacterias con dos o más cromosomas. En la hora 2 son un 5% del total de la población, hasta llegar a ser un 20% en la hora 7. Son éstas las que tendrán una mayor producción de proteínas. Este suceso podría explicarse si la maquinaria para la replicación del DNA está presente incluso en las células inactivas y que aumentara la expresión del RNA<sup>16</sup> al inicio de la replicación del DNA. Una vez la célula posee cantidades de RNA suficientes, empezaría a fabricar proteínas para introducir más nutrientes del exterior e iría aumentando la cantidad de elementos necesarios para la división celular. Estos tipo de estudios pueden realizarse en cultivos sincronizados y midiendo cantidades globales de estos metabolitos, pero utilizando citometría de flujo evitamos manipular el cultivo para que esté sincronizado.

La aparición más intensa en las primeras seis horas de células con bajo nivel de RNA podría deberse a que las primeras células, al dividirse, repartieran el RNA entre sus células de manera desigual, o bien que en este tipo de cultivos los primeros recursos se hubiesen agotado y entraran en fase inactiva de nuevo. En la hora 7 la gran mayoría de células aumenta a un nivel medio su cantidad de RNA y podría ser debido a un cambio en el metabolismo por la utilización de otros recursos<sup>17</sup> Este estado podría obtenerse a partir de recursos con los que la bacteria es menos eficiente, pero permite mantener un mayor número de células con 2 cromosomas y un nivel de

<sup>15</sup> Donde no hay crecimiento bacteriano.

<sup>16</sup> Sobretudo del rRNA, que está próximo a los inicios de replicación.

<sup>17</sup> O alguna señal de "quorum sensing".

RNA medio.

La población con fluorescencia de DNA menor que lo que corresponde a un cromosoma puede ser debido a que se ha teñido peor o que en realidad tiene menos DNA. Éste último caso puede ser debido a que la pérdida del plásmido con resistencia al antibiótico ocasiona que el DNA de la célula sea degradado antes de morir. Cuando empiezan a aparecer células activas, con alto o medio nivel de RNA es cuando disminuye un poco la cantidad de células con el DNA degradado, es decir, cuando una célula sin plásmido se activa es cuando le hace efecto el antibiótico y muere (Levin y Rozen, 2006).

Este tipo de estudios pueden aportar mucha información tanto para estudiar en poblaciones clonales, la aparición de subpoblaciones bacterianas con estados fisiológicos diferentes, como para comprender mejor estos patrones en comunidades naturales, o en bacterias no cultivables. Sin embargo, sería necesario realizar réplicas que confirmaran los resultados.

## 4.3. Microbiota intestinal activa.

### 4.3.1. Introducción.

En los últimos años se ha ido poniendo de manifiesto que en las poblaciones naturales no toda la microbiota está metabólicamente activa (Lennon y Jones, 2011). Este concepto se puede extender también a la microbiota gastrointestinal humana. Una parte de los microorganismos encontrados en el intestino humano entra con la comida, resiste el paso por el tracto digestivo y, sin necesidad de realizar ninguna función específica, puede esperar a salir al exterior para seguir con su ciclo vital. Es más, algunas hipótesis sobre la composición de las comunidades microbianas complejas indican que las especies menos abundantes para poder mantenerse en la comunidad, tienen que estar constantemente en estado activo, mientras que las más representadas solamente lo están en un rango estrecho de condiciones, crecen rápido y entran en fase de resistencia o latencia con variaciones medioambientales mínimas. Simplemente saber cuáles de todas las bacterias presentes en un medio están activas podría ayudarnos a entender mejor el funcionamiento de comunidades bacterianas complejas como la que alberga el tracto gastrointestinal humano (Jones y Lennon, 2010).

El estudio de comunidades microbianas naturales ha sido abordado clásicamente mediante métodos dependientes de cultivo. Como ya hemos visto anteriormente, las técnicas moleculares independientes de cultivo, que en los últimos años están siendo aplicadas, permiten identificar la composición de especies de una comunidad basándose, generalmente, en la presencia de DNA. La secuenciación de transcritomas permite acceder, no solo a qué genes o especies hay presentes, sino también a las actividades desarrolladas por la microbiota de una muestra. El estudio del gen ribosomal 16S, usando como molde el cDNA obtenido desde la retrotranscripción del rRNA permite, por ejemplo, definir las bacterias supuestamente activas en el momento de su extracción.

La mayoría de los estudios que abordan el problema de la diversidad microbiana del tracto gastrointestinal describe las distribuciones bacterianas en heces utilizando el análisis directo del DNA, como las librerías de 16S rDNA o la metagenómica (Hattori y Taylor, 2009; Hsiao y Fraser-Liggett, 2009; Peterson et al., 2009). Estas

aproximaciones no permiten diferenciar entre bacterias activas, inactivas o muertas (Burtscher y Wuertz, 2003; Córdova-Kreylos et al., 2006). Analizando el RNA presente en muestras naturales se encuentran diferencias significativas con respecto a las aproximaciones basadas en el DNA (Daffonchio et al., 2006; Gentile et al., 2006; Josephson et al., 1993). Por ejemplo, Lennon y Jones (2011) han observado que alrededor del 80 % de las bacterias de comunidades gastrointestinales están activas.

La comparación entre secuenciación directa del DNA con la del RNA hay que tomarla con precaución. Los niveles de expresión de RNA pueden variar y el número de copias de los transcritos de los genes ribosomales en cada especie también varía. Además, al ser diferentes los métodos de obtención del metatranscriptoma y del metagenoma se introduce aún más variabilidad entre las comparaciones a realizar, produciendo unos importantes sesgos en los resultados y en su interpretación. Lo ideal sería secuenciar mediante una aproximación directa por DNA pero conociendo *a priori* el estado fisiológico en que cada célula se encuentra.

Como hemos demostrado anteriormente, la citometría de flujo, permite tener una visión del estado fisiológico de las bacterias. Si se aplican estos conocimientos al estudio de comunidades complejas, es posible llevar a cabo análisis diferenciales que aporten información sobre las poblaciones activas, inactivas o muertas.

La citometría de flujo y el fraccionamiento de células, basándose en la integridad de membrana, se ha aplicado para cuantificar bacterias viables, dañadas y muertas en muestras fecales (Ben-Amor et al., 2005). Además, se han usado otros métodos como la utilización de compuestos que varían su fluorescencia para determinar que bacterias están activas o no en un medio (Sherr et al., 1999). La mayoría de los estudios que diferencian células vivas de células muertas se basan en protocolos que miden la integridad de las membranas (Alonso et al., 2002). En muchos casos la simple manipulación de las muestras, desde la recolección hasta el procesamiento, puede causar alteraciones debidas a congelación/descongelación, fijación, etc.

La cantidad de RNA intracelular ha sido usada como indicador de actividad (Kemp et al., 1993a). Trabajos previos han mostrado que la relación entre contenido de RNA y actividad estaban influenciados por la temperatura de observación y por la presencia de detritos que podía alterar la medida (Dell'Anno et al., 1998; Jeffrey et al., 1996; Kemp et al., 1993b). La temperatura afecta principalmente a la eficien-



cia del ribosoma, es decir, a mayor temperatura mayor eficiencia del ribosoma. La microbiota intestinal no se ve afectada por variaciones en la temperatura debido a que crece en un medio a 37°C de forma constante. Además, los protocolos de recogida de muestras contemplan siempre algún método de fijación o preservación del RNA (glutaraldeído, paraformaldeído, RNALater, etc.). La citometría de flujo, al realizar las medidas célula a célula y en alto número de eventos, no se ve afectada por los detritos y se puede fijar la cantidad de los componentes celulares al momento de la recogida. Como se ha explicado anteriormente, el uso de la pyronina Y es un método de tinción del RNA válido y puede ser empleado fácilmente en citometría.

### 4.3.2. **Objetivos.**

Este capítulo pretende estudiar la fracción activa de la microbiota intestinal humana. Concretamente:

1. Establecer un protocolo de separación por citometría de flujo de la fracción activa de muestras de heces humanas.
2. Estudiar la composición bacteriana de cada fracción obtenida mediante pirosecuenciación.
3. Definir si la fracción activa es distinta de la fracción total a la que se accede con los métodos clásicos de análisis taxonómico de comunidades bacterianas.

## Esquema de trabajo.

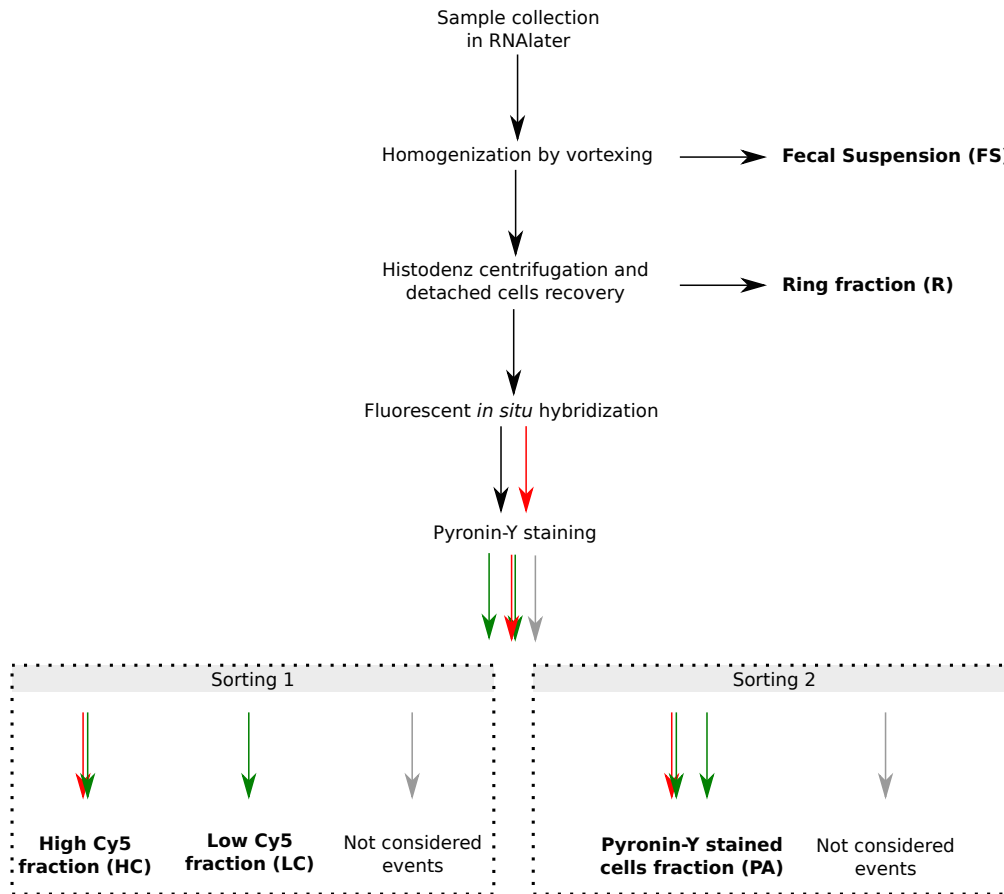


Figura 4.8: Esquema del trabajo.

### 4.3.3. Resultados.

Tabla 4.1: Número de células obtenidas por fracción mediante citometría de flujo.

Muestra	Fracción	Número de células
1	PA	366.637
	LC	55.440
	HC	363.219
2	PA	38.555.405
	LC	2.732.462
	HC	30.272.597
3	PA	29.773.688
	LC	3.404.025
	HC	13.391.699
4	PA	6.834.332
	LC	2.685.887
	HC	2.952.656

Mediante citometría de flujo se pudieron separar las fracciones activas y las fracciones marcadas con sonda fluorescentes relativas a los grupos mayoritarios de Firmicutes y Bacteroidetes. En la Tabla 4.1 se reportan el número de células obtenidas por cada fracción.

#### Secuencias obtenidas.

De las cuatro muestras, se obtuvieron alrededor de 2.000 secuencias por fracción (Figura 4.9, panel A), excepto en las fracciones totales de la muestra 4. En el panel B se puede observar la cantidad de secuencias que poseen un mismo valor de similaridad con la secuencia más cercana en la base de datos. Esto proporciona un patrón que parece característico para cada muestra.

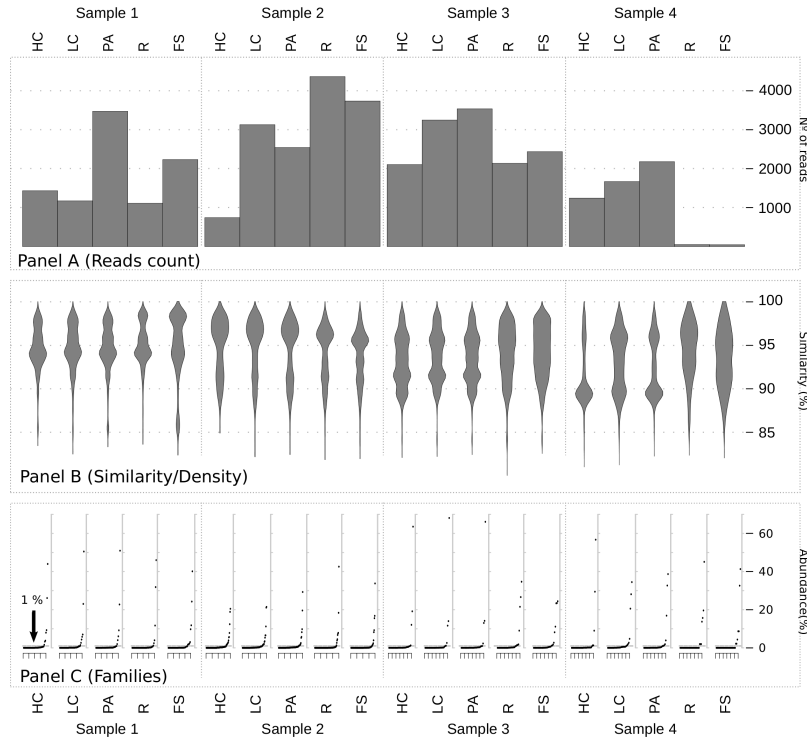


Figura 4.9: Visión general de los resultados de secuenciación. Fracciones activas : PA, *pyronin Y* activated; LC, *low Cy5*; HC, *high Cy5*. Fracciones totales: FS, *Faecal Suspension*; R, *Ring*. El panel A muestra el número de lecturas obtenidas de cada muestra/fracción. El panel B muestra los “*violin plots*”, donde el ancho de la barra representa la abundancia de lecturas con una similitud determinada respecto a la secuencia más parecida en la base de datos. El panel C muestra el porcentaje de distribución ordenado de las familias de cada muestra/fracción, siendo el “1%” el punto de inflexión medio utilizado para definir las categorías URB y ORB.

En el análisis de rarefacción Figura 4.10, llevado a cabo a nivel de familia, se puede observar que las curvas aún no han llegado al *plateau*. Cabe destacar que, a nivel de familia, en prácticamente todas las muestras, observamos cómo las fracciones totales (FS y R) tienden a alcanzar el *plateau* antes que las fracciones activas (HC, LC, PA).

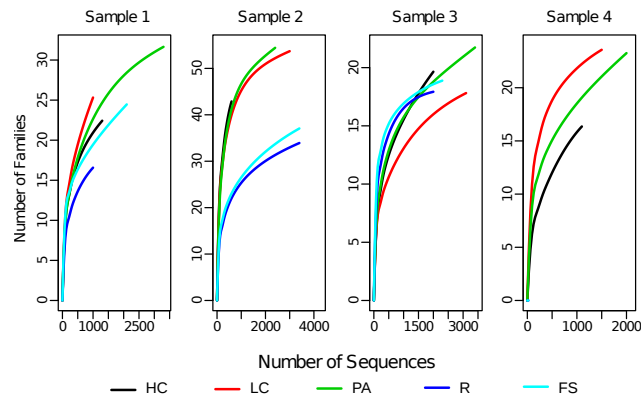


Figura 4.10: Curvas de rarefacción a nivel de familia.

### Visión general de las especies obtenidas

Todas las muestras revelan distribuciones de dominancia comparables (Tabla C.1).

Tabla 4.2: Análisis de la varianza

SourceVar	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
ACTIVAS vs TOTALES	1,00	0,31	0,31	6,66	0,17	$9^{10-4}$ ***
MUESTRAS	3,00	0,82	0,27	5,83	0,45	$9^{10-4}$ ***
FRACCIONES	3,00	0,11	0,04	0,77	0,06	0,69
Residuals	12,00	0,57	0,05		0,31	
Total	19,00	1,81			1,00	

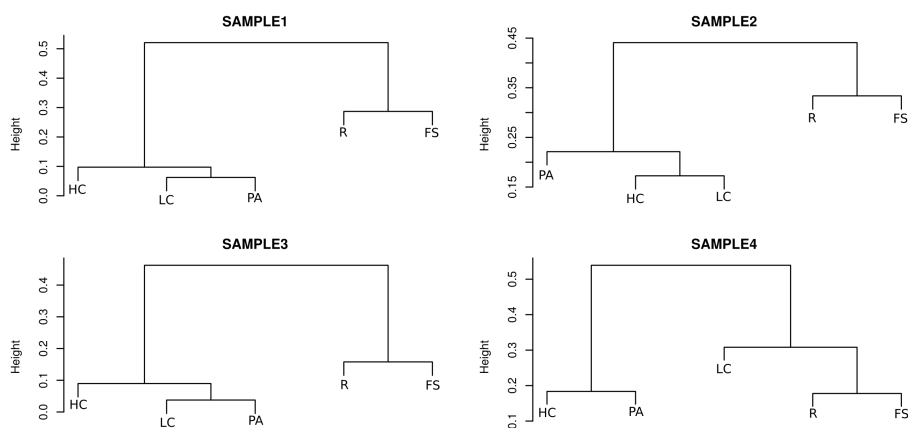


Figura 4.11: Algoritmo de agrupamiento de las abundancias de familias normalizadas de cada una de las fracciones de cada muestra, obtenido utilizando la distancia Bray-Curtis y el método “complete agglomeration”.

El análisis estadístico determinó que las muestras son significativamente diferentes, así como las fracciones activas frente a las totales (Tabla 4.2). Dentro de cada muestra las fracciones FS y R se agrupan (Figura 4.11).

La Figura 4.12 muestra las distribuciones de *phyla* entre las fracciones total y activa. Mirando los taxones principales, los Bacteroidetes están más representados en las fracciones totales, mientras que Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria lo están en las fracciones activas. Una visión más detallada de la distribución de las familias se muestra en la Figura C.2.

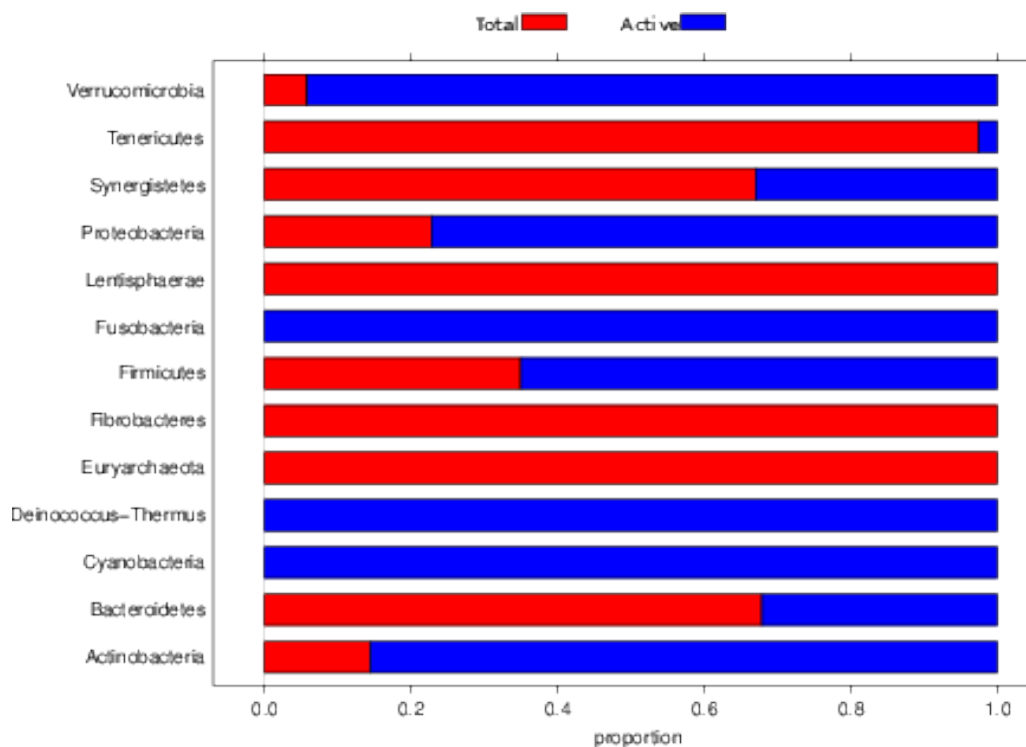


Figura 4.12: Distribución de *phyla* entre fracciones totales (FS y R) y activas (HC, LC, y PA).

De todas las secuencias, se han identificado 79 familias diferentes pertenecientes a 13 *phyla*. La mayoría de las secuencias pertenecen al *phylum* Firmicutes (86,43%), seguido por Bacteroidetes (9,34%), Proteobacteria (1,51%), Actinobacteria (1,26%), y otros. Sin embargo, 15.735 lecturas de 42.582 (35,99%) pertenecen a familias no clasificadas.

Considerando todas las muestras, 46 de las 79 familias se han encontrado en las fracciones totales (fracciones FS y R) mientras que 73 se han identificado en las fracciones activas (HC, LC y PA).

#### 4.3.4. Discusión.

En panel B de la Figura 4.9 se puede observar cómo los patrones obtenidos son más parecidos entre fracciones de la misma muestra que entre muestras diferentes.

Esto puede utilizarse como una especie de “test” visual para determinar el origen de una fracción.

Los test estadísticos nos confirman los resultados anteriores. Resaltan la alta variabilidad encontrada entre diferentes muestras como se ha visto en multitud de artículos (Ahmed et al., 2007; Eckburg et al., 2005; Green et al., 2006). Por otro lado resaltan el mal fraccionamiento de las muestras por grupos filogenéticos. Una posible explicación para ello es que la mejora en la limpieza de las células llevó a utilizar una concentración muy superior de bacterias, mientras que el número de sondas no se aumentó. Quedando, por tanto, la mayoría de bacterias sin marcar. Este posible problema se ha optimizado sucesivamente introduciendo mejoras en los nuevos protocolos de FISH.

El análisis de rarefacción nos muestra que si siguiésemos muestreando encontraríamos nuevas familias. Esto evidencia la riqueza y la diversidad de la microbiota gastrointestinal (Eckburg et al., 2005; Gill et al., 2006; Qin et al., 2010; Stark y Lee, 1982).

El *plateau* más bajo de las fracciones FS y R indica que con el mismo esfuerzo de secuenciación somos capaces de detectar mayor diversidad de taxones en las fracciones activas. Éstas deben estar presentes en las fracciones totales, pero en una proporción muy baja que requeriría de un número mayor de secuencias para ser detectadas.

El valor de dominancia similar entre fracciones es un indicio de que el proceso de separación por filogrupos no funcionó correctamente. Sin embargo, si tenemos en cuenta las fracciones obtenidas a partir de células teñidas con pironina Y, poseen una distribución de secuencias más similares entre ellas que con las muestras totales.

Hemos visto que, entre los taxones principales, Bacteroidetes está en menor número en las fracciones activas, lo que podría ser debido a que, al ser microorganismos anaerobios estrictos, cualquier exposición al oxígeno hiciera que entraran en inactividad. Sin embargo, otros grupos también anaerobios, como algunas proteobacterias, presentan el patrón contrario, por lo que no parece una explicación suficiente.

Paradójicamente, en las fracciones totales, no se encuentran todas las familias, como ya habíamos visto en los primeros experimentos basados en librerías de clones. Ésto nos indica que la mayor parte de las familias son visibles cuando se separan

mediante nuestro protocolo. Usando el método del punto de inflexión (Página 74) hemos dividido los taxones en filogrupos ORB y URB. En todos los casos, el punto de inflexión se ha encontrado alrededor del 1%. La Figura C.2 describe la distribución de URB y ORB a lo largo de las muestras y fracciones. Se puede observar cómo las URB en las fracciones totales están representadas por 39 familias (de 46) mientras que 65 (de 73) se pueden encontrar en las fracciones activas. En ambos casos, la URB representa una fracción considerable de la diversidad de la microbiota gastrointestinal, a pesar de que cuenta con el 5,69% (fracciones totales) y el 7,39% (fracciones activas) de las lecturas. Estos datos son corroborados por el alto índice de *Shannon* encontrado en todas las muestras y fracciones (Tabla C.1).

### Analisis taxonómico y posible papel de la microbiota.

**Firmicutes.** Dentro del *phylum* Firmicutes encontramos, en todas las muestras y prácticamente en todas las fracciones, secuencias relacionadas con las clases Clostridia, Bacilli, Erysipelotrichi y Negativicutes. En la muestra 1 Clostridia al 50,00% y al 84,48% en las fracciones totales y activas respectivamente (con diferencias altamente significativas, Figura C.2).

Ruminococcaceae, Clostridiaceae y Lachnospiraceae han sido las familias más comúnmente encontradas en todas las muestras (Figura C.2, panel ORB).

Dentro de Clostridiales - Clostridiaceae, las lecturas pertenecientes a la especie *Clostridium clariflavum* se han identificado en las fracciones activas de todas las muestras mientras que éstas no han sido encontradas en todas las fracciones totales. Este organismo ha sido descrito como moderadamente termófilo, capaz de degradar celulosa o celobiosa, encontrado originariamente de sedimento metanogénico (Shiratori et al., 2009). Otras especies frecuentemente observadas, identificada desde 1977, ha sido *C. irregulare*, capaz de degradar sales biliares, y *C. sporosphaeroides*, productor de hidrógeno<sup>18</sup>, el cual es capaz de convertir lactato a propionato y no piruvato a butirato, lo que es relativamente raro pero no único (Mahony et al., 1977).

Otra especie de Clostridiaceae encontrada en todas las fracciones es *Anoxinatronum sibiricum*. Ésta fue descrita por primera vez como anaerobio sacarolítico y alcalinófilo aislado de comunidad celulolítica natural de Nizhnee Beloe (región Trans-

---

<sup>18</sup> no produce H<sub>2</sub>S.



baikal, Rusia)(Garnova et al., 2003).

Otras lecturas relacionadas con *Clostridium* han sido encontradas pero no en todas las muestras. Lachnospiraceae (ORB) ha sido encontrada significativamente más abundante en las muestras activas. De hecho, lecturas relacionadas con miembros del género *Coproccoccus* (especies *C. catus*, *C. comes* y *C. eutactus*) se han obtenido principalmente de las fracciones activas de todas las muestras. Los *Coproccoccus* son gram positivos, cocos anaerobios y fermentadores activos de carbohidratos y productores de ácidos butírico y acético con ácidos láctico, propiónico o fórmico (Holdeman, 1974).

Otras especies de Lachnospiraceae encontradas son *Hespellia porcina* y *H. stercorisuis*. Ambas son capaces de crecer en glucosa, maltosa, manosa, sacarosa, fructosa y xylosa como fuente de energía, aunque la primera es capaz también de metabolizar arabinosa y inositol mientras que la segunda puede hacerlo con lactosa celobiosa, trehalosa, amigdalina y sorbitol (Whitehead, 2004).

Otras Lachnospiraceae activas son *Roseburia faecis*, *R. hominis*, *R. inulinovorans* y *R. intestinalis*, que son capaces de degradar almidón produciendo principalmente butirato y lactato y que han sido descritas como las más activas metabolizando ácido linoleico (Devillard et al., 2007; Duncan, 2002a). Es destacable señalar que el butirato ha sido asociado positivamente con la protección a cáncer (Comalada et al., 2006; Louis et al., 2004; Tan et al., 2008).

Ruminococcaceae es otra familia importante de Clostridiales. Las especies de esta familia encontradas en las fracciones activas están relacionadas con *Faecalibacterium prausnitzii* o *Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans*. La primera es productora de ácidos grasos de cadena corta con propiedades antiinflamatorias, relacionada con la atenuación de enfermos de la enfermedad de Crohn (Scheppach y Weiler, 2004; Sokol et al., 2008), mientras que la segunda puede fermentar un gran número de azúcares incluyendo glucógeno, rafinosa, sacarosa, glucosa, ribosa, manosa, lactosa, arabinosa, maltosa, inulina y trehalosa (Song y Dong, 2009).

*Ruminococcus bromii*, *R. flavefaciens* y *R. gnavreaultii*, otras especies dentro de Ruminococcaceae, son también componentes comunes de la microbiota gastrointestinal, algunas de los cuales también juegan un papel protector (Kang et al., 2010). También *Blautia sp.* se encuentra en todas las muestras. Otras familias de Clostri-

diales infra-representadas están relacionadas con Clostridiales family XI encontrada en mayor abundancia en estado enfermo (Price et al., 2009); Clostridiales family XII cuyo género se ha caracterizado por poseer fenotipos heterogéneos; Clostridiales family XIII, Clostridiales family XVIII, Gracilibacteraceae, Peptostreptococcaceae, etc.

Aunque hemos encontrado diversas familias pertenecientes a los órdenes de Bacillales y Lactobacillales, de Bacilli, no encontramos ninguna familia en común en todas las fracciones. Finalmente, Selenomonadales, de Negativicutes, se encuentra en las fracciones infra-representadas de todas las muestras.

**Bacteroidetes.** En las muestras 1, 2 y 3, los Bacteroidaceae son los más frecuentemente encontrados en las fracciones totales. Más específicamente, en la muestra 1 y la 3, esta familia se encuentra en 9 y 5 veces más en las fracciones totales que en las activas. Las únicas dos familias encontradas en todas las muestras son *Bacteroides dorei* y *B. uniformis*. A pesar de la alta proporción de este filogrupo en el intestino humano, probablemente su actividad real es baja, o está relacionada con distritos del intestino más lejanos al ano. Es interesante mencionar que muchos estudios indican que los Bacteroidetes son más abundante cuando se mantiene una dieta baja en calorías (Ley et al., 2006). Además, se sabe que miembros del género *Bacteroides* producen ácidos grasos de cadena corta que, como hemos visto con anterioridad, está relacionado con la protección ante la inflamación (De Filippo et al., 2010; Scheppach y Weiler, 2004). Finalmente, otras familias que se encuentran en casi todas las muestras/fracciones son Porphyromonadaceae, Prevotellaceae y Rikenellaceae en la fracción infra-representada.

**Proteobacterias.** Las proteobacterias se han encontrado en baja proporción en la microbiota gastrointestinal humana (Wu et al., 2010). Prácticamente en todas las fracciones hemos encontrado miembros de  $\alpha$ -,  $\beta$ -  $\delta$ - y  $\gamma$ -Proteobacteria en baja proporción (como URB). Prácticamente todas las de la familia  $\alpha$ -Proteobacteria son más abundantes en las fracciones activas, con la excepción de Rhodospirillaceae, Methylocystaceae y Rickettsiaceae.

De las  $\beta$ -Proteobacteria, las Alcaligenaceae se han encontrado en casi todas las muestras, pero sólo es significativamente más abundante en la fracción activa de la

muestra 1. Moraxellaceae de las  $\gamma$ -Proteobacteria es la única familia encontrada en todas las muestras, aunque con una composición de especies diferente en las fracciones activas. Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae se han encontrado en todas las muestras menos en la 4. Finalmente, no se ha podido encontrar un patrón común en el *phylum* Proteobacteria a un nivel taxonómico más bajo de familia, pero otra vez, estas bacterias están en mayor proporción en la parte activa.

La muestra 2 es la más rica en Actinobacteria, siendo un 5,12 %, 4,47 % y 3,78 % de las lecturas en las fracciones HC, LC, y PA respectivamente; al igual que antes, ninguna familia a excepción de Coriobacteriaceae se ha encontrado en todas las muestras. Miembros de Actinomycetaceae, Coriobacteriaceae, Corynebacteriaceae y Propionibacteriaceae son significativamente más abundantes en las fracciones activas que en las totales. Otras secuencias pertenecientes a Dermabacteraceae, Geodermatophilaceae, Gordoniaceae, Intrasporangiaceae, Micrococcaceae y Nocardiaceae se encuentran principalmente en la fracción activa. Actinobacteria siempre se encuentra en baja proporción en las descripciones de la microbiota intestinal pero está demostrado que siempre se encuentra de forma activa como ha sido evidenciado con estudios realizados mediante FISH (Harmsen et al., 2002; Lay et al., 2005). En la Figura C.2 se puede encontrar una visión más detallada de la distribución.

## 4.4. Microbiota intestinal opsonizada con Inmunoglobulina A.

### 4.4.1. Introducción.

La microbiota intestinal es adquirida en los primeros meses después del parto (Favier et al., 2002), durante los cuales se ve afectada por multitud de variables como, por ejemplo, el tipo de parto (natural o cesárea), el tipo de alimentación (leche materna o artificial), factores medioambientales, microorganismos de origen materno, etc. (Bezirtzoglou, 1997; Mändar y Mikelsaar, 1996; Mulder et al., 2009; Penders et al., 2006; Vaishampayan et al., 2010) (Página 23). Después de este periodo de tiempo, la microbiota intestinal alcanza cierta estabilidad que se mantiene más o menos constante a lo largo de la vida (Dethlefsen et al., 2007).

Es en estos primeros meses donde se establecen las primeras y más importantes interacciones de la microbiota con el sistema inmune. Giraud et al. (2008) demuestra cómo la cepa MG1655 de *E. coli*, inoculada en un ratón gnotobiótico, experimenta una fuerte selección para adaptarse al nuevo medio, alterando el operón EnvZ/OmpR en el 90 % de las bacterias recuperadas de heces de ratón. Por otro lado, el sistema inmune se adapta a la colonización evitando la completa eliminación de las bacterias que van a ser comensales del hospedador (Hooper y Macpherson, 2010; Macpherson y Geuking, 2005). Esto demuestra la coadaptación del sistema inmune y la microbiota durante las primeras fases del desarrollo.

Lotz y colaboradores describen que los ratones recién nacidos experimentan un proceso de adquisición de tolerancia a los lipopolisacáridos (LPS) expresados por bacterias en el momento del parto (Lotz et al., 2006). Este proceso contribuye al establecimiento de la homeostasis entre la microbiota y el hospedador de forma muy temprana después del nacimiento. La homeostasis en el tracto gastrointestinal de mamíferos se mantiene durante la vida del hospedador respondiendo activamente a los microorganismos a través de varios efectores mediados por los receptores “Toll-like” (TLR1 a TLR9). Los TLRs pueden reconocer estructuras específicas de microorganismos, como por ejemplo, los LPS (Medzhitov, 2001). Se ha demostrado que cada tipo de TLRs puede identificar de manera selectiva la presencia de patrones moleculares asociados a comensales (CAMPs), o asociados a patógenos (PAMPs).

El sistema inmune está continuamente estimulado para mantener bajo control a patógenos potenciales de la microbiota que transitan por el tracto gastrointestinal en situaciones normales (Hooper y Macpherson, 2010). Con la presencia de patógenos el sistema inmune responde intentando eliminar específicamente a los intrusos. Muchas prácticas clínicas se basan en la administración de antibióticos para ayudar al organismo a eliminar los patógenos. Este hecho es poco selectivo y puede producir desequilibrios en la microbiota intestinal. Esta alteración puede desembocar en el crecimiento incontrolado de microorganismos no deseados, que en condiciones normales están regulados por la microbiota comensal y puede dar origen a enfermedades como las colitis asociadas a *C. difficile* (Tabla 4.3) u otras enfermedades inflamatorias intestinales. Tanto durante un proceso infeccioso como en un estado fisiológico normal, el sistema inmune es estimulado continuamente produciendo las inmunoglobulinas necesarias, contribuyendo así a mantener el equilibrio de la microbiota.

Tabla 4.3: *Clostridium difficile*.

---

*Clostridium difficile* es un importante patógeno nosocomial, causante de la mayor parte de diarreas hospitalarias contagiosas. Esta infección puede afectar en diferentes grados al paciente (Wood et al., 2008), desde ser un portador asintomático, pasando por una diarrea ligera, hasta una colitis pseudomembranosa (PMC). La forma más común de infección es cuando un paciente de cirugía de colon, gástrica o pélvica recibe tratamiento antibiótico (Hurley y Nguyen, 2002). Aunque *C. difficile*, en ese momento denominado *Bacillus difficilis*, se describió por primera vez en 1935 (Hall y O'Toole, 1935), no ha sido identificado como agente etiológico de la PMC y otras diarreas asociadas a antibióticos hasta finales de los 70 (Bartlett et al., 1978; Larson et al., 1978). Mientras el uso de antibióticos aumentaba, la PMC se hizo más importante. Pero, en los últimos 30 años, la mayoría de pacientes que se infectan con *C. difficile* no llegan a desarrollar los síntomas más graves de la enfermedad, debido a una mayor conciencia del problema y mejoras en los diagnósticos. Aquellos que la llegan a desarrollar es debido a la aparición de una cepa hipervirulenta, con curso de la enfermedad más severo, mayor mortalidad y menor respuesta a terapia.

---

Aún no está claro el papel de las distintas inmunoglobulinas, su efecto sobre la estructura poblacional de la microbiota, su especificidad hacia grupos bacterianos concretos, ni el efecto de los antibióticos sobre la microbiota intestinal.

En este apartado utilizamos muestras durante una serie temporal de un paciente sospechoso de estar infectado con *C. difficile* al que se le suministraron antibióticos de amplio espectro. Marcando las bacterias opsonizadas con IgA humana, utilizando

anticuerpos fluorescentes anti IgA humana, la citometría de flujo nos permite separarlas del resto. Una vez obtenidas estas fracciones mediante secuenciación del gen 16S rDNA identificaremos las bacterias de estas fracciones y de la población total.

#### 4.4.2. Objetivos.

1. Desarrollar un protocolo para obtener la fracción de la microbiota intestinal opsonizada con IgA humana.
2. Comprobar si la opsonización con IgA de bacterias intestinales es aleatoria o selecciona objetivos concretos.

#### 4.4.3. Resultados y Discusión.

En la Tabla 4.4 puede observarse la cantidad de eventos separados con el citómetro de flujo<sup>19</sup>.

Tabla 4.4: Número de células por fracción

Tiempo (Días)	Fracción	Número de células	Eventos marcados (%)
0	FS	-	100
3	FS	-	100
10	FS	-	100
13	FS	-	100
0	IgAPos	150.209	68,16
3	IgAPos	17.630	47,00
10	IgAPos	212.048	24,05
13	IgAPos	166.245	40,77

Se obtuvieron 39.978 secuencias útiles con longitud mayor de 200 nucleótidos. En la Figura 4.13 puede observarse la distribución de tamaños de secuencia de cada fracción y muestra. En las muestras sin fraccionar se han obtenido alrededor de 4.000 secuencias por muestra con un tamaño medio de unos 500 nucleótidos.

En la Tabla 4.5 podemos observar los índices de diversidad de cada muestra/fracción. En las muestras de heces se han encontrado alrededor de 20 familias que se mantie-

<sup>19</sup> No se han tenido en cuenta los eventos abortados ni los de las regiones intermedias entre los dos gates para conseguir la máxima pureza posible de cada fracción.

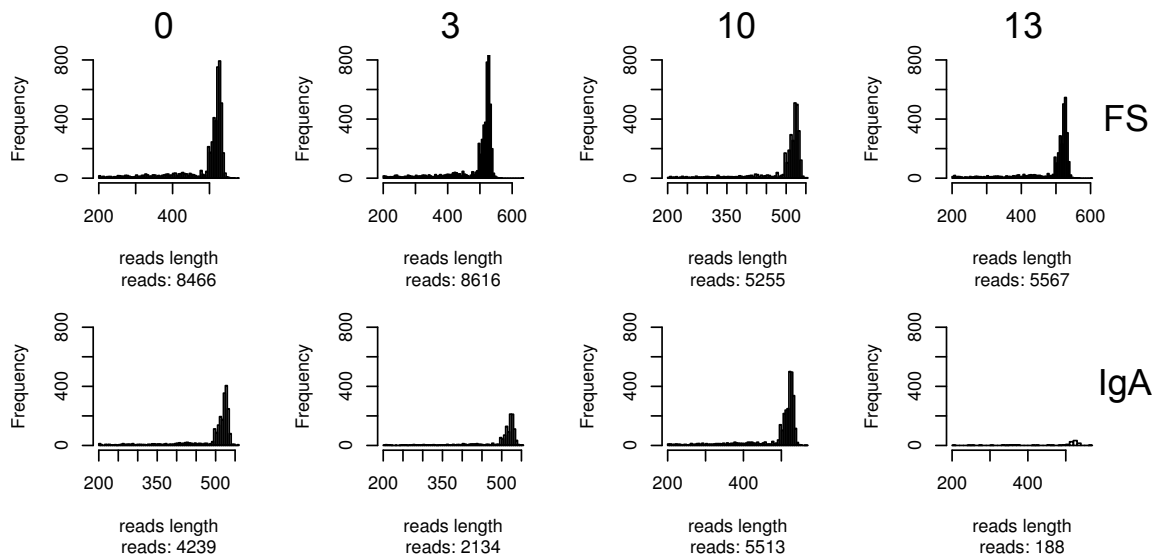


Figura 4.13: Distribución de los tamaños de las secuencias obtenidas en cada muestra/fracción.

nen estables a lo largo del tratamiento antibiótico. A pesar de ello, las distribuciones de las bacterias opsonizadas con IgA es más variable. La diversidad en FS disminuye a lo largo del tratamiento, mientras que el de la fracción marcada con IgA aumenta, excepto en el punto final cuando ya no se suministra el antibiótico.

Tabla 4.5: Índices de diversidad de las diferentes muestras/fracciones.

	N	Shannon	Chao1	SE.Chao1	ACE	SE.ACE
0-FS	23,00	2,07	23,00	1,32	23,52	1,90
3-FS	21,00	1,30	28,00	13,15	32,03	3,16
10-FS	24,00	0,37	24,60	1,77	26,10	2,46
13-FS	21,00	0,40	24,75	6,48	27,12	2,86
0-IgAPos	22,00	0,34	22,38	1,12	24,03	2,31
3-IgAPos	45,00	2,19	48,50	4,84	49,84	3,53
10-IgAPos	34,00	1,98	56,50	59,58	46,73	3,35
13-IgAPos	6,00	0,40	9,00		10,28	1,51

En las curvas de rarefacción (Figura 4.14) puede observarse que a nivel de familias todas las curvas alcanzan el *plateau*. Si consideramos la diversidad a nivel de OTUs<sup>97</sup>

(agrupamiento al 97% de similitud y 80% de solapamiento) éste no se alcanza.

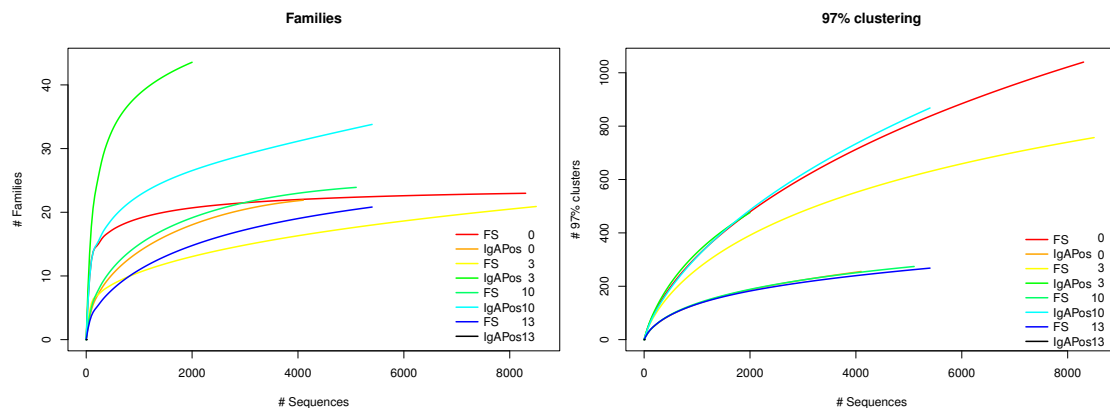


Figura 4.14: Curvas de rarefacción de cada muestras/fracción a nivel de familia (izquierda) y de OTUs<sup>97</sup> (derecha).

En las siguientes figuras (Figura 4.15, Figura D.1, Figura D.2, Figura D.3 y Figura D.4) se muestran todos los *phyla* juntos y algunos de ellos por separado. Se pueden apreciar las variaciones de cada familia a lo largo del tratamiento.

La diversidad obtenida en las fracciones totales disminuye a lo largo del tratamiento antibiótico, sin disminuir el número de grupos, es decir, aumenta la dominancia (Tabla 4.5). Esto puede ser debido a que hay algunas bacterias que resisten mejor la presencia de los antibióticos. En cambio, las bacterias marcadas con IgA, pasan de una alta dominancia<sup>20</sup> a una gran diversidad en las muestras de los días 3 y 10, pudiendo indicar que durante el tratamiento se activa el sistema inmune “atacando” a más grupos bacterianos.

En la Figura 4.16 podemos observar el porcentaje de cada familia en la muestra total y cuánto está osonizada con IgA, siendo las familias Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae, ud-Lactobacillales, ud-Firmicutes, Enterobacteriaceae y ud-Gammaproteobacteria las que menos marcadas están. Prácticamente todas éstas, típicas de la microbiota gastrointestinal humana, pertenecen al grupo de las bacterias lácticas. Lo que puede ser debido a que la co-evolución de estas bacterias con el sistema inmune humano ha hecho que este último sea más permisivo con ellas. La única bacteria que solo aparece en la muestra total<sup>21</sup> y nunca en la fracción IgA,

<sup>20</sup> Solo se regulan unos pocos grupos.

<sup>21</sup> Aunque en un número muy bajo.



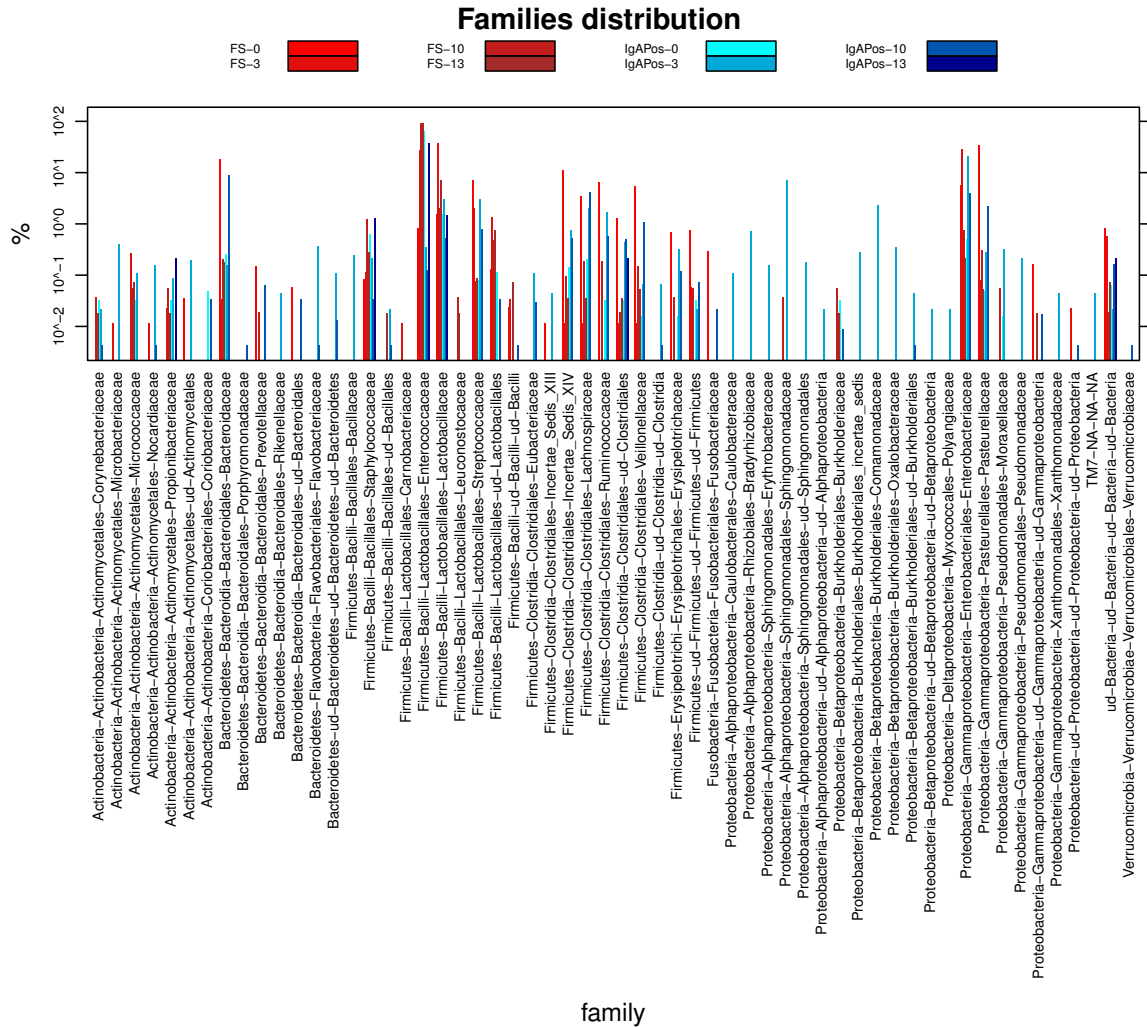


Figura 4.15: Distribución por familias de cada muestra y fracción. El eje de las Y representa el porcentaje en escala logarítmica de cada familia.

es la familia Carnobacteriaceae. Esta familia, de reciente descubrimiento, también pertenece a las bacterias lácticas y es conocida porque actúan como probióticos en acuicultura y otros sectores alimentarios (Voget et al., 2011).

Los grupos de la Tabla 4.6, están generalmente muy marcados y son familias con especies patógenas como Bacillaceae o Staphylococcaceae, o ambientales como Microbacteriaceae o Nocardiaceae. Su aparición en intestino humano no es rara pero, al no presentar una relación estrecha con él, activan con mayor intensidad el sistema

inmune. Esto nos indica que la totalidad de las bacterias están bajo el control del sistema inmune en mayor o menor medida y solo en animales gnotobióticos, donde la microbiota está controlada, pequeñas exposiciones a bacterias necesitan sobrepasar un umbral para empezar a liberar IgA (Hapfelmeier et al., 2010).

Los resultados deben ser tomados con precaución debido a que al proceder de un enfermo bajo tratamiento antibiótico, puede que su sistema inmune esté más activo, produciendo un sesgo en las observaciones. Actualmente se está describiendo las distribuciones de las bacterias opsonizadas por IgA en muestras de heces de voluntarios sanos (trabajo actualmente en curso).

La relación entre FS e IgA, después del tratamiento con antibióticos, varía en la totalidad de las familias. Aunque más muestras y controles sanos serían necesarios para llegar a una

Tabla 4.6: Familias muy marcadas con IgA.

Microbacteriaceae	Rikenellaceae	Eubacteriaceae
Nocardiaceae	Flavobacteriaceae	Lachnospiraceae
Propionibacteriaceae	ud-Bacteroidetes	ud-Clostridiales
Coriobacteriaceae	Bacillaceae	Veillonellaceae
Porphyrimonadaceae	Staphylococcaceae	Caulobacteraceae

conclusión robusta, estos datos nos muestran como la administración de antibióticos de amplio espectro irrumpe en el equilibrio de la microbiota, desregulándola.





---

# Capítulo 5

## *Conclusions*

### Splitting gut microbiota by phylogroup.

- Gradient centrifugation does not introduce observable biases in the extraction of bacterial cells from faeces.
- Pyronin Y staining does not affect in the same way all bacteria. The more stained the more active a bacteria is. It can be used as an activity marker.
- Sorting by 16S rDNA probes allows direct metagenomic studies to target groups. It can be used to detect rare bacteria with minimal sequencing effort.
- Sometimes rare bacteria are the most difficult to detect or the ones accumulating resistances factors. In this sense, the methodology proposed in this chapter can be really helpful studying microbial resistance.

### Cell cycle.

- In order to study the microbial community behaviour, it is essential to study deeply simple cultures and understand the emergence of physiological subpopulations. Flow cytometry allows to do it and, what is more, this kind of information can be compared with uncultivable bacteria to understand its function in a natural community.

- In a simple rich culture, activity levels can be detected during exponential growth and/or stationary phase. In complex media bacterial behaviour could be totally different in terms of interaction between sub-populations.
- Studying bacterial community patterns by flow cytometry along temporal series allows to describe processes and to determine the points where important changes happen. This method permits to direct the attention to that very moment when a more accurate analysis is required.

### **Active gut microbiota.**

- The amount of RNA is correlated with activity. Focusing our attention specifically on active fractions underrepresented bacteria become “statistically visible”.
- At family level, the active fractions tend to group together independently from sample.
- Finally, the function of the gut microbiome must not be deduced only by DNA-based experiments.

### **IgA-Opsonized gut microbiota.**

- Flow cytometry permits to study the relationships between our immune system and our microbiota.
- Immune system seems to be more permissive with beneficial bacteria and with bacteria that it has been co-evolving.
- Even the rare bacteria are regulated by immune system.
- Antibiotic treatment changes the microbial composition influencing also the response of the immune system.

---

# Capítulo 6

## Conclusiones

### Separación de la microbiota por filogrupos.

- La obtención de las células de las heces mediante centrifugación en gradiente no altera de manera apreciable los resultados de la composición de la microbiota, aunque para estudios donde se requieran muchas células y no se disponga de mucho material podría ser conveniente utilizar simplemente una filtración para perder menos células.
- Parte de la microbiota de las heces se tiñe con mayor intensidad con pironina Y. Esta tinción puede ser utilizada como marcador de actividad metabólica.
- La separación mediante sondas específicas de 16S rDNA permite dirigir estudios metagenómicos a grupos determinados, aunque la separación no es perfecta. Para poder hacer estudios más precisos adjudicando las secuencias obtenidas a un grupo en concreto se requiere de fluorocromos con más señal, sondas más específicas, o aparatos más sensibles. Aún así, la citometría de flujo permite enriquecer una fracción en determinadas especies y facilitar su estudio, disminuyendo el esfuerzo de secuenciación.
- Dado que a veces los microorganismos raros son los más difíciles de encontrar, o los que acumulan resistencias, esta metodología puede ser de utilidad para intentar estudiar enfermedades, de manera más específica.

## Ciclo celular.

- Lejos de conocer el comportamiento de las comunidades microbianas se hace esencial estudiar con mayor profundidad cultivos simples en condiciones naturales y observar la aparición de subpoblaciones. La citometría de flujo es una herramienta perfecta para ello, incluso permitiría comparaciones de patrones de cultivos con bacterias que no pueden cultivarse.
- En un simple cultivo rico pueden intuirse dos tipos de actividad, la que da el crecimiento exponencial y la actividad en fase estacionaria. En un medio más complejo y con mayor número de interacciones, saber qué y cómo funciona una bacteria puede ser más importante que conocer la distribución de especies.
- Estudiar patrones mediante citometría de comunidades bacterianas a lo largo de series u otros cambios podría ser útil para monitorizar procesos y dirigir otros estudios a las fracciones que varían.

## Microbiota intestinal activa.

- El estudio basado en la separación de células según su cantidad de RNA nos permite diferenciar la fracción activa de la total. Esto nos da una información más detallada de esta compleja comunidad, resaltando la presencia de bacterias activas infra-representadas, ocultas por las sobre-representadas.
- A nivel de familia, las fracciones activas tiende a agruparse juntas independientemente de la muestra.
- Globalmente, los resultados en su totalidad muestran claramente que la funcionalidad del microbioma no debe ser deducido únicamente de experimentos basados en el DNA usando directamente muestras fecales.



## Microbiota intestinal opsoniza con Inmunoglobulina A.

- La citometría de flujo nos permite estudiar la relación de nuestro sistema inmune con nuestra microbiota.
- El sistema inmune parece ser más permisivo con bacterias beneficiosas y con aquéllas con las que ha co-evolucionado.
- Las bacterias presentes en menor número también están reguladas por el sistema inmune. La continua exposición de éstas mantiene al sistema inmune alerta.
- La exposición a antibióticos altera la composición de la microbiota y desregula al sistema inmune.



---

# Bibliografía

Achtman, M y Wagner, M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature reviews. Microbiology*, 6(6):431–40, 2008. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro1872. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461076>.

Ahmed, S; Macfarlane, G. T; Fite, A; McBain, A. J; Gilbert, P; et al. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Applied and environmental microbiology*, 73(22):7435–42, 2007. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.01143-07. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2168195&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Akerlund, T; Nordstrom, K; y Bernander, R. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177(23):6791, 1995. ISSN 0021-9193. URL <http://jb.asm.org/cgi/content/abstract/177/23/6791>.

Alonso, J. L; Mascellaro, S; Moreno, Y; Ferrús, M. A; y Hernández, J. Double-staining method for differentiation of morphological changes and membrane integrity of *Campylobacter coli* cells. *Applied and environmental microbiology*, 68(10):5151–4, 2002. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.68.10.5151. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126449&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Amann, R. I; Ludwig, W; y Schleifer, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1):143–69, 1995. ISSN 0146-0749. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Anderson, J. W; Johnstone, B. M; y Remley, D. T. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 70(4):525–35, 1999. ISSN 0002-9165. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500022>.

Apgar, B. S; Greenberg, G; y Yen, G. Prevention of group B streptococcal disease in the newborn.

- American family physician*, 71(5):903–10, 2005. ISSN 0002-838X. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15768620>.
- Armstrong, R. A. The microbiology of the eye. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 20(6):429–441, 2000. ISSN 02755408. doi:10.1111/j.1475-1313.2000.tb01121.x. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1475-1313.2000.tb01121.x>.
- Arumugam, M; Raes, J; Pelletier, E; Le Paslier, D; Yamada, T; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, págs. 1–7, 2011. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/nature09944. URL <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature09944>.
- Atassi, F y Servin, A. L. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathog. *FEMS microbiology letters*, 304(1):29–38, 2010. ISSN 1574-6968. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01887.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20082639>.
- Auldridge, M. E y Forest, K. T. Bacterial phytochromes: more than meets the light. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46(1):67–88, 2011. ISSN 1549-7798. doi:10.3109/10409238.2010.546389. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250783>.
- Ausubel, F; Brent, R; Kingston, R; Moore, D; Seidman, J; et al. *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from Current protocols in molecular biology*. Greene Pub, tomo 232. New York: Greene Publishing Association; Wiley-Interscience, 1992. v.1., 1992. URL <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Short+protocols+in+molecular+biology:+a+compendium+of+methods+from+Current+protocols+in+molecular+biology#0>.
- Avila, M; Ojcius, D. M; y Yilmaz, O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA and cell biology*, 28(8):405–11, 2009. ISSN 1557-7430. doi:10.1089/dna.2009.0874. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2768665&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bäckhed, F; Ley, R. E; Sonnenburg, J. L; Peterson, D. a; y Gordon, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717):1915–20, 2005. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1104816. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790844>.
- Bakir, M. A; Kitahara, M; Sakamoto, M; Matsumoto, M; y Benno, Y. *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(Pt 1):151–4, 2006. ISSN 1466-5026. doi:10.1099/ij.s.0.63914-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403880>.

- Bartlett, J; Moon, N; Chang, T; Taylor, N; y Onderdonk, A. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*, 75(5):778, 1978. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/700321/>.
- Becking, L. *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*, tomo 18. WP Van Stockum & Zoon, 1934. URL <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Geobiologie+of+inleiding+tot+de+milieukunde#0>.
- Belda-Ferre, P; Alcaraz, L. D; Cabrera-Rubio, R; Romero, H; Simón-Soro, A; et al. The oral metagenome in health and disease. *The ISME journal*, 2011. ISSN 1751-7370. doi:10.1038/ismej.2011.85. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21716308>.
- Ben-Amor, K; Heilig, H; Smidt, H; Vaughan, E. E; Abee, T; et al. Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis. *Applied and environmental microbiology*, 71(8):4679–89, 2005. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.71.8.4679-4689.2005. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1183343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Benno, Y; Sawada, K; y Mitsuoka, T. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiology and immunology*, 28(9):975–86, 1984. ISSN 0385-5600. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6513816>.
- Bezirtzoglou, E. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*, 3(2-3):173–7, 1997. ISSN 1075-9964. doi:10.1006/anae.1997.0102. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887585>.
- Bik, E. M; Eckburg, P. B; Gill, S. R; Nelson, K. E; Purdom, E. A; et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3):732–7, 2006. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.0506655103. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1334644&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Bisgaard, H; Hermansen, M. N; Buchvald, F; Loland, L; Halkjaer, L. B; et al. Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. *The New England journal of medicine*, 357(15):1487–95, 2007. ISSN 1533-4406. doi:10.1056/NEJMoa052632. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928596>.
- Boskey, E. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction*, 16(9):1809–1813, 2001. ISSN 14602350. doi:10.1093/humrep/16.9.1809. URL <http://www.humrep.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/humrep/16.9.1809>.

- Bouskra, D; Brézillon, C; Bérard, M; Werts, C; Varona, R; et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*, 456(7221):507–10, 2008. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature07450. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18987631>.
- Bremer, H; Dennis, P; y Others. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. En *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 122, págs. 1553–1569. American Society for Microbiology (ASM), 1996. URL <http://ctbp.ucsd.edu/qbio/beemer96.pdf>.
- Brostrom, M y Binkley, S. Synchronous growth of *Escherichia coli* after treatment with fluorophenylalanine. *Journal of bacteriology*, 98(3):1271–1273, 1969. ISSN 0021-9193. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC315323/>.
- Bruns, A; Cypionka, H; y Overmann, J. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Applied and environmental microbiology*, 68(8):3978, 2002. doi:10.1128/AEM.68.8.3978-3987.2002. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/68/8/3978>.
- Bryant, M y Small, N. Characteristics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle. *Journal of Bacteriology*, 72(1):22, 1956. URL <http://jb.asm.org/cgi/reprint/72/1/22.pdf>.
- Buchanan, R; Whiting, R; y Damert, W. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, 14(4):313–326, 1997. ISSN 07400020. doi:10.1006/fmic.1997.0125. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002097901258>.
- Burgess, C; Smid, E; y Van Sinderen, D. Bacterial vitamin B2, B11 and B12 overproduction: an overview. *International journal of food microbiology*, 133(1):1–7, 2009. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509002244>.
- Burtscher, C y Wuertz, S. Evaluation of the use of PCR and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters. *Applied and environmental microbiology*, 69(8):4618–27, 2003. ISSN 0099-2240. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=169064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cabello, H; Torres, A; Celis, R; El-Ebiary, M; Puig de la Bellacasa, J; et al. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *European Respiratory Journal*, 10(5):1137–1144, 1997. ISSN 00000000. doi:10.1183/09031936.97.10051137. URL <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0903-1936&volume=10&issue=5&page=1137>.

- CAMPIERI, M. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut*, 48(1):132–135, 2001. ISSN 00175749. doi:10.1136/gut.48.1.132. URL <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.48.1.132>.
- Cani, P. D; Neyrinck, A. M; Fava, F; Knauf, C; Burcelin, R. G; et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50(11):2374–83, 2007. ISSN 0012-186X. doi:10.1007/s00125-007-0791-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823788>.
- Cani, P. D y Delzenne, N. M. The Role of the Gut Microbiota in Energy Metabolism and Metabolic Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 15(13):1546–1558, 2009. ISSN 13816128. doi:10.2174/138161209788168164. URL <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&iissn=1381-6128&volume=15&issue=13&spage=1546>.
- Carlstedt-Duke, B y Lingaas, E. Influence of antibiotics on intestinal mucin in healthy subjects. *European Journal of*, 1986. URL <http://www.springerlink.com/index/U56172X1252G7502.pdf>.
- Cazzolla, A. P; Campisi, G; Lacaita, G. M; Cuccia, M. A; Ripa, A; et al. Changes in pharyngeal aerobic microflora in oral breathers after palatal rapid expansion. *BMC oral health*, 6:2, 2006. ISSN 1472-6831. doi:10.1186/1472-6831-6-2. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1388214&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cebra, J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *The American journal of clinical nutrition*, 1999. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10232647>.
- Chambers, S y Kunin, C. The osmoprotective properties of urine for bacteria: the protective effect of betaine and human urine against low pH and high concentrations of electrolytes, sugars, and urea. *Journal of Infectious Diseases*, 152(6):1308, 1985. URL <http://jid.oxfordjournals.org/content/152/6/1308.short>.
- Chaudhuri, R; McMahon, A. D; McSharry, C. P; Macleod, K. J; Fraser, I; et al. Serum and sputum neurotrophin levels in chronic persistent cough. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 35(7):949–53, 2005. ISSN 0954-7894. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02286.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16008683>.
- Chiller, K; Selkin, B. a; y Murakawa, G. J. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*, 6(3):170–4, 2001. ISSN 1087-0024. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11924823>.

- Clarridge, J. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 2004. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004. URL <http://cmr.asm.org/cgi/content/abstract/17/4/840>.
- Cogen, A y Nizet, V. Skin microbiota: a source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*, 2008. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x/full>.
- Cole, J. R; Wang, Q; Cardenas, E; Fish, J; Chai, B; et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 37(Database issue):D141-5, 2009. ISSN 1362-4962. doi:10.1093/nar/gkn879. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2686447&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cole, J; Chai, B; Marsh, T; Farris, R; Wang, Q; et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 31(1):442-443, 2003. URL <http://nar.oxfordjournals.org/content/31/1/442.short>.
- Collado, M. C; Delgado, S; Maldonado, A; y Rodríguez, J. M. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in applied microbiology*, 48(5):523-8, 2009. ISSN 1472-765X. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02567.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228290>.
- Collins, F; Lander, E; Rogers, J; y Waterston, R. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 2004. URL <http://www.lic.vnu.edu.vn/website/data/scopus/biomedical017.pdf>.
- Collins, S. M; Denou, E; Verdu, E. F; y Bercik, P. The putative role of the intestinal microbiota in the irritable bowel syndrome. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 41(12):850-3, 2009. ISSN 1878-3562. doi:10.1016/j.dld.2009.07.023. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19740713>.
- Comalada, M; Bailon, E; Haro, Ode; Lara-Villoslada, F; Xaus, J; et al. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 132(8):487-497, 2006. URL <http://www.springerlink.com/index/LM4M349N77714765.pdf>.
- Córdova-Kreylos, A. L; Cao, Y; Green, P. G; Hwang, H.-M; Kuivila, K. M; et al. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt



- marsh sediments. *Applied and environmental microbiology*, 72(5):3357–66, 2006. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.72.5.3357-3366.2006. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1472379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Costello, E. K; Lauber, C. L; Hamady, M; Fierer, N; Gordon, J. I; et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science (New York, N. Y.)*, 326(5960):1694–7, 2009. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1177486. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892944>.
- Cummings, J; Pomare, E; Branch, W; Naylor, C; y Macfarlane, G. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10):1221, 1987. URL <http://gut.bmj.com/content/28/10/1221.abstract>.
- Daffonchio, D; Borin, S; Brusa, T; Brusetti, L; Wielen, P. W. J. Jvan der; et al. Stratified prokaryote network in the oxic-anoxic transition of a deep-sea halocline. *Nature*, 440(7081):203–7, 2006. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature04418. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16525471>.
- De Filippo, C; Cavalieri, D; Di Paola, M; Ramazzotti, M; Poulet, J; et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33):14691–14696, 2010. URL <http://www.pnas.org/content/107/33/14691.short>.
- Del Giorgio, P; Prairie, Y; y Bird, D. Coupling between rates of bacterial production and the abundance of metabolically active bacteria in lakes, enumerated using CTC reduction and flow cytometry. *Microbial ecology*, 34(2):144–154, 1997. URL <http://www.springerlink.com/index/82EHLWK9ECL61KYT.pdf>.
- Dell’Anno, A; Fabiano, M; y Duineveld, G. Nucleic Acid (DNA, RNA) Quantification and RNA/DNA Ratio Determination in Marine Sediments: Comparison of Spectrophotometric, Fluorometric, and HighPerformance Liquid Chromatography Methods and Estimation of Detrital DNA. *Applied and*, 64(9):3238–3245, 1998. URL <http://aem.asm.org/content/64/9/3238.short>.
- Der, G; Batty, G. D; y Deary, I. J. Effect of breast feeding on intelligence in children: prospective study, sibling pairs analysis, and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 333(7575):945, 2006. ISSN 1468-5833. doi:10.1136/bmj.38978.699583.55. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1633819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- DeSantis, T; Hugenholtz, P; y Larsen, N. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and*, 2006. URL <http://aem.asm.org/content/72/7/5069.short>.

- Dethlefsen, L; Huse, S; y Sogin, M. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS biology*, 6(11):e280, 2008. ISSN 1545-7885. doi:10.1371/journal.pbio.0060280. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0060280>.
- Dethlefsen, L; McFall-Ngai, M; y Relman, D. a. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 449(7164):811–818, 2007. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature06245. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943117>.
- Devillard, E; McIntosh, F; Duncan, S; y Wallace, R. Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *Journal of bacteriology*, 189(6):2566, 2007. URL <http://jb.asm.org/cgi/content/abstract/189/6/2566>.
- Diamond, G; Legarda, D; y Ryan, L. K. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunological Reviews*, 173(1):27–38, 2000. ISSN 0105-2896. doi:10.1034/j.1600-065X.2000.917304.x. URL <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1034/j.1600-065X.2000.917304.x>.
- DiBaise, J; Zhang, H; Crowell, M; Krajmalnik-Brown, R; Decker, G; et al. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. En *Mayo Clinic Proceedings*, 4, págs. 460–469. Mayo Clinic, 2008. URL <http://mayoclinicproceedings.com/content/83/4/460.short>.
- Dinsdale, E. A; Edwards, R. A; Hall, D; Angly, F; Breitbart, M; et al. Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature*, 452(7187):629–32, 2008. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature06810. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337718>.
- Dominguez-Bello, M. G; Costello, E. K; Contreras, M; Magris, M; Hidalgo, G; et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26):11971–5, 2010. ISSN 1091-6490. doi:10.1073/pnas.1002601107. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2900693&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dong, Q; Brulc, J. M; Iovieno, A; Bates, B; Garoutte, A; et al. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2011. ISSN 1552-5783. doi:10.1167/iovs.10-6939. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21571682>.
- Drasar, B y Hill, M. *Human intestinal flora*, tomo 235. Academic Press London, 1974. ISBN 0122217500. URL <http://www.getcited.org/pub/101415349>.
- Dridi, B; Raoult, D; y Drancourt, M. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. *Anaerobe*, 17(2):56–63, 2011. ISSN 1095-8274. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.001. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420503>.

- Duncan, S. H. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 52(6):2141–2146, 2002a. ISSN 14665026. doi:10.1099/ijs.0.02241-0. URL <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.02241-0>.
- Duncan, S. H. *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 52(5):1615–1620, 2002b. ISSN 14665026. doi:10.1099/ijs.0.02143-0. URL <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.02143-0>.
- Durand, M; Olson, R; y Chisholm, S. Phytoplankton population dynamics at the Bermuda Atlantic Time-series station in the Sargasso Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 48(8-9):1983–2003, 2001. ISSN 09670645. doi:10.1016/S0967-0645(00)00166-1. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967064500001661>.
- Durbán, A; Abellán, J. J; Jiménez-Hernández, N; Ponce, M; Ponce, J; et al. Assessing gut microbial diversity from feces and rectal mucosa. *Microbial ecology*, 61(1):123–133, 2011. ISSN 1432-184X. doi:10.1007/s00248-010-9738-y. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20734040>.
- Eckburg, P. B; Lepp, P. W; y Relman, D. A. Archaea and Their Potential Role in Human Disease. *Infection and Immunity*, 71(2):591–596, 2003. ISSN 0019-9567. doi:10.1128/IAI.71.2.591-596.2003. URL <http://iai.asm.org/content/71/2/591.short>.
- Eckburg, P. B; Bik, E. M; Bernstein, C. N; Purdom, E; Dethlefsen, L; et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Most*, 1635(2005):1635–8, 2005. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1110591. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1395357&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Edwards, a. M; Grossman, T. J; y Rudney, J. D. Association of a high-molecular weight arginine-binding protein of *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 with adhesion to secretory immunoglobulin A and coaggregation with *Streptococcus cristatus*. *Oral microbiology and immunology*, 22(4):217–24, 2007. ISSN 0902-0055. doi:10.1111/j.1399-302X.2006.00343.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600532>.
- Ellis, B; Haaland, P; Hahne, F; Le Meur, N; y Gopalakrishnan, N. flowCore: basic structures for flow cytometry data. *R package version*, 1, 2009. URL <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:flowCore:+Basic+structures+for+flow+cytometry+data#0>.
- Endt, K; Stecher, B; Chaffron, S; Slack, E; Tchitchek, N; et al. The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal *Salmonella* diarrhea. *PLoS pathogens*, 6(9), 2010. ISSN 1553-7374. doi:10.1371/journal.ppat.1001097. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2936549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Falk, P; Hooper, L; Midtvedt, T; y Gordon, J. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4):1157, 1998. URL <http://mibr.asm.org/cgi/content/abstract/62/4/1157>.
- Favier, C. F; Vaughan, E. E; De Vos, W. M; y Akkermans, A. D. L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and environmental microbiology*, 68(1):219–26, 2002. ISSN 0099-2240. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Fernández-Rubio, M. E; Rebolledo-Lara, L; Martínez-García, M; Alarcón-Tomás, M; y Cortés-Valdés, C. The conjunctival bacterial pattern of diabetics undergoing cataract surgery. *Eye (London, England)*, 24(5):825–34, 2010. ISSN 1476-5454. doi:10.1038/eye.2009.218. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19713978>.
- Finegold, S. M. Therapy and epidemiology of autism—clostridial spores as key elements. *Medical hypotheses*, 70(3):508–11, 2008. ISSN 0306-9877. doi:10.1016/j.mehy.2007.07.019. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17904761>.
- Finlay, B y Maberly, S. *Microbial diversity and ecosystem function*. Blackwell, 1997. ISBN 0-85198-898-9. URL <http://www.jstor.org/stable/3546587>.
- Flanagan, J. L; Brodie, E. L; Weng, L; Lynch, S. V; Garcia, O; et al. Loss of bacterial diversity during antibiotic treatment of intubated patients colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*, 45(6):1954–62, 2007. ISSN 0095-1137. doi:10.1128/JCM.02187-06. URL <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/45/6/1954>.
- Foo, M. Antigenic cross-reaction between mouse intestine and a member of the autochthonous microflora. *Infection and immunity*, 1974. URL <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/9/6/1066>.
- Franks, A. H; Harmsen, H. J. M; Raangs, G. C; Jansen, G. J; Schut, F; et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology*, 64(9):3336, 1998. ISSN 0099-2240. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/64/9/3336>.
- Fraune, S y Bosch, T. C. G. Why bacteria matter in animal development and evolution. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 32(7):571–80, 2010. ISSN 1521-1878. doi:10.1002/bies.200900192. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20544735>.

- Freter, R y Jones, G. Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: nature of the interaction with intact mucosal surfaces. *Infection and immunity*, 14(1):246, 1976. URL <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/14/1/246>.
- Furrie, E; Senok, A. C; Frank, D. N; y Sullivan, K. E. Pondering probiotics. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 121(1):19–22, 2006. ISSN 1521-6616. doi:10.1016/j.clim.2006.05.008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807114>.
- Gao, Z; Tseng, C; y Pei, Z. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the*, 2007. URL <http://www.pnas.org/content/104/8/2927.short>.
- Garnova, E. S; Zhilina, T. N; Tourova, T. P; y Lysenko, A. M. Anoxynatronum sibiricum gen.nov., sp.nov. alkaliphilic saccharolytic anaerobe from cellulolytic community of Nizhnee Beloe (Transbaikal region). *Extremophiles : life under extreme conditions*, 7(3):213–20, 2003. ISSN 1431-0651. doi:10.1007/s00792-002-0312-5. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12768452>.
- Gentile, G; Giuliano, L; y D' Auria, G. Study of bacterial communities in Antarctic coastal waters by a combination of 16S rRNA and 16S rDNA sequencing. *Environmental*, 8:2150–2161, 2006. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-2920.2006.01097.x/full>.
- Gentleman, R y Temple Lang, D. Statistical analyses and reproducible research. *Bioconductor Project Working Papers*, pág. 2, 2004. URL <http://www.bepress.com/cgi/viewcontent.cgi?article=1001&context=bioconductor>.
- Gerritsen, J. Host defence mechanisms of the respiratory system. *Paediatric Respiratory Reviews*, 1(2):128–134, 2000. ISSN 15260542. doi:10.1053/prrv.2000.0041. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526054200900411>.
- Ghannoum, M. A; Jurevic, R. J; Mukherjee, P. K; Cui, F; Sikaroodi, M; et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS pathogens*, 6(1):e1000713, 2010. ISSN 1553-7374. doi:10.1371/journal.ppat.1000713. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2795202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gill, S. R; Pop, M; Deboy, R. T; Eckburg, P. B; Turnbaugh, P. J; et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5778):1355–9, 2006. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1124234. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741115>.
- Giraud, A; Arous, S; De Paepe, M; Gaboriau-Routhiau, V; Bambou, J.-C; et al. Dissecting the genetic components of adaptation of *Escherichia coli* to the mouse gut. *PLoS genetics*, 4(1):e2, 2008. ISSN 1553-7404. doi:10.1371/journal.pgen.0040002. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2174974&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Gonzalez, J. M; Portillo, M. C; Belda-Ferre, P; y Mira, A. Amplification by PCR Artificially Reduces the Proportion of the Rare Biosphere in Microbial Communities. *PLoS ONE*, 7(1):e29973, 2012. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0029973. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0029973>.
- Göransson, M; Sondén, B; Nilsson, P; Dagberg, B; Forsman, K; et al. Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature*, 344(6267):682–5, 1990. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/344682a0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691451>.
- Gordon, H y Pesti, L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 35(4):390, 1971. URL <http://mmb.asm.org/cgi/reprint/35/4/390.pdf>.
- Gosalbes, M. J; Durbán, A; Pignatelli, M; Abellan, J. J; Jiménez-Hernández, N; et al. Metatranscriptomic Approach to Analyze the Functional Human Gut Microbiota. *PLoS ONE*, 6(3):e17447, 2011. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0017447. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0017447>.
- Graham, J. E; Moore, J. E; Jiru, X; Moore, J. E; Goodall, E. a; et al. Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(12):5616–23, 2007. ISSN 0146-0404. doi:10.1167/iovs.07-0588. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055811>.
- Green, G; Brostoff, J; y Hudspith, B. Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. *Journal of applied*, 2006. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02783.x/full>.
- Grice, E. A y Segre, J. A. The skin microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 9(4):244–53, 2011. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro2537. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407241>.
- Guarner, F y Malagelada, J.-R. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361(9356):512–9, 2003. ISSN 0140-6736. doi:10.1016/S0140-6736(03)12489-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12583961>.
- Gucker Jr, F; O’Konski, C; Pickard, H; y Pitts Jr, J. A Photoelectronic Counter for Colloidal Particles. *Journal of the American Chemical Society*, 69(10):2422–2431, 1947. doi:10.1021/ja01202a053. URL <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01202a053>.
- Gueimonde, M; Laitinen, K; Salminen, S; y Isolauri, E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 92(1):64–6, 2007. ISSN 1661-7800. doi:10.1159/000100088. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17596738>.

- Guilbault, G. *Practical fluorescence*, tomo 3. CRC, 1990. URL <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Practical+Fluorescence.#0>.
- Günther, S; Trutnau, M; Kleinstauber, S; Hause, G; Bley, T; et al. Dynamics of polyphosphate-accumulating bacteria in wastewater treatment plant microbial communities detected via DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) and tetracycline labeling. *Applied and environmental microbiology*, 75(7):2111–21, 2009. ISSN 1098-5336. doi:10.1128/AEM.01540-08. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/75/7/2111>.
- Hall, I y O'Toole, E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Archives of Pediatrics and Adolescent*, 49(2):390, 1935. URL <http://archpedi.ama-assn.org/cgi/content/summary/49/2/390>.
- Hammerstrom, T. G; Roh, J. H; Nikonowicz, E. P; y Koehler, T. M. *Bacillus anthracis* virulence regulator AtxA: oligomeric state, function and CO(2) -signalling. *Molecular microbiology*, 82(3):634–47, 2011. ISSN 1365-2958. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07843.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21923765>.
- Hapfelmeier, S; Lawson, M. a. E; Slack, E; Kirundi, J. K; Stoel, M; et al. Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5986):1705–9, 2010. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1188454. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576892>.
- Harder, J; Bartels, J; Christophers, E; y Schröder, J. M. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387(6636):861, 1997. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/43088. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202117>.
- Harmsen, H. J. M; Raangs, G. C; He, T; Degener, J. E; y Welling, G. W. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and environmental microbiology*, 68(6):2982, 2002. ISSN 0099-2240. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/68/6/2982>.
- Harris, J. O; Swenson, E. W; y Johnson, J. E. Human alveolar macrophages: comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *The Journal of clinical investigation*, 49(11):2086–96, 1970. ISSN 0021-9738. doi:10.1172/JCI106426. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=535784&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hattori, M y Taylor, T. D. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 16(1):1–12, 2009. ISSN 1756-1663. doi:10.1093/dnares/dsn033. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2646358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Haynes, R. J; Tighe, P. J; y Dua, H. S. Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. *British Journal of Ophthalmology*, 83(6):737–741, 1999. ISSN 0007-1161. doi:10.1136/bjo.83.6.737. URL <http://bjo.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjo.83.6.737>.
- Hehemann, J.-H; Correc, G; Barbeyron, T; Helbert, W; Czjzek, M; et al. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, 464(7290):908–912, 2010. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature08937. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376150>.
- Herbeck, J. Nutritional features of the intestinal anaerobe *Ruminococcus bromii*. *Applied Microbiology*, 1974. URL <http://aem.asm.org/content/28/6/1018.short>.
- Hernández-Rodríguez, C; Romero-González, R; Albani-Campanario, M; Figueroa-Damián, R; Meraz-Cruz, N; et al. Vaginal microbiota of healthy pregnant Mexican women is constituted by four *Lactobacillus* species and several vaginosis-associated bacteria. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2011:851485, 2011. ISSN 1098-0997. doi:10.1155/2011/851485. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3179877&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hill, G. B; Claire, K. K. S; y Gutman, L. T. Anaerobes Predominate Among the Vaginal Microflora of Prepubertal Girls. *Clinical Infectious Diseases*, 20(Supplement 2):S269–S270, 1995. ISSN 1058-4838. doi:10.1093/clinids/20.Supplement\\_.2.S269. URL [http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/clinids/20.Supplement\\_2.S269](http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/clinids/20.Supplement_2.S269).
- Hillier, S. L y Lau, R. J. Vaginal microflora in postmenopausal women who have not received estrogen replacement therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 25 Suppl 2(Suppl 2):S123–6, 1997. ISSN 1058-4838. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310650>.
- Hojo, K; Nagaoka, S; Ohshima, T; y Maeda, N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *Journal of dental research*, 88(11):982–90, 2009. ISSN 1544-0591. doi:10.1177/0022034509346811. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828884>.
- Holdeman, L. V. New genus, *Coprococcus*, twelve new species, and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human feces. *International Journal of*, 41(11):411–6, 1974. ISSN 0002-9335. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/56133>.
- Holdeman, L; Good, I; y Moore, W. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Applied and environmental microbiology*, 31(3):359, 1976. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/31/3/359>.



- Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; y Others. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. London: Williams and Wilkins, 1994, 1994. URL <http://pgim.srilanka.healthrepository.org/handle/123456789/12240>.
- Hooper, L. V y Macpherson, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews. Immunology*, 10(3):159–69, 2010. ISSN 1474-1741. doi:10.1038/nri2710. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182457>.
- Hooper, L; Midtvedt, T; y Gordon, J. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22(1):283–307, 2002. URL <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259>.
- Hoyles, L. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 52(3):995–999, 2002. ISSN 14665026. doi:10.1099/ijs.0.02065-0. URL <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.02065-0>.
- Hsiao, W. W. L y Fraser-Liggett, C. M. Human Microbiome Project—paving the way to a better understanding of ourselves and our microbes. *Drug discovery today*, 14(7-8):331–3, 2009. ISSN 1878-5832. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19340927>.
- Hunt, K. M; Foster, J. a; Forney, L. J; Schütte, U. M. E; Beck, D. L; et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS one*, 6(6):e21313, 2011. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0021313. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3117882&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hurley, B. W y Nguyen, C. C. The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Archives of internal medicine*, 162(19):2177–84, 2002. ISSN 0003-9926. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390059>.
- Hyman, R. W; Fukushima, M; Diamond, L; Kumm, J; Giudice, L. C; et al. Microbes on the human vaginal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22):7952–7, 2005. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.0503236102. URL <http://www.pnas.org/content/102/22/7952.short>.
- Janda, J y Abbott, S. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9):2761–2764, 2007a. doi:10.1128/JCM.01228-07. URL <http://jcm.asm.org/content/45/9/2761>.
- Janda, J y Abbott, S. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9):2761–2764, 2007b. doi:10.1128/JCM.01228-07. URL <http://jcm.asm.org/content/45/9/2761>.

- Jeffrey, W; Von Haven, R; Hoch, M; y Coffin, R. Bacterioplankton RNA, DNA, protein content and relationships to rates of thymidine and leucine incorporation. *Aquatic Microbial Ecology*, 10(1):87–95, 1996. ISSN 0948-3055. doi:10.3354/ame010087. URL <http://www.int-res.com/abstracts/ame/v10/n1/p87-95/>.
- Jochem, F. J; Smith, G. J; Gao, Y; Zimmerman, R. C; Cabello-Pasini, a; et al. Cytometric quantification of nitrate reductase by immunolabeling in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Cytometry*, 39(3):173–178, 2000. ISSN 0196-4763. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685073>.
- Jones, S. E y Lennon, J. T. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13):5881–6, 2010. ISSN 1091-6490. doi:10.1073/pnas.0912765107. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2851880&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Josephson, K. L; Gerba, C. P; y Pepper, I. L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 59(10):3513–5, 1993. ISSN 0099-2240. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182487&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kaeberlein, T; Lewis, K; y Epstein, S. S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5570):1127–9, 2002. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1070633. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12004133>.
- Kageyama, A y Benno, Y. Phylogenetic and phenotypic evidence for the transfer of *Eubacterium aerofaciens* to the genus *Collinsella* as *Collinsella aerofaciens* gen. nov., comb. nov. *International journal of*, 1999. URL <http://ijs.sgmjournals.org/content/49/2/557.short>.
- Kamentsky, L. A y Melamed, M. R. Spectrophotometric Cell Sorter. *Science*, 156(3780):1364–1365, 1967. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.156.3780.1364. URL <http://www.sciencemag.org/content/156/3780/1364.short>.
- Kang, S; Denman, S; Morrison, M; Yu, Z; Dore, J; et al. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn’s disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflammatory bowel diseases*, 2010. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ibd.21319/full>.
- Kemp, P. F; Lee, S; y Laroche, J. Estimating the growth rate of slowly growing marine bacteria from RNA content. *Applied and environmental microbiology*, 59(8):2594–2601, 1993a. ISSN 0099-2240. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Kemp, P. F; Lee, S; y LARoche, J. Estimating the Growth Rate of Slowly Growing Marine Bacteria from RNA Content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(8):2594–2601, 1993b. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/59/8/2594>.
- Kim, T. K; Thomas, S. M; Ho, M; Sharma, S; Reich, C. I; et al. Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. *Journal of clinical microbiology*, 47(4):1181–9, 2009. ISSN 1098-660X. doi:10.1128/JCM.00854-08. URL <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/47/4/1181>.
- Kinch, L. N y Grishin, N. V. Evolution of protein structures and functions. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(3):400–408, 2002. ISSN 0959440X. doi:10.1016/S0959-440X(02)00338-X. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X0200338X>.
- Kinross, J. M; Darzi, A. W; y Nicholson, J. K. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome medicine*, 3(3):14, 2011. ISSN 1756-994X. doi:10.1186/gm228. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21392406>.
- Koenig, J. E; Spor, A; Scalfone, N; Fricker, A. D; Stombaugh, J; et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl(Supplement 1):4578–85, 2011. ISSN 1091-6490. doi:10.1073/pnas.1000081107. URL <http://www.pnas.org/content/108/suppl.1/4578.short>.
- Konstantinidis, K y Tiedje, J. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of bacteriology*, 187(18):6258, 2005. doi:10.1128/JB.187.18.62586264.2005. URL <http://jb.asm.org/cgi/content/abstract/187/18/6258>.
- Kretschmer, F; Chang, A; y Cohen, S. Indirect selection of bacterial plasmids lacking identifiable phenotypic properties. *Journal of bacteriology*, 124(1):225, 1975. URL <http://jb.asm.org/cgi/content/abstract/124/1/225>.
- Krieger, J. Urinary Tract Infections: What's New? *The Journal of urology*, 168(6):2351–2358, 2002. ISSN 00225347. doi:10.1016/S0022-5347(05)64145-6. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022534705641456>.
- Kulp, W y Rettger, L. Comparative Study of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*, 9(4):357, 1924. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC379059/>.
- Kurokawa, K; Itoh, T; Kuwahara, T; Oshima, K; Toh, H; et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 14(4):169–181, 2007.

- ISSN 1340-2838. doi:10.1093/dnares/dsm018. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2533590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- La Duc, M. T; Dekas, A; Osman, S; Moissl, C; Newcombe, D; et al. Isolation and characterization of bacteria capable of tolerating the extreme conditions of clean room environments. *Applied and environmental microbiology*, 73(8):2600–11, 2007. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.03007-06. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1855582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lander, E. S; Linton, L. M; Birren, B; Nusbaum, C; Zody, M. C; et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921, 2001. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/35057062. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011>.
- Lane, D. D. J; Stackenbrandt, E; y Goodfellow, M. *16S/23S rRNA sequencing*. John Wiley and Sons, nucleic acid ed<sup>ón</sup>, 1991.
- Larson, H; Price, A; y Honour, P. Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. *The Lancet*, 1978. URL [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140-6736\(78\)90912-1](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140-6736(78)90912-1).
- Lawton, J. H; Daily, G; y Newton, I. Population Dynamic Principles [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 344(1307):61–68, 1994. ISSN 0962-8436. doi:10.1098/rstb.1994.0052. URL <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1994.0052>.
- Lay, C; Rigottier-Gois, L; Holmstrom, K; Rajilic, M; Vaughan, E. E; et al. Colonic Microbiota Signatures across Five Northern European Countries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7):4153–4155, 2005. doi:10.1128/AEM.71.7.4153-4155.2005. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/71/7/4153>.
- Lee, Y. K; Menezes, J. S; Umesaki, Y; y Mazmanian, S. K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl:4615–22, 2011. ISSN 1091-6490. doi:10.1073/pnas.1000082107. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3063590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lennon, J. T y Jones, S. E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nature reviews. Microbiology*, 9(2):119–30, 2011. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro2504. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21233850>.
- Lenz, P y Sogaard-Andersen, L. Temporal and spatial oscillations in bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 9(8):565–77, 2011. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro2612. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21760621>.

- Levin, B. R y Rozen, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 4(7):556–62, 2006. ISSN 1740-1526. doi:10.1038/nrmicro1445. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778840>.
- Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature reviews. Microbiology*, 5(1):48–56, 2007. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro1557. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17143318>.
- Ley, R; Turnbaugh, P; Klein, S; y Gordon, J. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122):1022–1023, 2006. URL <http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7122/full/4441022a.html?lang=en>.
- Ley, R. E; Bäckhed, F; Turnbaugh, P; Lozupone, C. A; Knight, R. D; et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31):11070–5, 2005. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.0504978102. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1176910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Li, W y Godzik, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13):1658–1659, 2006. URL <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/22/13/1658.short>.
- Lina, G; Boutite, F; Tristan, A; Bes, M; Etienne, J; et al. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal agr alleles. *Applied and environmental microbiology*, 69(1):18, 2003. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/69/1/18>.
- Livorsi, D. J; Stenehjem, E; y Stephens, D. S. Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on *Neisseria meningitidis*. *Contributions to microbiology*, 17:31–47, 2011. ISSN 1662-291X. doi:10.1159/000324008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659746>.
- Logan, A. C; Venket Rao, A; y Irani, D. Chronic fatigue syndrome: lactic acid bacteria may be of therapeutic value. *Medical Hypotheses*, 60(6):915–923, 2003. ISSN 03069877. doi:10.1016/S0306-9877(03)00096-3. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987703000963>.
- Lomas, M. W; Bronk, D. a; y Engh, Gvan den. Use of Flow Cytometry to Measure Biogeochemical Rates and Processes in the Ocean. *Annual Review of Marine Science*, 3(1):537–566, 2011. ISSN 1941-1405. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142834. URL <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-marine-120709-142834>.
- Lotz, M; Gütle, D; Walther, S; Ménard, S; Bogdan, C; et al. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *The Journal of experimental medicine*, 203(4):973–84,

2006. ISSN 0022-1007. doi:10.1084/jem.20050625. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2118301&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Louis, P; Duncan, S; McCrae, S; Millar, J; Jackson, M; et al. Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon. *Journal of bacteriology*, 186(7):2099, 2004. URL <http://jb.asm.org/cgi/content/abstract/186/7/2099>.
- Ludwig, W. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International journal of food microbiology*, 120(3):225–236, 2007. ISSN 0168-1605. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.023. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961780>.
- Macfarlane, G; Gibson, G; y Cummings, J. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *Journal of applied microbiology*, 72(1):57–64, 1992. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04882.x/abstract>.
- Macfarlane, S y Dillon, J. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, 102(5):1187–1196, 2007. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03287.x/full>.
- Macpherson, A y Geuking, M. Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria. *Immunology*, 2005. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2567.2005.02159.x/full>.
- Macpherson, A y Uhr, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303(5664):1662, 2004. URL <http://www.sciencemag.org/content/303/5664/1662.short>.
- Mahony, D. E; Meier, C. E; Macdonald, I. A; y Holdeman, L. V. Bile salt degradation by nonfermentative clostridia. *Applied and environmental microbiology*, 34(4):419–23, 1977. ISSN 0099-2240. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=242673&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Makino, H; Kushiro, A; Ishikawa, E; Muylaert, D; Kubota, H; et al. Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and environmental microbiology*, 77(19):6788–93, 2011. ISSN 1098-5336. doi:10.1128/AEM.05346-11. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821739>.
- Mändar, R y Mikelsaar, M. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biology of the neonate*, 69(1):30–5, 1996. ISSN 0006-3126. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8777246>.

- Marsh, P. D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC oral health*, 6 Suppl 1:S14, 2006. ISSN 1472-6831. doi:10.1186/1472-6831-6-S1-S14. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2147593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Marsh, P. D. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dental clinics of North America*, 54(3):441-54, 2010. ISSN 1558-0512. doi:10.1016/j.cden.2010.03.002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20630188>.
- Martín, R; Heilig, H. G. H. J; Zoetendal, E. G; Jiménez, E; Fernández, L; et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in microbiology*, 158(1):31-7, 2007. ISSN 0923-2508. doi:10.1016/j.resmic.2006.11.004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17224259>.
- Mazmanian, S. K; Liu, C. H; Tzianabos, A. O; y Kasper, D. L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1):107-18, 2005. ISSN 0092-8674. doi:10.1016/j.cell.2005.05.007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009137>.
- McCulley, J. P y Shine, W. E. Eyelid disorders: the meibomian gland, blepharitis, and contact lenses. *Eye & contact lens*, 29(1 Suppl):S93-5; discussion S115-8, S192-4, 2003. ISSN 1542-2321. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12772741>.
- Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 1(2):135-45, 2001. ISSN 1474-1733. doi:10.1038/35100529. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905821>.
- Meier, H; Amann, R; Ludwig, W; y Schleifer, K. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+ C content. *Systematic and applied microbiology*, 22(2):186-196, 1999. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202099800654>.
- Moldavan, A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. *Science*, 80(2069):188-9, 1934. ISSN 0036-8075. doi:10.1126/science.80.2069.188. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17817054>.
- Molin, S y Givskov, M. Application of molecular tools for in situ monitoring of bacterial growth activity. *Environmental microbiology*, 1(5):383-91, 1999. ISSN 1462-2912. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11207757>.
- Moody, F. G; Haley-Russell, D; y Muncy, D. M. Intestinal transit and bacterial translocation in obstructive pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 40(8):1798-1804, 1995. ISSN 0163-2116. doi:10.1007/BF02212705. URL <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02212705>.

- Morotomi, M; Kawai, Y; y Mutai, M. Intestinal microflora in rats: isolation and characterization of strictly anaerobic bacteria requiring long-chain fatty acids. *Applied and environmental microbiology*, 31(4):475, 1976. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/31/4/475>.
- Muegge, B. D; Kuczynski, J; Knights, D; Clemente, J. C; González, A; et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*, 332(6032):970–4, 2011. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1198719. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596990>.
- Mulder, I. E; Schmidt, B; Stokes, C. R; Lewis, M; Bailey, M; et al. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC biology*, 7:79, 2009. ISSN 1741-7007. doi:10.1186/1741-7007-7-79. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2785767&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Müller, S; Harms, H; y Bley, T. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. *Current opinion in biotechnology*, 21(1):100–113, 2010. ISSN 1879-0429. doi:10.1016/j.copbio.2010.01.002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20138500>.
- Musfeldt, M; Ott, S. J; Ku, T; Rosenstiel, P; Hellmig, S; et al. Fungi and inflammatory bowel diseases: Alterations of composition and diversity. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 43(7):831–41, 2008. ISSN 1502-7708. doi:10.1080/00365520801935434. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18584522>.
- Nagai, F; Morotomi, M; Watanabe, Y; Sakon, H; y Tanaka, R. *Alistipes indistinctus* sp. nov. and *Odoribacter laneus* sp. nov., common members of the human intestinal microbiota isolated from faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(Pt 6):1296–302, 2010. ISSN 1466-5026. doi:10.1099/ij.s.0.014571-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19667375>.
- Nava, G. M y Stappenbeck, T. S. Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut microbes*, 2(2):99–104, 2011. ISSN 1949-0984. doi:10.4161/gmic.2.2.15416. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21694499>.
- Nelson, D. E; Van Der Pol, B; Dong, Q; Revanna, K. V; Fan, B; et al. Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. *PloS one*, 5(11):e14116, 2010. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0014116. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2991352&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Nelson, K. E, ed. *Metagenomics of the Human Body*. Springer New York, New York, NY, 2011. ISBN 978-1-4419-7088-6. doi:10.1007/978-1-4419-7089-3. URL <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4419-7089-3>.



- Niu, B; Fu, L; y Sun, S. Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data. *BMC bioinformatics*, 2010. URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/187/abstract>.
- Noack, S; Klöden, W; y Bley, T. Modeling synchronous growth of bacterial populations in phased cultivation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 31(5):435–443, 2008. ISSN 1615-7591. doi: 10.1007/s00449-007-0180-6. URL <http://www.ingentaconnect.com/content/klu/449/2008/00000031/00000005/00000180>.
- Nobbs, A. H; Lamont, R. J; y Jenkinson, H. F. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(3):407–50, Table of Contents, 2009. ISSN 1098-5557. doi:10.1128/MMBR.00014-09. URL <http://mbr.asm.org/cgi/content/abstract/73/3/407>.
- Novo, D. J; Perlmutter, N. G; Hunt, R. H; y Shapiro, H. M. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(4):827–834, 2000. ISSN 0066-4804. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=89778&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- O’Grady, N. P; Alexander, M; Dellinger, E. P; Gerberding, J. L; Heard, S. O; et al. Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections. *PEDIATRICS*, 110(5):e51–e51, 2002. ISSN 0031-4005. doi:10.1542/peds.110.5.e51. URL <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.110.5.e51>.
- Onderdonk, A; Johnston, J; Mayhew, J; y Gorbach, S. Effect of dissolved oxygen and Eh and *Bacteroides fragilis* during continuous culture. *Applied and environmental microbiology*, 31(2):168–172, 1976. URL <http://aem.asm.org/content/31/2/168.short>.
- Oren, A. Prokaryote diversity and taxonomy: current status and future challenges. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359(1444):623–38, 2004. ISSN 0962-8436. doi:10.1098/rstb.2003.1458. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1693353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Osullivan, M. M; Kelly, A. L; y Fox, P. F. Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: a possible mechanism. *Journal of dairy science*, 85(1):1–7, 2002. ISSN 0022-0302. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860101>.
- Ott, S. J; Musfeldt, M; Timmis, K. N; Hampe, J; Wenderoth, D. F; et al. In vitro alterations of intestinal bacterial microbiota in fecal samples during storage. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 50(4):237–45, 2004. ISSN 0732-8893. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2004.08.012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582296>.

- Pace, N. R. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*, 276(5313):734–740, 1997. ISSN 00368075. doi:10.1126/science.276.5313.734. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.276.5313.734>.
- Palmer, C; Bik, E. M; DiGiulio, D. B; Relman, D. a; y Brown, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5(7):e177, 2007. ISSN 1545-7885. doi:10.1371/journal.pbio.0050177. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17594176>.
- Pando, B. F y Oudenaarden, Avan. Coupling cellular oscillators–circadian and cell division cycles in cyanobacteria. *Current opinion in genetics & development*, 20(6):613–618, 2010. ISSN 1879-0380. doi:10.1016/j.gde.2010.09.001. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X10001607>.
- Penders, J; Thijs, C; Vink, C; Stelma, F. F; Snijders, B; et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2):511–21, 2006. ISSN 1098-4275. doi:10.1542/peds.2005-2824. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882802>.
- Pérez, P. F; Doré, J; Leclerc, M; Levenez, F; Benyacoub, J; et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119(3):e724–32, 2007. ISSN 1098-4275. doi:10.1542/peds.2006-1649. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332189>.
- Peris-Bondia, F; Latorre, A; Artacho, A; Moya, A; y D’ Auria, G. The Active Human Gut Microbiota Differs from the Total Microbiota. *PLoS ONE*, 6(7):e22448, 2011. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0022448. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022448>.
- Peterson, J; Garges, S; Giovanni, M; McInnes, P; Wang, L; et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome research*, 19(12):2317–23, 2009. ISSN 1549-5469. doi:10.1101/gr.096651.109. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2792171&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Podar, M; Abulencia, C. B; Walcher, M; Hutchison, D; Zengler, K; et al. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 73(10):3205–14, 2007. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.02985-06. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/73/10/3205>.
- Prakash, S; Rodes, L; Coussa-Charley, M; y Tomaro-Duchesneau, C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics : targets & therapy*, 5:71–86, 2011. ISSN 1177-5491. doi:10.2147/BTT.S19099. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3156250&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Price, L; Liu, C; Melendez, J; Frankel, Y; Engelthaler, D; et al. Community analysis of chronic wound bacteria using 16S rRNA gene-based pyrosequencing: impact of diabetes and antibiotics

- on chronic wound microbiota. *PLoS One*, 4(7):e6462, 2009. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006462>.
- Pruesse, E; Quast, C; Knittel, K; Fuchs, B. M; Ludwig, W; et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids research*, 35(21):7188–96, 2007. ISSN 1362-4962. doi:10.1093/nar/gkm864. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2175337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Qin, J; Li, R; Raes, J; Arumugam, M; Burgdorf, K. S; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285):59–65, 2010. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature08821. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203603>.
- R-Team. *R: A language and environment for statistical computing*. 01/19. R foundation for statistical computing, 2010. URL <http://www.mendeley.com/research/r-language-environment-statistical-computing-96/>.
- Rakoff-Nahoum, S; Paglino, J; Eslami-Varzaneh, F; Edberg, S; y Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2):229–41, 2004. ISSN 0092-8674. doi:10.1016/j.cell.2004.07.002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15260992>.
- Ramsay, D. T; Kent, J. C; Owens, R. a; y Hartmann, P. E. Ultrasound Imaging of Milk Ejection in the Breast of Lactating Women. *PEDIATRICS*, 113(2):361–367, 2004. ISSN 0031-4005. doi:10.1542/peds.113.2.361. URL <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.113.2.361>.
- Rao, T. Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a fresh-water cooling system. *Corrosion Science*, 42(8):1417–1431, 2000. ISSN 0010938X. doi:10.1016/S0010-938X(99)00141-9. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010938X99001419>.
- Rappé, M. S y Giovannoni, S. J. The uncultured microbial majority. *Annual review of microbiology*, 57:369–94, 2003. ISSN 0066-4227. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090759. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527284>.
- Reid, G y Bruce, A. W. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World journal of urology*, 24(1):28–32, 2006. ISSN 0724-4983. doi:10.1007/s00345-005-0043-1. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16389539>.
- Reid, G; Dols, J; y Miller, W. Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 12(6):583–7,

2009. ISSN 1473-6519. doi:10.1097/MCO.0b013e328331b611. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19741517>.
- Reid, G; Younes, J. a; Van der Mei, H. C; Gloor, G. B; Knight, R; et al. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature reviews. Microbiology*, 9(1):27–38, 2011. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro2473. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2473>.
- Reis, R. S; Pereira, A. G; Neves, B. C; y Freire, D. M. G. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*—a review. *Bioresource technology*, 102(11):6377–84, 2011. ISSN 1873-2976. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.074. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21498076>.
- Roberts, A. P y Mullany, P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends in microbiology*, 17(6):251–8, 2009. ISSN 1878-4380. doi:10.1016/j.tim.2009.03.002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19464182>.
- Rochet, V; Rigottier-Gois, L; Rabot, S; y Doré, J. Validation of fluorescent in situ hybridization combined with flow cytometry for assessing interindividual variation in the composition of human fecal microflora during long-term storage of samples. *Journal of microbiological methods*, 59(2):263–70, 2004. ISSN 0167-7012. doi:10.1016/j.mimet.2004.07.012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15369862>.
- Rodriguez-Valera, F; Martin-Cuadrado, A.-B; Rodriguez-Brito, B; Pasić, L; Thingstad, T. F; et al. Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nature reviews. Microbiology*, 7(11):828–36, 2009. ISSN 1740-1534. doi:10.1038/nrmicro2235. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834481>.
- Rudney, J. D; Xie, H; Rhodus, N. L; Ondrey, F. G; y Griffin, T. J. A metaproteomic analysis of the human salivary microbiota by three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry. *Molecular oral microbiology*, 25(1):38–49, 2010. ISSN 2041-1014. doi:10.1111/j.2041-1014.2009.00558.x. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2041-1014.2009.00558.x/full>.
- Sakamoto, M. *Prevotella shahii* sp. nov. and *Prevotella salivae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 54(3):877–883, 2004. ISSN 1466-5026. doi:10.1099/ijs.0.02876-0. URL <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.02876-0>.
- Salminen, S y Isolauri, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *The Journal of Pediatrics*, 149(5):S115–S120, 2006. ISSN 00223476. doi:10.1016/j.jpeds.2006.06.062. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347606006238>.

- Samuel, B. S; Shaito, A; Motoike, T; Rey, F. E; Backhed, F; et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43):16767–72, 2008. ISSN 1091-6490. doi:10.1073/pnas.0808567105. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2569967&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sanz, Y; Santacruz, A; y De Palma, G. Insights into the roles of gut microbes in obesity. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2008:829101, 2008. ISSN 1687-708X. doi:10.1155/2008/829101. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2648620&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sarkar, D; Le Meur, N; y Gentleman, R. Using flowViz to visualize flow cytometry data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(6):878–9, 2008. ISSN 1367-4811. doi:10.1093/bioinformatics/btn021. URL <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/24/6/878.short>.
- Savage, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual review of microbiology*, 31(1):107–33, 1977. ISSN 0066-4227. doi:10.1146/annurev.mi.31.100177.000543. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/334036>.
- Savage, D y Dubos, R. The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. *The Journal of*, 127(1):67–76, 1968. ISSN 0022-1007. doi:10.1084/jem.127.1.67. URL <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.127.1.67>.
- Scheppach, W y Weiler, F. The butyrate story: old wine in new bottles? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 7(5):563, 2004. URL [http://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/Abstract/2004/09000/The\\_butyrate\\_story\\_old\\_wine\\_in\\_new\\_bottles\\_.9.aspx](http://journals.lww.com/co-clinicalnutrition/Abstract/2004/09000/The_butyrate_story_old_wine_in_new_bottles_.9.aspx).
- Schmidt, T y Konopka, A. E. Physiological and Ecological Adaptations of Slow-Growing, Heterotrophic Microbes and Consequences for Cultivation. *Uncultivated Microorganisms*, 2009. doi:10.1007/7171\2008\11. URL <http://www.springerlink.com/index/A35657X5G31N5UL0.pdf>.
- Science, F; Zwietering, M. H; Jongenburger, I; Rombouts, F. M; y van 't Riet, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56(6):1875–81, 1990. ISSN 0099-2240. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Seal, D. V; McGill, J. I; Mackie, I. a; Liakos, G. M; Jacobs, P; et al. Bacteriology and tear protein profiles of the dry eye. *British Journal of Ophthalmology*, 70(2):122–125, 1986. ISSN 0007-1161. doi:10.1136/bjo.70.2.122. URL <http://bjo.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjo.70.2.122>.

- Sekar, R; Pernthaler, A; Pernthaler, J; Warnecke, F; Posch, T; et al. An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5):2928, 2003. doi:10.1128/AEM.69.5.2928-2935.2003. URL <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/69/5/2928>.
- Shank, E. A y Kolter, R. Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*, 14(6):741–7, 2011. ISSN 1879-0364. doi:10.1016/j.mib.2011.09.016. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22024380>.
- Shapiro, H y Leif, R. *Practical flow cytometry*. Wiley Online Library, 2003. ISBN 0471411256. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471722731.fmatter/summary>.
- Sherr, B; Giorgio, Pdel; y Sherr, E. Estimating abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC. *Aquatic Microbial Ecology*, 18:117–131, 1999. ISSN 0948-3055. doi:10.3354/ame018117. URL <http://www.int-res.com/abstracts/ame/v18/n2/p117-131/>.
- Sherr, E. B; Sherr, B. F; y Verity, P. G. Distribution and relation of total bacteria, active bacteria, bacterivory, and volume of organic detritus in Atlantic continental shelf waters off Cape Hatteras NC, USA. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 49(20):4571–4585, 2002. ISSN 09670645. doi:10.1016/S0967-0645(02)00129-7. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0967064502001297>.
- Shiratori, H; Sasaya, K; Ohiwa, H; Ikeno, H; Ayame, S; et al. *Clostridium clariflavum* sp. nov. and *Clostridium caenicola* sp. nov., moderately thermophilic, cellulose-/cellobiose-digesting bacteria isolated from methanogenic sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(Pt 7):1764–70, 2009. ISSN 1466-5026. doi:10.1099/ijs.0.003483-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19542130>.
- Shooter, R. A. Microbial Pathogenicity in Man and Animals. *Journal of Clinical Pathology*, 25(10):919–919, 1972. ISSN 0021-9746. doi:10.1136/jcp.25.10.919-a. URL <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.25.10.919-a>.
- Sleator, R. D. The human superorganism - of microbes and men. *Medical hypotheses*, 74(2):214–215, 2010. ISSN 1532-2777. doi:10.1016/j.mehy.2009.08.047. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836146>.
- Smith, K; McCoy, K. D; y Macpherson, A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in immunology*, 19(2):59–69, 2007. ISSN 1044-5323. doi:10.1016/j.smim.2006.10.002. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118672>.
- Sogin, M. L; Morrison, H. G; Huber, J. a; Mark Welch, D; Huse, S. M; et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored rare biosphere". *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America*, 103(32):12115–20, 2006. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0605127103. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1524930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sokol, H; Pigneur, B; Watterlot, L; Lakhdari, O; Bermúdez-Humarán, L; et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43):16731, 2008. URL <http://www.pnas.org/content/105/43/16731.short>.
- Song, L y Dong, X. Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans gen. nov., sp. nov., isolated from H<sub>2</sub>-producing UASB granules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(2):295, 2009. URL <http://ijs.sgmjournals.org/content/59/2/295.short>.
- Staden, R y Beal, K. The staden package, 1998. *Methods Mol Biol*, 2000. URL <http://www.springerlink.com/index/u553155x5012t152.pdf>.
- Staley, J. T y Konopka, A. Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39(1):321–346, 1985. doi:10.1146/annurev.mi.39.100185.001541. URL <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>.
- Stappenbeck, T. S; Hooper, L. V; y Gordon, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24):15451–5, 2002. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.202604299. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=137737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Stark, P. L y Lee, A. The Microbial Ecology of the Large Bowel of Breastfed and Formula-fed Infants During the First Year of Life. *Journal of Medical Microbiology*, 15(2):189–203, 1982. ISSN 0022-2615. doi:10.1099/00222615-15-2-189. URL <http://jmm.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00222615-15-2-189>.
- Stecher, B y Hardt, W.-D. The role of microbiota in infectious disease. *Trends in microbiology*, 16(3):107–14, 2008. ISSN 0966-842X. doi:10.1016/j.tim.2007.12.008. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280160>.
- Stepanauskas, R y Sieracki, M. E. Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(21):9052–9057, 2007. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.0700496104. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1885626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Stevenson, B; Eichorst, S; y Wertz, J. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Applied and*, 70(8):4748–4755, 2004. doi:10.1128/AEM.70.8.4748-4755. 2004. URL <http://aem.asm.org/content/70/8/4748.short>.
- Sturme, M; Kleerebezem, M; Nakayama, J; Akkermans, A; Vaughan, E; et al. Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1):233–243, 2002. URL <http://www.springerlink.com/index/tl16w12422q28122.pdf>.
- Szefer, S. J. Advances in pediatric asthma in 2009: gaining control of childhood asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(1):69–78, 2010. ISSN 1097-6825. doi:10.1016/j.jaci.2009.11.006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20109738>.
- Tamboli, C. P. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(1):1–4, 2004. ISSN 0017-5749. doi:10.1136/gut.53.1.1. URL <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.53.1.1>.
- Tan, H; Tan, S; Lin, Q; Lim, T; Hew, C; et al. Quantitative and temporal proteome analysis of butyrate-treated colorectal cancer cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(6):1174–1185, 2008. URL <http://www.mcponline.org/content/7/6/1174.short>.
- Ternouth, J. H. The rumen and its microbes. *Australian Veterinary Journal*, 44(2):47–47, 1968. ISSN 0005-0423. doi:10.1111/j.1751-0813.1968.tb04952.x. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-0813.1968.tb04952.x/abstract>.
- Tortora, G; Funke, B; y Case, C. *Microbiology: an introduction*. Benjamin-Cummings Publishing Company, tenth edit ed<sup>ón</sup>, 1986. ISBN 0805393153. URL <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=SIBEO1.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=036855>.
- Turnbaugh, P. J; Hamady, M; Yatsunencko, T; Cantarel, B. L; Duncan, A; et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228):480–4, 2009a. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature07540. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2677729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Turnbaugh, P. J; Ley, R. E; Hamady, M; Fraser-Liggett, C. M; Knight, R; et al. The human microbiome project. *Nature*, 449(7164):804–810, 2007. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature06244. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943116>.
- Turnbaugh, P. J; Ridaura, V. K; Faith, J. J; Rey, F. E; Knight, R; et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*, 1(6):6ra14, 2009b. ISSN 1946-6242. doi:10.1126/scitranslmed.3000322. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2894525&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.



- Tyson, G. W; Chapman, J; Hugenholtz, P; Allen, E. E; Ram, R. J; et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428(6978):37–43, 2004. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961025>.
- Vaishampayan, P. a; Kuehl, J. V; Froula, J. L; Morgan, J. L; Ochman, H; et al. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome biology and evolution*, 2:53–66, 2010. ISSN 1759-6653. doi:10.1093/gbe/evp057. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2839348&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Van Wey, A. S; Cookson, A. L; Roy, N. C; McNabb, W. C; Soboleva, T. K; et al. Bacterial biofilms associated with food particles in the human large bowel. *Molecular nutrition & food research*, 55(7):969–78, 2011. ISSN 1613-4133. doi:10.1002/mnfr.201000589. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21638777>.
- Venter, J. C; Remington, K; Heidelberg, J. F; Halpern, A. L; Rusch, D; et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5667):66–74, 2004. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1093857. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001713>.
- Vijay-Kumar, M; Aitken, J; Carvalho, F; Cullender, T; Mwangi, S; et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*, 328(5975):228, 2010. URL <http://www.sciencemag.org/content/328/5975/228.short>.
- Voget, S; Klippel, B; Daniel, R; y Antranikian, G. Complete genome sequence of Carnobacterium sp. 17-4. *Journal of bacteriology*, 193(13):3403–4, 2011. ISSN 1098-5530. doi:10.1128/JB.05113-11. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3133254&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wang, Q; Garrity, G; Tiedje, J; y Cole, J. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16):5261–5267, 2007. URL <http://aem.asm.org/content/73/16/5261.short>.
- Wanner, B. L. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *Journal of cellular biochemistry*, 51(1):47–54, 1993. ISSN 0730-2312. doi:10.1002/jcb.240510110. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8432742>.
- Webb, J; Lau, M; y Kjelleberg, S. Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of bacteriology*, 186(23):8066, 2004. doi:10.1128/JB.186.23.8066. URL <http://jb.asm.org/cgi/content/abstract/186/23/8066>.

- Wei, C; Lamesch, P; Arumugam, M; Rosenberg, J; Hu, P; et al. Closing in on the *C. elegans* ORFeome by cloning TWINSKAN predictions. *Genome research*, 15(4):577–82, 2005. ISSN 1088-9051. doi:10.1101/gr.3329005. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1074372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Weisburg, W. G; Barns, S. M; Pelletier, D. A; y Lane, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2):697–703, 1991. ISSN 0021-9193. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=207061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Weller, R; Glöckner, F. O; y Amann, R. 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the in situ detection of members of the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. *Systematic and applied microbiology*, 23(1):107–14, 2000. ISSN 0723-2020. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10879984>.
- Wen, L; Ley, R; Volchkov, P; Stranges, P; Avanesyan, L; et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 455(7216):1109–1113, 2008. URL <http://www.nature.com/nature/journal/v455/n7216/full/nature07336.html?free=2>.
- Wendt-Potthoff, K y Koschorreck, M. Functional groups and activities of bacteria in a highly acidic volcanic mountain stream and lake in Patagonia, Argentina. *Microbial ecology*, 43(1):92–106, 2002. ISSN 0095-3628. doi:10.1007/s00248-001-1030-8. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11984632>.
- Wertz, J; Isaacs-Cosgrove, N; Holzman, C; y Marsh, T. L. Temporal Shifts in Microbial Communities in Nonpregnant African-American Women with and without Bacterial Vaginosis. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2008:181253, 2008. ISSN 1687-708X. doi:10.1155/2008/181253. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2648625&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Whitehead, T. R. *Hespellia stercorisuis* gen. nov., sp. nov. and *Hespellia porcina* sp. nov., isolated from swine manure storage pits. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 54(1):241–245, 2004. ISSN 1466-5026. doi:10.1099/ijs.0.02719-0. URL <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.02719-0>.
- Whitman, W. B; Coleman, D. C; y Wiebe, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12):6578–83, 1998. ISSN 0027-8424. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=33863&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wilmes, P y Bond, P. L. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. *Trends in microbiology*, 14(2):92–7, 2006. ISSN 0966-842X. doi:10.1016/j.tim.2005.12.006. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16406790>.

- Wilson, I. D y Nicholson, J. K. The role of gut microbiota in drug response. *Current pharmaceutical design*, 15(13):1519–23, 2009. ISSN 1873-4286. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19442168>.
- Woese, C. R y Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11):5088–90, 1977. ISSN 0027-8424. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=432104&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Woese, C y Kandler, O. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the*, 1990. URL <http://www.pnas.org/content/87/12/4576.short>.
- Wolf, Y. I; Rogozin, I. B; Kondrashov, A. S; y Koonin, E. V. Genome alignment, evolution of prokaryotic genome organization, and prediction of gene function using genomic context. *Genome research*, 11(3):356–72, 2001. ISSN 1088-9051. doi:10.1101/gr.161901. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230160>.
- Wood, M. J; Hyman, N; Hebert, J. C; y Blaszyk, H. Catastrophic *Clostridium difficile* enteritis in a pelvic pouch patient: report of a case. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 12(2):350–2, 2008. ISSN 1091-255X. doi:10.1007/s11605-007-0440-4. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18071831>.
- Woodford, N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microbial drug resistance (Larchmont, N. Y.)*, 7(3):229–36, 2001. ISSN 1076-6294. doi:10.1089/10766290152652774. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11759084>.
- Wu, G; Lewis, J; Hoffmann, C; Chen, Y; Knight, R; et al. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC microbiology*, 10(1):206, 2010. URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/206>.
- Wu, Q y Chu, H. W. Role of infections in the induction and development of asthma: genetic and inflammatory drivers. *Expert review of clinical immunology*, 5(1):97–109, 2009. ISSN 1744-8409. doi:10.1586/1744666X.5.1.97. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2718769&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Xu, J y Gordon, J. I. Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18):10452–9, 2003. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.1734063100. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=193582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yakimov, M; Gentile, G; Bruni, V; Cappello, S; D' Auria, G; et al. Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and

- characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS microbiology ecology*, 49(3):419–432, 2004. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.femsec.2004.04.018/full>.
- Yang, X; Xie, L; Li, Y; y Wei, C. More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: estimating gene numbers inside a human body. *PloS one*, 4(6):e6074, 2009. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0006074. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2699651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Younes, H; Coudray, C; Bellanger, J; Demigné, C; Rayssiguier, Y; et al. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*, 86(4):479–485, 2001. URL <http://journals.cambridge.org/production/action/cjoGetFulltext?fulltextid=891668>.
- Zaballos, M; López-López, A; Ovreas, L; Bartual, S. G; D' Auria, G; et al. Comparison of prokaryotic diversity at offshore oceanic locations reveals a different microbiota in the Mediterranean Sea. *FEMS microbiology ecology*, 56(3):389–405, 2006. ISSN 0168-6496. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00060.x. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16689872>.
- Zengler, K. Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(4):712–729, 2009. ISSN 1098-5557. doi:10.1128/MMBR.00027-09. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786577&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

---

# Apéndice A

## *Short English version*

Prokaryotes are unicellular organisms that are spread all over the world (La Duc et al., 2007; Rao, 2000; Wendt-Potthoff y Koschorreck, 2002; Zaballos et al., 2006). The number of prokariotic cells is estimated in  $5 \cdot 10^{30}$  and they contain the half of the carbon of all living organisms (Whitman et al., 1998). The number of bacterial species was estimated between  $10^5$  and  $10^7$  (Finlay y Maberly, 1997; Oren, 2004). They can live in monospecific colonies or in complex communities and they can be found interacting with animals or plants (Dethlefsen et al., 2007).

The microbial community inhabiting the human body, counts with  $10^{13}$  cells with a gene number calculated to be 10 fold the number of human genes (Lander et al., 2001; Savage, 1977; Yang et al., 2009). Human microbiota has several effects on the host health justifying intensive study campaigns aiming to contrast or prevent diseases by the use of prebiotics and/or probiotics (Reid et al., 2011).

The species composition of human microbiota is very variable between individuals and between body regions of the same individual. The microbiota was observed also to be relatively stable inside the host along with extended time span (Costello et al., 2009).

Human gastrointestinal tract has an essential role providing nutrients to the whole organisms. Ingested meal is mechanically, chemically and bacterially processed. Nutrients are absorbed and non-digested material is briefly stored until it is expelled as faeces with bacterial remains.

Human gut microbiota (HGM) hosts between 400 and 1000 bacterial species

(Hooper y Macpherson, 2010), where Bacteroidetes and Firmicutes *phyla* are the most abundant (Kurokawa et al., 2007).

The relationship between gut microbiota and human host is not only commensal. It is beneficial for the bacteria because of the gut extension (400m<sup>2</sup>), it has a stable temperature (37°C) and it is rich in nutrients (Van Wey et al., 2011). On the other hand, HGM acts as a pathogen barrier (Salminen y Isolauri, 2006), it helps to the immune system development (Mazmanian et al., 2005; Stappenbeck et al., 2002), affects to the gut structure (Falk et al., 1998) and plays an important role in the nutrient metabolisms (Bäckhed et al., 2005; Samuel et al., 2008).

Next generation sequencing (NGS) technologies, with their high-throughput sequence production, allowed to bring to light an enormous diversity and that intestinal microbiota hosts important fraction of non-cultivable bacteria. In spite of the potential of NGS, only sequence comparative- and assignation-based experiments does not reveal the whole picture. There are several issues which are still not resolved by the use of brute-force sequencing.

- Finding DNA originating from a bacteria does not mean that this one is in an active state (Lewis, 2007).
- The presence of a gene does not mean that it is expressed (Göransson et al., 1990; Wanner, 1993).
- Finding a similar sequence does not mean that it is going to do the same function (Kinch y Grishin, 2002).
- Using 16S rDNA gene as phylogeny marker, in non cultivable species, means that the identified sequence is close to some other previously described but there are not real evidence about the function of this organism *in-vivo* (Janda y Abbott, 2007a).
- The same species identified can bring or acquire plasmid, mobile elements, providing pathogenicity, resistance or functions which can change the microbial behaviour in the community (Janda y Abbott, 2007b; Kretschmer et al., 1975; Roberts y Mullany, 2009; Webb et al., 2004; Woodford, 2001).

- Metagenomics give us a bird-eye overview of the diversity in a place but can not give us the information of what is really happening (Hojo et al., 2009).

Flow cytometry permits to measure physical and/or chemical features of each single cells. Detection of events and measure happen while cells or particles pass by a fluid stream trough a complex system of light detectors. The flow cytometer could be coupled with a cell sorter, or flow sorter, which uses electrical and/or mechanical means to divert and collect cells (or other small particles) depending on their characteristics when user-selected conditions are accomplished (Shapiro y Leif, 2003).

Flow cytometry coupled with 16S rDNA sequencing can provide us a directed vision of subfractions of a given complex microbial community.

The objectives of the Thesis are:

1. To characterize population structures of over represented and under represented bacteria of human gut microbiota using 16S rRNA fluorescent probes coupled with flow cytometry to split the populations and 16S rDNA clone libraries to study its composition.
2. To study the variation of cellular components (DNA and RNA) and population structure along *Escherichia coli* growth curves using a single cell based approach.
3. To identify and characterize the active fraction of human gut microbiota.
4. To study the relationships of human gut microbiota with immune system using flow cytometry to identify IgA-coated bacteria.

## **A.1. Splitting gut microbiota by phylogroup.**

Despite the high diversity of the HGM a characteristic species distribution is observed. Few groups such as Firmicutes and Bacteroidetes cover around the 70% of the microbiota while a long tail of rare phylogroup is always reported.

A flow cytometry-based protocol has been developed and optimized to split bacterial subpopulations from HGM. All the bacteria has been marked with Pylonin

Y (RNA directed dye). Firmicutes and Bacteroidetes *phyla* has been labelled with 16s rDNA fluorescent probes. Flow cytometry is able to identify this labelled bacteria and sort them giving us two physically separated fractions, the over-represented bacteria group made by Firmicutes and Bacteroides (named HC fraction, High Cy5 fluorescent emission) and the non-Firmicutes-Bacteroides group or under-represented bacteria (named LC fraction, Low Cy5 fluorescent emission). Finally, we collected 5 fractions: 1) the raw Faecal Sample (FS), 2) the Ring fraction (R, obtained by density step centrifugation) made exclusively by detached bacteria or cleaned sample, 3) the Pyronin Activated fraction (PA) made by bacteria labelled with pyronin Y and sorted by flow cytometry, 4) the over-represented bacteria (HC) and 5) under-represented bacteria (LC).

DNA was extracted from each fraction, 16S rDNA amplicons obtained by PCR, cloned in *E. coli* and the obtained libraries were sequenced by Sanger method.

16S rDNA clone library performed with cells separated by FACS differed greatly from the libraries obtained directly from the faecal sample. An increase in the number of clones related to Proteobacteria (from almost 0% to 22%) was observed, thus concomitantly reducing the abundance of Firmicutes and Bacteroidetes (Figure A.1).

The LC fraction gathered up to 73% of Proteobacteria-related clones, while Firmicutes and Bacteroidetes related phylogroups were scarcely retrieved (up to 23%). Other minor phylogroups were also recruited in this fraction, with clones belonging to OD1, Actinobacteria and Crenarchaeota *phyla*. Proteobacteria diversity in this fraction was also high, with identification of at least one representative clone belonging to 2, 4 and 5 different families of Alpha-, Beta- and Gammaproteobacteria, respectively (Figure A.2). Contrary to what was observed in the LC fraction, the HC fraction grouped mainly cells emitting Cy5 fluorescence and, as expected, prin-

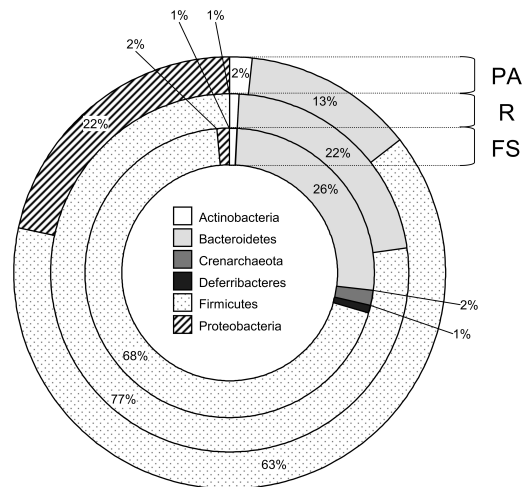


Figura A.1: *Phyla* distribution from FS, R and PA fractions.



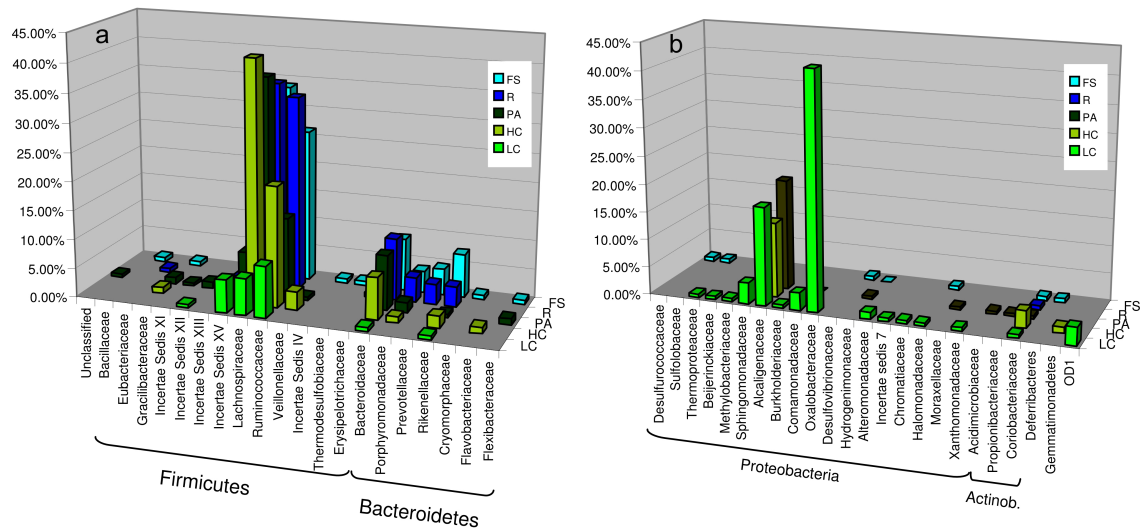


Figure A.2: Family level composition from each fraction. In the panel a is shown over-represented *phyla* in panel a and the under-represented in the panel b.

Typically comprised clones belonging to Firmicutes (70%) and Bacteroidetes (11%). In addition, a fraction of Proteobacteria (around 14%) was recruited.

In the PA and LC fractions we found at least 14 families of Proteobacteria, while just two Proteobacteria-related clones were recruited from FS clone libraries. It is worth noticing the relative decrease of Bacteroidetes (13,6%) and Firmicutes (5,1%) related clones, as well as the increase of Proteobacteria (20,1%) when it is compared FS and PA fractions. Within Bacteroidetes, Prevotellaceae and Rikenellaceae are the two families that underwent the greatest reduction (Figure A.2, panel a). Regarding Firmicutes, at least four families, which were previously present at low concentrations, completely disappeared, while within the Clostridiales a drastic decrease was only observed for Ruminococcaceae. On the other hand, several families became visible only when the RNA-based selection was applied (PA fraction); for example, within Firmicutes, an increase was observed in the number of clones related to Incertae Sedis XI, XII, XIII, XV, and Veillonellaceae. In addition, within the Proteobacteria, a dominant population made up almost exclusively by Betaproteobacteria Alcaligenaceae appeared only in the pyronin-Y-stained fraction.

The most striking result is that the LC fraction was really rich in under-represented bacteria. Clones belonging to the Proteobacteria phylum were related to 12 fami-

lies, particularly Alteromonadaceae, Alcaligenaceae, Comamonadaceae, Oxalobacteraceae and Sphingomonadaceae. About the remaining families, only one clone was found belonging to the following families: Beijerinckiaceae, Burkholderiaceae, Chromatiaceae, Halomonadaceae, Incertae Sedis 7, Methylobacteriaceae and Xanthomonadaceae. It is worth noting also that all these families were totally absent in FS and R samples. Other minor represented phyla belonged to Crenarchaeota, Actinobacteria, and OD1.

Although standard approaches examining changes in bacterial-community composition can provide clues to understanding differences between healthy individuals and patients affected by a particular disease, it is essential to develop approaches able to detect the composition of the corresponding active fractions. In conclusion, this study shows that active microbial populations may differ considerably from the total population. Furthermore, it provides an opportunity to study separately fractions from complex communities like the HGM and shedding light on the unexplored diversity concealed there.

Despite at this stage, the sorting was still under optimization, a good enrichment in non-Firmicutes-Bacteroidetes groups has been achieved. This approach allows also to access a wide hidden diversity belonging to the rare biosphere with a minimal sequencing effort.

## A.2. Cell cycle.

Our bacterial physiology knowledge is mainly restricted to cultivable species. Metagenomics of HGM revealed that about 80 % of obtained sequences belongs to species that never has been cultivated [Eckburg et al. \(2005\)](#) and that 20 % of them are in a dormant state ([Lennon y Jones, 2011](#)). Moreover, microbial behaviour is not only determined by his gene pool, but it is under the effect of environment and other microorganisms ([Hammerstrom et al., 2011](#); [Livorsi et al., 2011](#); [Reis et al., 2011](#)).

FCM can be used to measure DNA, RNA amounts inside a bacteria ([Lomas et al., 2011](#); [Molin y Givskov, 1999](#)). During a growth curve we measure these parameters in order to have a more clear vision of subpopulation dynamics during the growth. The objective of this section.

1. To develop protocols for single cell-based physiological assays.
2. To detect subpopulations during the growth of a bacterial clone population.
3. To test the pyronin Y efficiency as activity marker.
4. To observe the subpopulations dynamics in different bacterial species based on biomass content and activity.

Before setting up the conditions of the experiment, we have measured the OD during a growth curve and we have taken a sample every hour. The overall experimental protocol was based on staining of fixed cells DNA with DAPI and RNA with pyronin Y. Then we have measured the single-cell fluorescence emissions by flow cytometry.

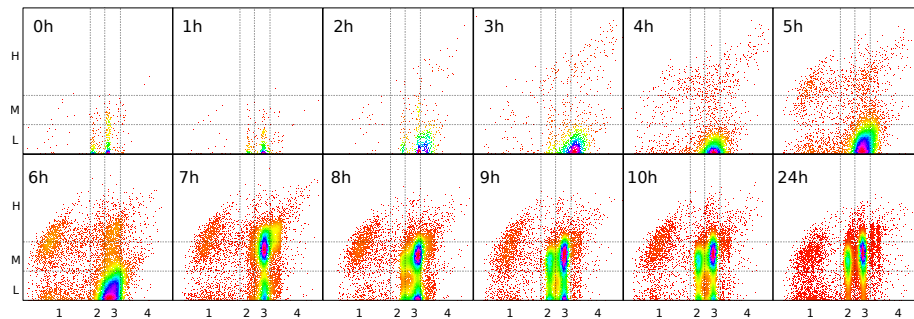


Figura A.3: Cytometry dot-plots pyronin Y - DAPI (RNA-DNA) from each sample during *Escherichia coli* growth. Number of represented events is proportional to OD.

We have divided the cytometry dot-plot in several region, the fluorescence of RNA in three (H, high; M, medium; L, low) and the fluorescence of DNA in 4 (1, 2, 3, 4), assuming that region 2 include 2 cells which DNA fluorescence proceeds by one molecule of the bacterial DNA, 3 by two molecules of the bacterial DNA, and 1 and 4 given by less than one and more than two respectively (Figure A.3). It has been represented the percentage of events in each region during the growth (Figure A.4). At the beginning the majority of cells have 2 chromosomes and low RNA concentration (around the 50%). Just when the exponential phase begins a small amount of bacteria appear with a huge amount of RNA and they seem to be the first starting to grow. In the stationary phase the 40% of the events shows two chromosomes and a medium amount of RNA.

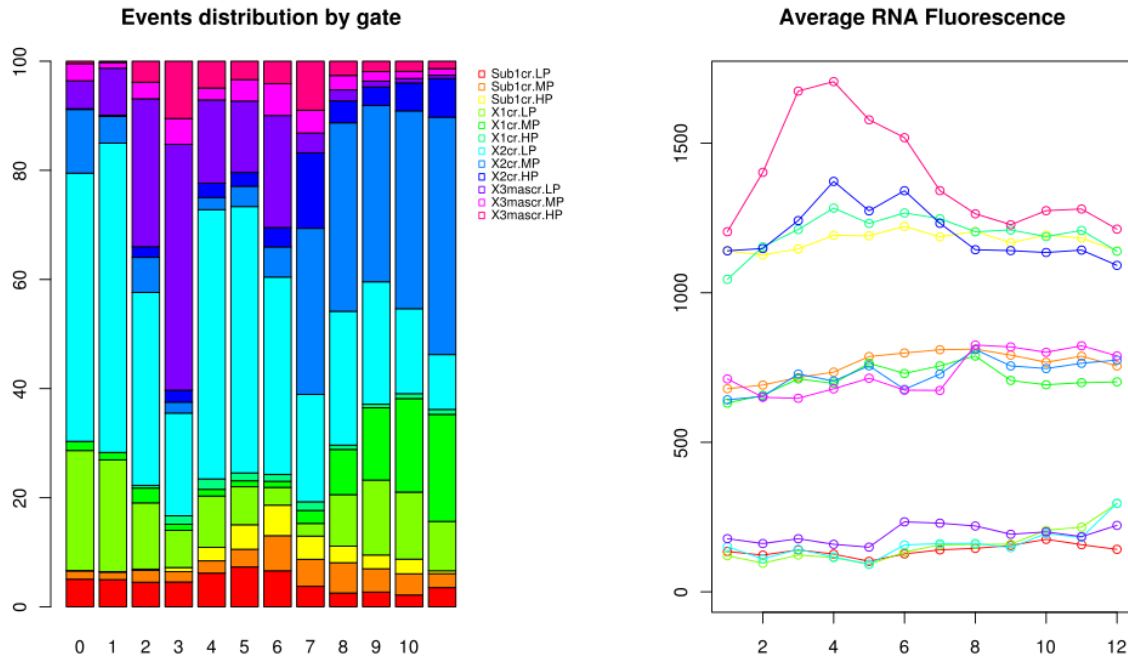


Figura A.4: Distribution of events in each region. Every bar represents the percentage of events in each region in previous figure. Pyronin Y fluorescent mean (RNA) of every region.

An approximation to unravel the behaviour of microbial communities is to observe patterns of growth culture by flow cytometry. In a simple rich culture it can be observed three kinds of activity, an initial lag phase, the exponential growth and the stationary phase. In a more complex media and with more interactions recognise the former patterns can be more informative than the species distribution. This can be useful to monitor processes and direct the study pointing to the real changes in a community.

### A.3. Active gut microbiota.

In the last years it has been observed that not all bacteria are in an active state (Lennon y Jones, 2011). 16S rDNA surveys or metagenomics are not able to dis-

criminate between active, dormant or dead bacteria. Some works directed to detect active bacteria are based on RNA sequencing (metatranscriptomics) but the impossibility to homogenize the applied protocols make difficult to compare data between methodologies. We propose to label active bacteria by the means of RNA, sort this populations by FCM and use the same protocol to extract DNA and sequence 16S rDNA amplicons by 454 sequencing and avoiding cloning.

1. To set up a protocol to split the active bacterial fraction of human faeces by FCM and cell sorting.
2. To study the bacterial composition from each fraction by pyrosequencing.
3. To determine if the obtained active fractions are different or equal to the whole population.

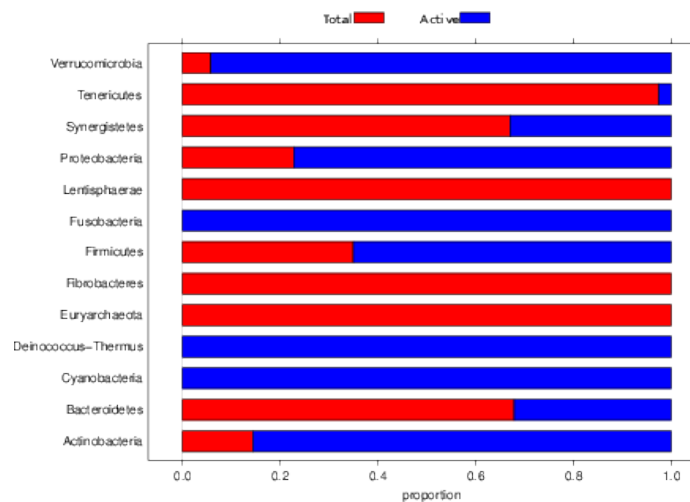


Figura A.5: *Phyla* distribution X-axis represents the proportion of phyla from total (FS and R fraction) and active (HC, LC and PA fractions) libraries respectively.

Figure A.5 shows the *phyla* distribution among active and total fractions. Looking at most represented taxa, Bacteroidetes are those mostly recruited in the total fraction, contrary to what is observed for Firmicutes, Actinobacteria and Proteobacteria.

From all samples/fractions, 79 different families were identified belonging to 13 different *phyla*. As expected, the best part of the reads belonged to Firmicutes (86,43 %), followed by Bacteroidetes (9,34 %), Proteobacteria (1,51 %), Actinobacteria (1,26 %), and others. Moreover, 15.735 reads out of 42.582 (35,99 %) belonged to unclassified families.

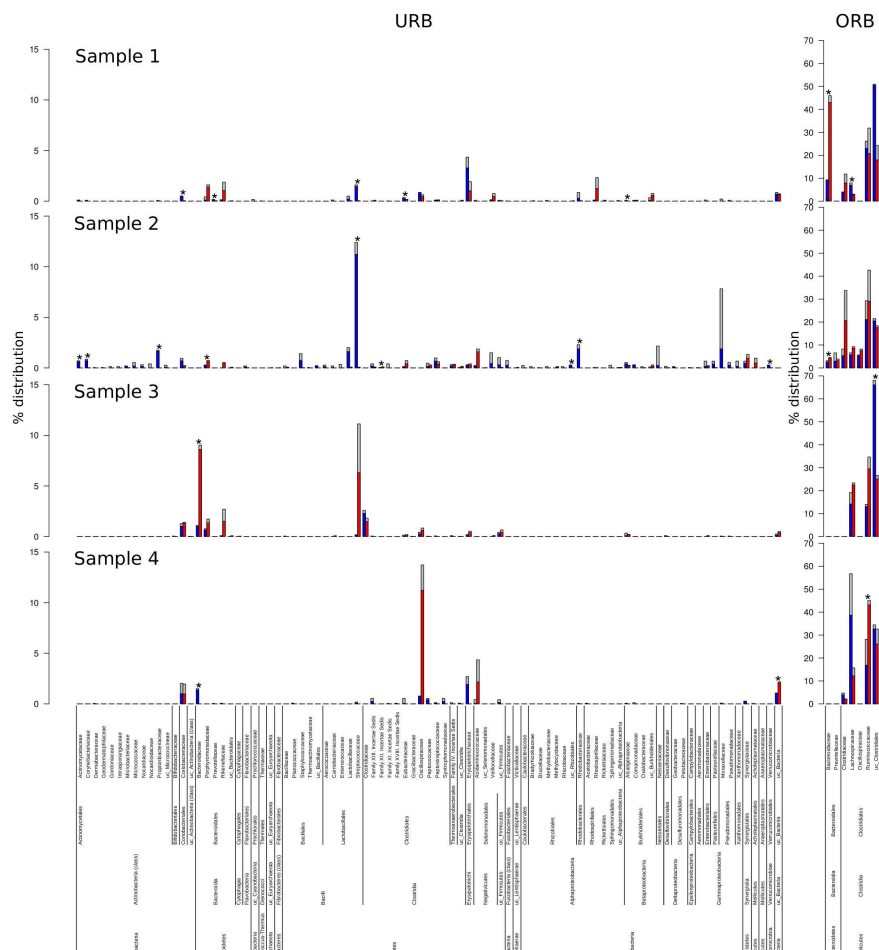


Figura A.6: The histograms describe the distribution of URB and ORB families among total and active fractions. On the bottom, taxonomy ranks are reported. Bars describe percentage distribution of under-represented (less than 1 %, left) and over-represented (more than 1 %, right) families. Blue and red bars describe median distribution of active (HC plus LC and PA fractions) and total (FS and R fraction) respectively. Gray bars indicate the maximum values for each family. Asterisks indicate statistically significant difference ( $p$ -value = 0,05) between active and total fractions.

Considering all samples, 46 out of 79 families were found in total fractions (FS plus R) while up to 73 were identified from the three active fractions (HC plus LC plus PA). These results indicate that most of the families are visible only when cell sorting based on RNA content is employed. We were able to divide the taxa distributions into ORB and URB phylogroups. The most recurrent inflection point was found around 1% of family representativeness. Thus, we used this as the cut-off value to define ORB and URB families. Figure A.6 describes the distribution of URB and ORB related families among samples and fractions. We observed that URB in total fractions were represented by 39 families (out of 46) while 65 families (out of 73) were found in the active fraction. In both cases, URB represented a considerable fraction of gastrointestinal tract microbial diversity, although they represented only 5,69% (total fractions) and the 7,39% (active fractions) of reads. This data is corroborated by the high Shannon index found in all samples/fractions (Table C.1).

Sorting the active fractions allow us getting a more detailed description of this complex community, being the rare bacteria more active than the abundant ones.

At family level the active fractions tend to group together independently of sample (Figure 4.11).

Finally, results show that functionality does not only be deduced from faecal samples.

## A.4. **IgA-Opsonized gut microbiota.**

During the first months of life, the first and more important interactions between gut microbiota and immune system are established. Selection makes *EnvZ/OmpR Escherichia coli* operon to change, adapting the bacteria to the new environment (Giraud et al., 2008). On the other hand, immune system is adapted to the bacteria that is going to be commensal with the host (Hooper y Macpherson, 2010; Macpherson y Geuking, 2005).

Immune system is continuously stimulated to maintain under control the potential pathogens (Hooper y Macpherson, 2010).

Clinical practices are often based on antibiotic administration in order to contrast a pathogen attack. Antibiotics are non-specific and this fact can unbalance

the microbiota. This alteration can induce uncontrolled growth of bacteria which in physiological conditions are regulated or maintained by the commensal microbiota, thus ending in diseases like *Clostridium difficile* associated colitis.

1. To develop a protocol to obtain IgA-opsonized bacteria.
2. To test if IgA-opsonization of bacteria is random or select some targets.
3. To study the distribution of IgA-coated bacteria during a antibiotic treatment.

In this chapter we use samples from temporal serie of patient under antibiotic treatment. We have a sample previous to treatment, two under treatment and one post treatment. For each sample we sorted the IgA-opsonized bacteria and the whole population.

In the Figure A.8 we can see each family percentage in total sample and IgA-coated bacteria fraction, being the families Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae, ud-Lactobacillales, ud-Firmicutes, Enterobacteriaceae and ud-Gamma-proteobacteria the less opsonized. These families are typically present in human gut microbiota and belong to the lactic acid bacteria group. This can be dued to the co-evolution of these bacteria with human immune system. Carnobacteriaceae is the only family that is never opsonized and is present in total sample. It is a lactic acid bacteria and was described as a probiotic in aquaculture (Voget et al., 2011).

Groups in Table A.1, are opsonized and all of them belong to families containing pathogen species like Bacillaceae or Staphylococcaceae, or environmental species like Microbacteriaceae or Nocardiaceae. It is not uncommon to to find these bacteria in human gut but maybe that they are over stimulating the immune system. More or less all bacteria seem to be under the control of immune system and only in gnotobiotic animals, where microbiota is under control, little bacteria expositions need to reach a threshold to activate the immune system (Hapfelmeier et al., 2010).

Finally, FS and IgA-coated bacteria are already different before the antibiotic treatment, changes in all families have been observed along with the antibiotic treatment. Along with the antibiotic treatment changes in the distributions of IgA-coated bacteria are observed although it seems to be more permissive with beneficial bacteria. In spite of the fact that data are still preliminary and part of a pilot study (at time of writing) more samples are under study to reach stronger conclusions.



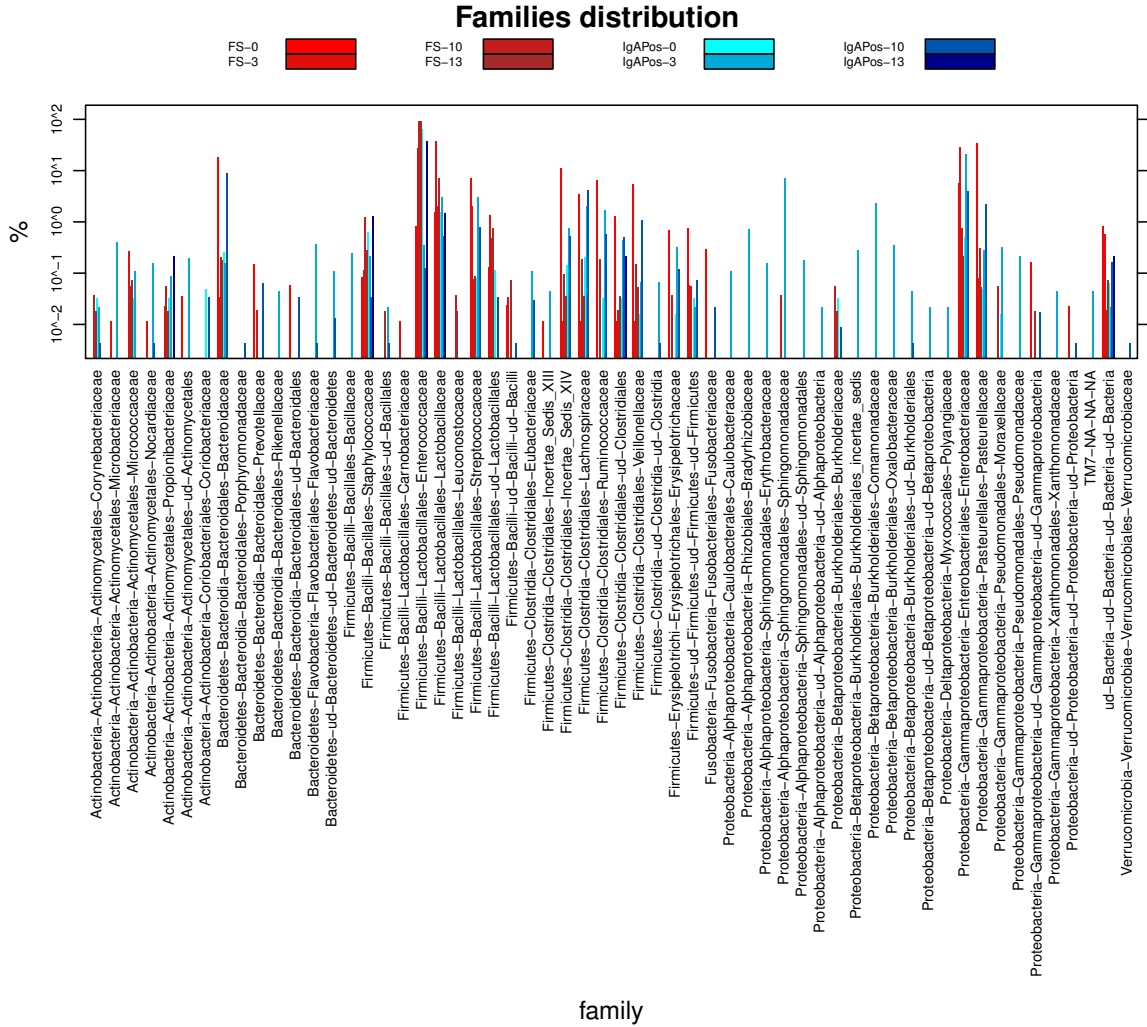


Figura A.7: Family distribution in each sample/fraction. Y-axis represent the family percentage in log scale.

Tabla A.1: Families with huge amount of IgA-coated bacteria.

Microbacteriaceae	Rikenellaceae	Eubacteriaceae
Nocardiaceae	Flavobacteriaceae	Lachnospiraceae
Propionibacteriaceae	ud-Bacteroidetes	ud-Clostridiales
Coriobacteriaceae	Bacillaceae	Veillonellaceae
Porphyromonadaceae	Staphylococcaceae	Caulobacteraceae

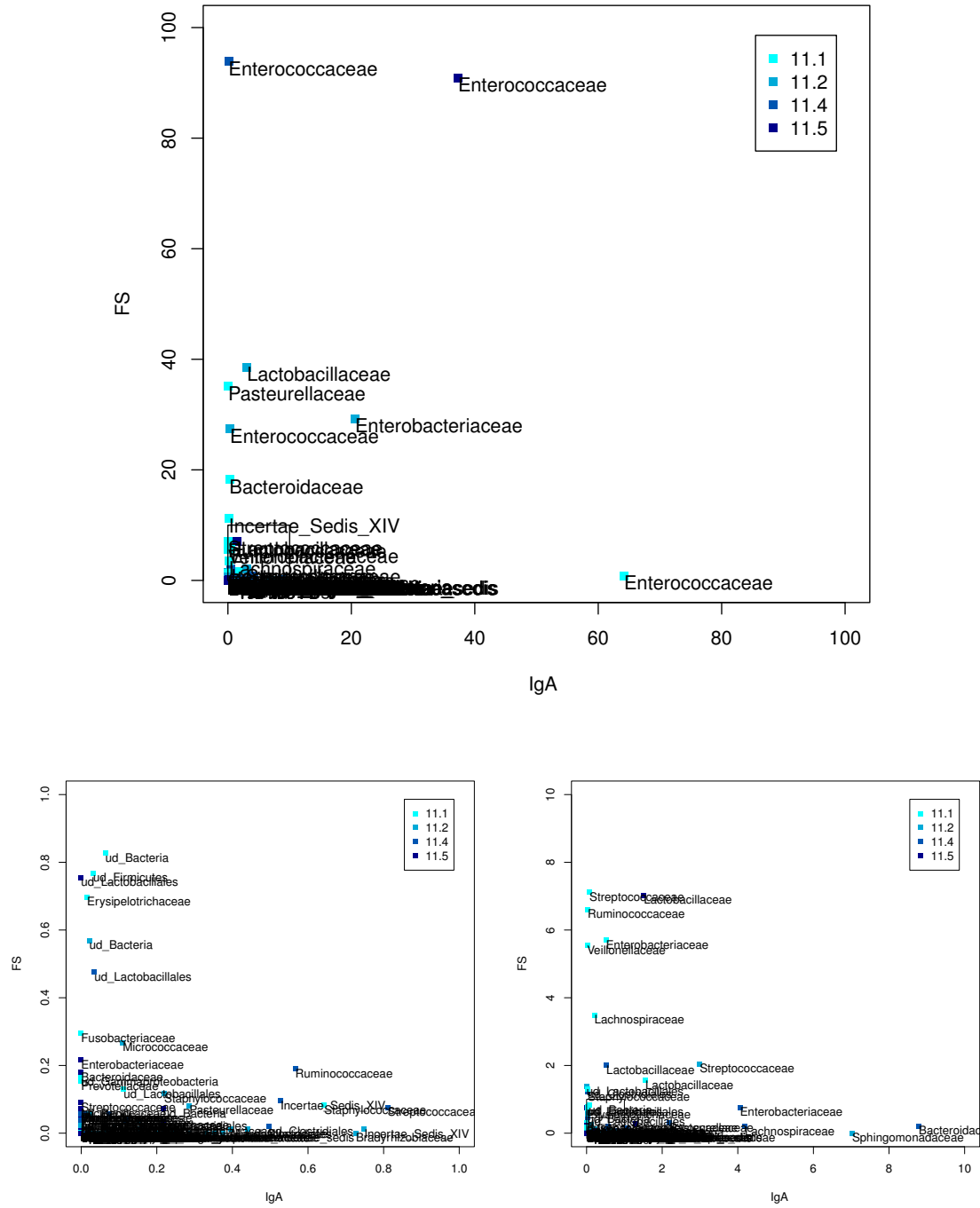


Figura A.8: Percentage of each family in the total sample and IgA opsonized bacterial fraction.

---

# Apéndice B

## Protocolo detallado

### B.1. Preparación de células.

#### B.1.1. Recolección de muestras.

- Estudio aprobado por el comité ético del centro.
- Los donantes de muestra de heces son voluntarios con las características requeridas.
- Los donantes deben firmar un consentimiento informado con el objetivo de utilizar las muestras donadas en el estudio acordado.
- El donante debe introducir 3 o 4 cucharadas de muestra en el contenedor de heces.
  - El contenedor de heces es un tubo con rosca de 30mL (25x90 mm; PP SPOON; DELTALAB).
  - Debe contener 8mL de un líquido destinado a conservar la muestra. PBS, RNALater o un fijador.
- Lo ideal sería que se congelara de inmediato y no se perdiera la cadena de frío hasta llegar al laboratorio.
- La muestra se lleva al laboratorio en menos de 24 horas y se almacena a -20°C con un crioprotector o se fija inmediatamente.

### B.1.2. Obtención y limpieza de las células.

- Alrededor de 1g de material fecal se homogeneiza mediante un *vortex*, obteniendo una suspensión fecal.
- La suspensión fecal se centrifuga (800rcf) durante 2min con el fin de sedimentar los agregados, fibras y otros restos sólidos no digeridos.
- El sobrenadante, el cual contiene las células, se pipetea en otro tubo.
- Se centrifuga a 7.500rcf durante 7min para recoger las células microbianas de la suspensión fecal.
- El *pellet* se limpia dos veces en PBS.
  - La limpieza consisten en centrifugar a 7.500rcf durante 2min, eliminar el sobrenadante y resuspender.
- Si la muestra lo requiere se puede añadir un paso de centrifugación en gradiente (Histodenz).
- Se resuspende en 900 $\mu$ L de PBS. Las células se fijan inmediatamente añadiendo 100 $\mu$ L de formaldehído al 37 % (Concentración final de 3,7 %) y se incuban toda la noche a 4°C.
- Las células fijadas se limpian en PBS para eliminar los restos de formaldehído.
- Se resuspende en 1mL de etanol 50 % en PBS.
- Se almacena a -20°C.
- Antes del procesado final para llevar al citómetro, se debe limpiar el alcohol dos veces con PBS.

## **B.2. Separación por citometría de flujo.**

### **B.2.1. Tinciones.**

- Previo al marcaje se calcula la OD<sub>600</sub> y se lleva aproximadamente a 0,01 OD<sub>600</sub> por mL. Esto representa aproximadamente 1 millón de células por mL.
- FISH
  - Cada mililitro de células (0,01 OD<sub>600</sub>) se centrifuga y se resuspende en 100μL.
  - Se permeabiliza su pared con lisozima (Sigma-Aldrich #L7651 120 u/mg protein, 9min at 37°C) para facilitar la difusión de sondas dentro de las bacterias gram positivas. Al finalizar la incubación los tubos se enfrían en hielo y se lavan dos veces en PBS.
  - Las células microbianas de los pasos previos se resuspendieron en 50μL de tampón de hibridación (Concentración final de: NaCl 0,9M, TrisHCl 0,02M, SDS 0,01 %). 1μL (0,5μgμL) de cada sonda se añadió a la mezcla. La hibridación se llevó a cabo durante tres horas a 56°C. Para eliminar las sondas unidas inespecíficamente, se añadió 1mL de tampón de hibridación y se aumentó la temperatura a 58°C durante 15min. Se lavó dos veces en PBS y al final se resuspendió en 1mL de PBS.
- Pironina Y
  - Se añadió 1μL de Pironina Y (Sigma-Aldrich #P9172, 10mg/mL) a la muestra para la tinción del RNA y se incubó 20min a 4°C. Después se procedió con la citometría.
- Syto62
  - Se siguieron las recomendaciones del fabricante.
- IgA

- Se siguieron las instrucciones del fabricante, Invitrogen, *Catalog Number* 62-7411. Se realizó un control de isotipo para determinar la fluorescencia debida a uniones inespecíficas, Invitrogen, *Catalog Number* M31001.

### B.2.2. Fraccionamiento mediante citometría de flujo.

- Los fraccionamientos se llevaron a cabo utilizando el citómetro *MoFlo<sup>TM</sup> XDP Cell Sorter*.
- El citómetro debe poseer los láser apropiado para excitar los fluorocromos utilizados. En este caso los láser eran el Argón 488nm (azul) (200mW) y 635nm (rojo) diodo láser (25mW).
- Los láser se alinean usando las bolas de *Beckman Coulter Flow-Check<sup>TM</sup>* (10 $\mu$ m) y *Flow-Set<sup>TM</sup>* (3 $\mu$ m).
- Deben escogerse los filtros de emisión según los fluorocromos utilizados. Por ejemplo, Pironina Y emite a 570nm por lo que el filtro de emisión escogido debe ser el 580/30.
- El *trigger* más adecuado para bacterias es una fluorescencia que no afecte a las fluorescencias a medir. Por ejemplo Syto marcando DNA si su fluorescencia no se va a utilizar en otras cosas. En caso de no ser posible puede utilizar se el Side Scatter.
- Deben utilizarse controles para determinar los niveles de fluorescencia negativa y positiva.
- Las fracciones se separan en tubos de plástico estériles que contienen 1mL de PBS para recoger las células y poder ser usada en extracción de DNA o otros estudios *downstream*.
- Los archivos \*.lmd o \*.fcs se deben grabar para su posterior análisis estadístico.

### B.3. Extracción del DNA (Ausubel et al., 1992).

- Centrifugar las células 5min a 13.000rcf y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender en 500 $\mu$ L de PBS y homogeneizar.
- Añadir 70 $\mu$ L de Lisozima (50mg/mL) e incubar 30min a 37°C.
- Añadir 30 $\mu$ L de una solución de SDS (10 %).
- Añadir 8 $\mu$ L de RNasa (1 %) e incubar a 50°C durante 1h.
- Añadir 100 $\mu$ L de NaCl 5M y 80 $\mu$ L de CTAB 10% en NaCl 0,7M. Incubar a 65°C durante 10min.
- Añadir 700 $\mu$ L de CHl-IsA, agitar y centrifugar a 13000rcf 2min.
- Recuperar el sobrenadante ( $\approx$ 700 $\mu$ L) y llevarlo a un nuevo *Eppendorph*, añadir 700 $\mu$ L de P-CHl-IsA y agitar 15s.
- Centrifugar 13.000rcf 2min.
- Recuperar el sobrenadante ( $\approx$ 650 $\mu$ L) y llevarlo a un nuevo *Eppendorph*, añadir 700 $\mu$ L de CHl-IsA y agitar 15s.
- Centrifugar 13.000rcf 2min.
- Recuperar el sobrenadante y añadir 0,2 volúmenes (140 $\mu$ L) de Acetato Sódico 10M.
- Añadir 600 $\mu$ L de Isopropanol y centrifugar a 13000rcf durante 20min.
- Obtener el precipitado. Eliminar el sobrenadante y lavar con 500 $\mu$ L de Etanol al 70 % y centrifugar a 13.000rcf durante 5min. Obtener nuevamente el precipitado, eliminar el sobrenadante y secar en cabina con el Eppendorf abierto durante  $\approx$ 1hora.
- Añadir 50 $\mu$ L de agua *MilliQ* y congelar.

## B.4. PCRs y purificación.

Tabla B.1: Cantidades utilizadas para las PCRs (en  $\mu\text{L}$ ).

	2,0	Cebador A
	2,0	Cebador B
	Hasta 50	H <sub>2</sub> O
	5,0	Tampón PCR
	4,0	dNTPs(2,5mM)
	2,5	DNApol(1u/ $\mu\text{L}$ )
De 1 a 5 según concentración		DNA

Tabla B.2: Condiciones PCR (temperatura en  $^{\circ}\text{C}$ ).

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94	2min	
94	30s	
54	30s	32x
68	20s	
68	10min	
8	$\infty$	

- En cada grupo de PCRs se introdujeron controles positivos y negativos para verificar la calidad de la amplificación.
- Purificación mediante las placas “*NucleoFast<sup>®</sup> 96 PCR filter plates*” (Macherey Nagel #74310050) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Las PCRs se repitieron las veces necesarias para obtener la cantidad de DNA suficiente.
- La cantidad de DNA se midió utilizando el *nanodrop*.



---

## Apéndice C

### Microbiota intestinal activa.

Tabla C.1: Principales índices de diversidad calculados a nivel de familia de cada muestra/fracción.

Muestra	Fracción	N	Shannon	Chao1	SE.Chao1	ACE	SE.ACE
1	HC	23	1,66	28,00	10,17	28,77	2,73
	LC	27	1,62	40,75	17,42	47,50	3,93
	PA	32	1,56	37,25	8,28	35,62	2,73
	R	17	1,41	18,50	3,49	21,07	2,27
	FS	25	1,78	43,00	49,09	47,77	3,43
2	HC	45	2,69	48,27	3,60	50,03	3,36
	LC	54	2,66	61,00	13,15	57,41	3,69
	PA	55	2,50	70,00	24,24	60,19	3,68
	R	36	1,94	54,00	49,09	46,02	3,44
	FS	38	2,09	45,50	8,37	51,52	3,86
3	HC	20	1,13	27,00	13,15	32,92	3,11
	LC	18	1,07	20,00	5,29	21,10	2,17
	PA	22	1,14	43,00	NaN	30,78	2,94
	R	18	1,65	18,00	0,73	18,32	2,08
	FS	19	1,89	19,33	1,87	20,71	2,14
4	HC	17	1,14	18,67	2,96	25,99	3,34
	LC	24	1,75	25,50	3,49	26,78	2,60
	PA	24	1,54	42,00	49,09	40,27	3,36
	R	7	1,47	10,00	NaN	9,97	1,70
	FS	7	1,46	7,50	3,74	8,44	1,32



Figura C.1: La figura muestra el heatmap realizado a partir de los valores de abundancia de las familias.

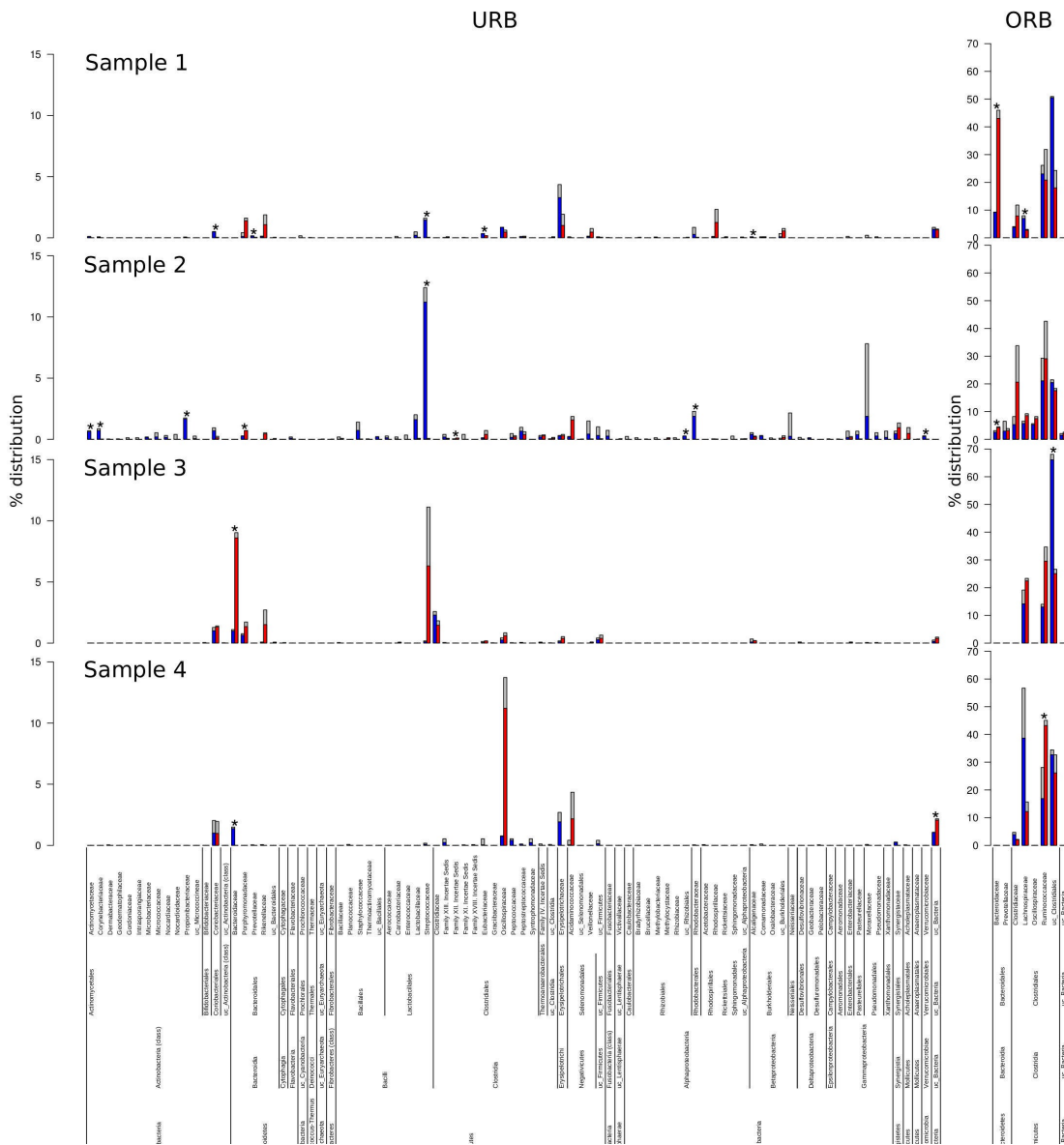


Figure C.2: The histograms describe the distribution of URB and ORB families among total and active fractions. On the bottom, taxonomy ranks are reported. Bars describe percentage distribution of under-represented (less than 1 %, left) and over-represented (more than 1 %, right) families. Blue and red bars describe median distribution of active (HC plus LC and PA fractions) and total (FS and R fraction) respectively. Gray bars indicate the maximum values for each family. Asterisks indicate statistically significant difference (p-value = 0,05) between active and total fractions.



---

## Apéndice D

# Microbiota intestinal opsonizada con IgA.

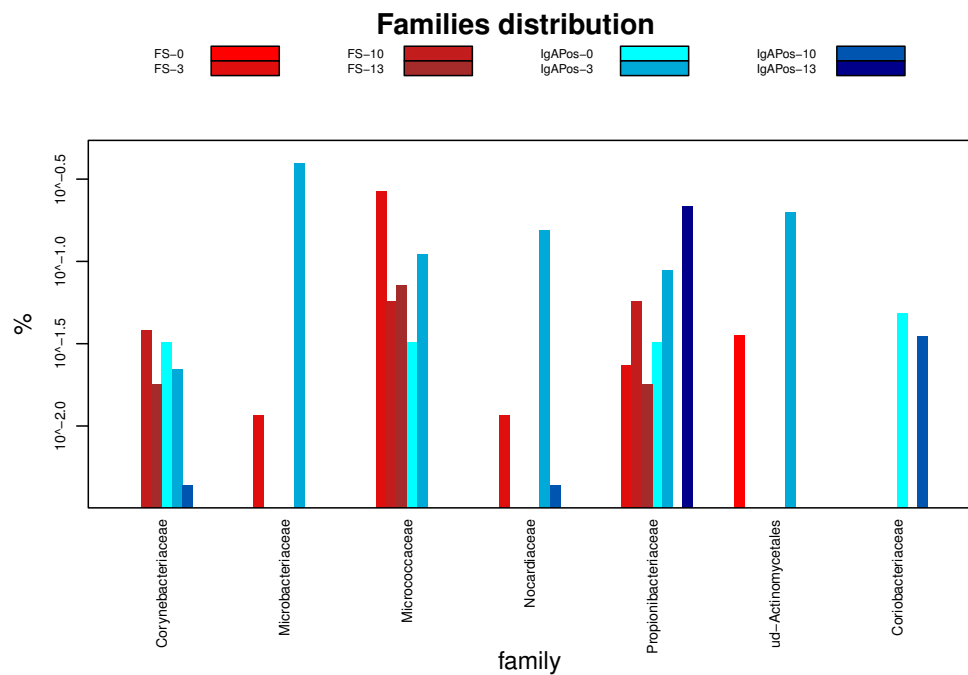


Figura D.1: Distribución de Actinobacterias de cada muestra y fracción. El eje de las Y representa el porcentaje en escala logarítmica de cada familia.

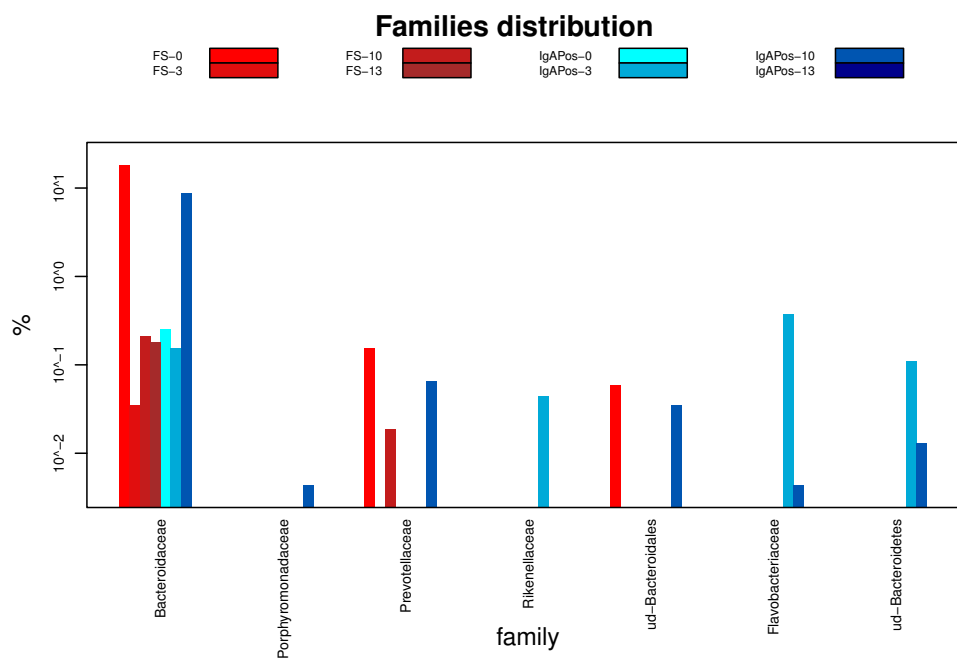


Figura D.2: Distribución de Bacteroidetes de cada muestra y fracción. El eje de las Y representa el porcentaje en escala logarítmica de cada familia.

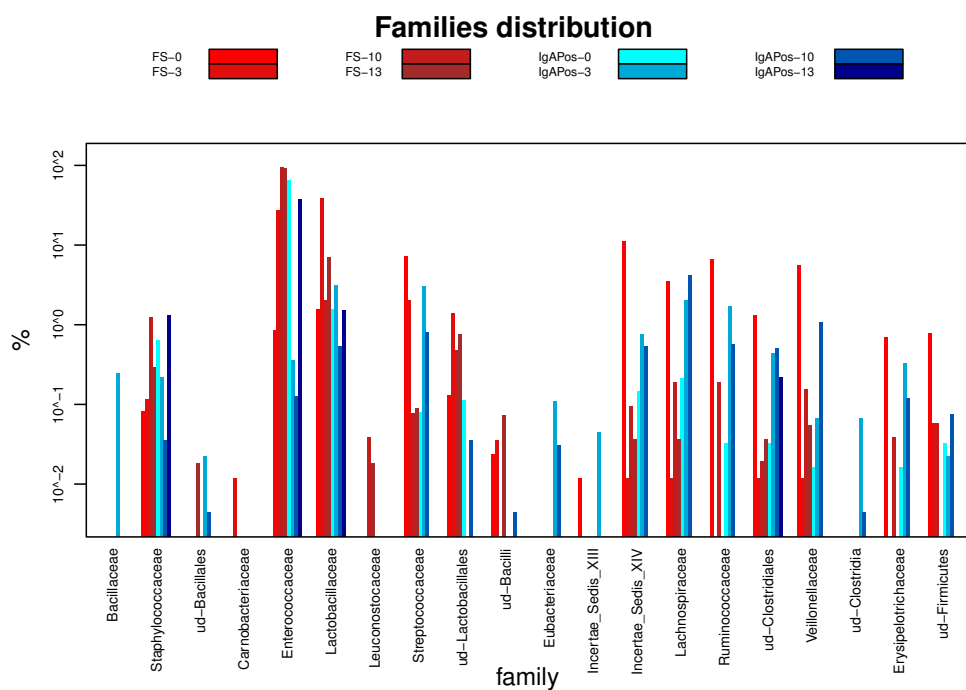


Figura D.3: Distribución de Firmicutes de cada muestra y fracción. El eje de las Y representa el porcentaje en escala logarítmica de cada familia.

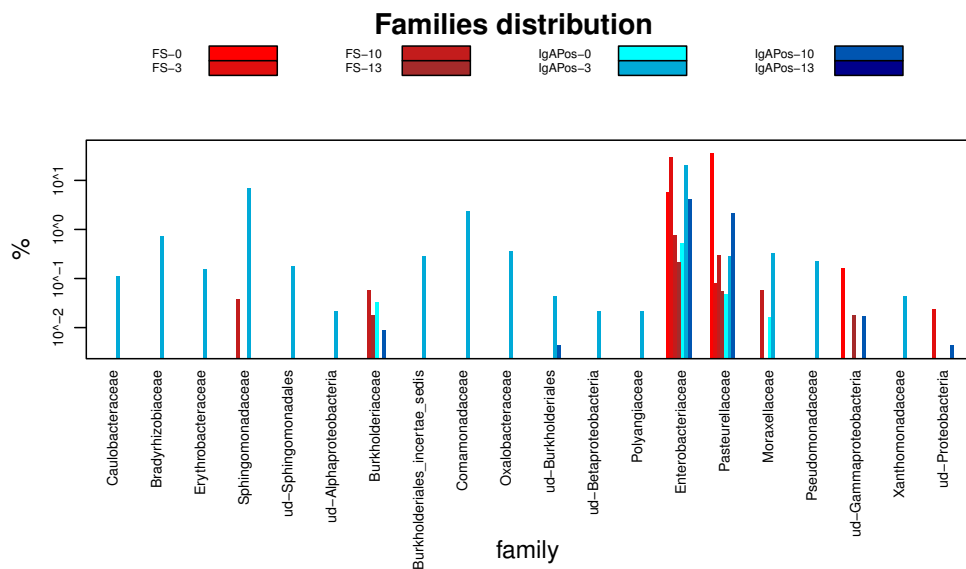


Figura D.4: Distribución de Proteobacterias de cada muestra y fracción. El eje de las Y representa el porcentaje en escala logarítmica de cada familia.











