

UCH-FC
Biotecnología
G241
CA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**EVALUACION DEL IMPACTO DE LA INGESTION DE DISTINTAS
CANTIDADES DE *Lactobacillus johnsonii* La1 SOBRE LA MICROBIOTA
INTESTINAL EN VOLUNTARIOS SANOS**

Memoria de Título Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Daniel Antonio Garrido Cortés

Noviembre 2005
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Martín Gotteland
Laboratorio de Microbiología. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos



“EVALUACIÓN DEL IMPACTO DE LA INGESTIÓN DE DISTINTAS CANTIDADES DE *Lactobacillus johnsonii* La1 SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN VOLUNTARIOS SANOS”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

DANIEL ANTONIO GARRIDO CORTÉS

Dr. Martín Gotteland
Director de Memoria de Título

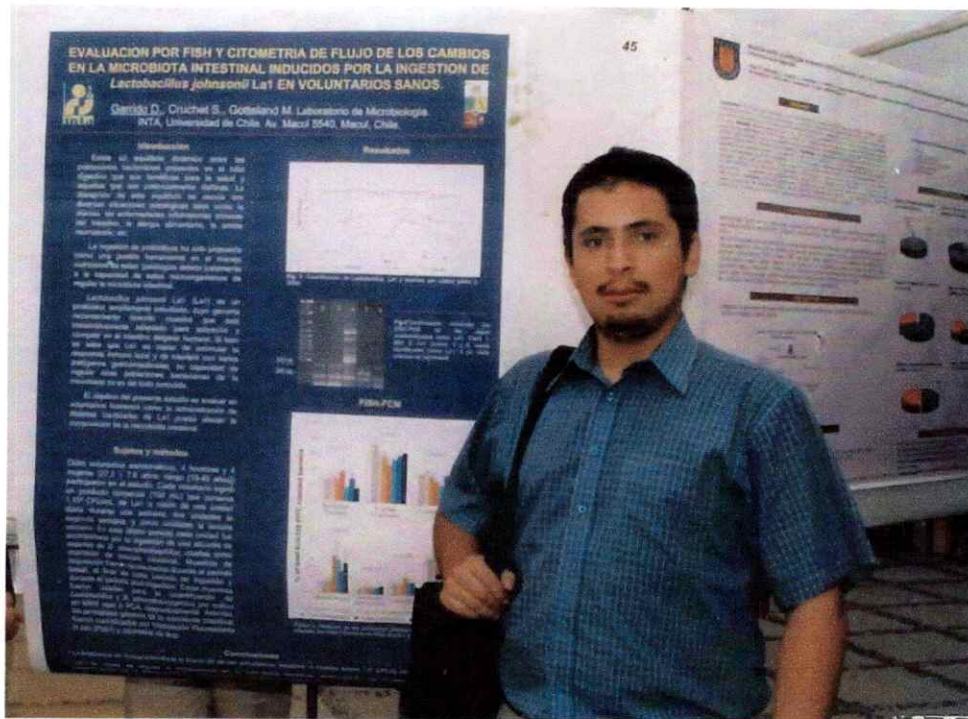
Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Margarita Carú Marambio
Presidente Comisión

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Profesor corrector

Se muestran tres firmas manuscritas en azul sobre líneas horizontales. La primera firma es la del Dr. Martín Gotteland, la segunda es la de la Dra. Margarita Carú Marambio y la tercera es la del Dr. Marcelo Baeza Cancino.

Santiago de Chile, 18 de Noviembre de 2005



A mi familia y amigos

Agradecimientos

A mi familia antes que nada, por el constante apoyo y confianza que me han dado siempre....lo que significa esta vez el estar quemando una etapa, una de las más importante de mi vida.

A mi director de tesis y gran amigo, Martín, por la confianza puesta en mí pese a todas las dificultades del camino. Por todos los momentos de discusión, de rabia. Por el haber llegado a ser amigos cuando no había porqué. Por todos los consejos dados, las puertas abiertas, el aprendizaje adoctrinado.

A la Unidad de Gastroenterología del INTA, Julia Abbate, Daniel Trincado, Dr. Oscar Brunser, Dra. Sylvia Cruchet, por el consejo y compañía de dos años que no pasaron en vano en mi vida. A los voluntarios del estudio, a Rebeca Montalva y Waleska Simón por su ayuda en la parte de la Citometría. A los proyectos que hicieron posible este trabajo.

A mis amigos, compañeros, y a todas las personas que han dejado una sonrisa en mí al pasar.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION.....	5
1. Estructura y función del tracto gastrointestinal.....	5
2. La microbiota intestinal.....	9
3. Establecimiento y alteraciones de la microbiota intestinal.....	15
4. Probióticos.....	18
5. <i>Lactobacillus johnsonii</i> La1.....	20
6. Métodos moleculares aplicadas al estudio de la microbiota intestinal y bacterias lácticas.....	23
HIPOTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y METODOS.....	28
1. Reclutamiento de voluntarios.....	28
2. Diseño del protocolo.....	29
3. Cuantificación de <i>Lactobacillus</i> totales, La1 y <i>B. stearothermophilus</i>	31
4. Confirmación molecular de la identidad de La1 por ERIC-PCR.....	32

5. Análisis de las poblaciones predominantes de la microbiota intestinal mediante FISH y citometría de flujo.....	33
6. Extracción de DNA desde muestras fecales.....	36
7. PCR-TTGE.....	38
8. Análisis estadísticos.....	40
RESULTADOS.....	43
1. Sujetos.....	43
2. Determinación de los niveles fecales de <i>Lactobacillus</i> , <i>B. stearrowthermophilus</i> y La1.....	43
3. Evaluación de los cambios en las poblaciones intestinales por FISH y Citometría de Flujo.....	47
4. Evaluación de los cambios en la microbiota intestinal por PCR-TTGE.....	50
DISCUSION.....	55
1. Adhesión y persistencia.....	55
2. Técnicas moleculares aplicadas al estudio del tracto GI y de bacterias ácido lácticas.....	57
3. Presencia del género <i>Lactobacillus</i> en el tracto GI.....	59
4. Modulación de la microbiota intestinal.....	60

CONCLUSION.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	65
ANEXO.....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del epitelio intestinal y algunos tipos celulares.....	6
Figura 2: Principales poblaciones encontradas en la microbiota intestinal.....	11
Figura 3: Recuento microbiológico de los niveles fecales de <i>Lactobacillus</i> totales, <i>L. johnsonii</i> La1, y esporas de <i>B. stearotherophilus</i>	44
Figura 4: Identificación por ERIC-PCR de colonias de lactobacilli de muestras fecales crecidas en agar MRS.....	45
Figura 5: Cambios en los porcentajes de las principales poblaciones de la microbiota intestinal en respuesta a la ingestión de La1.....	48
Figura 6: Evaluación por PCR-TTGE de las poblaciones intestinales detectadas con partidores universales para el dominio Eubacteria.....	51
Figura 7: Evaluación por PCR-TTGE de las poblaciones de <i>Lactobacillus</i> usando partidores género-específicos.....	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Protocolo del estudio.....	30
Tabla 2: Sondas oligonucleotídicas usadas en el estudio.....	34
Tabla 3: Valores de diversidad para <i>Lactobacillus</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
APC	Célula presentadora de antígeno
bp	Pares de bases
BSH	Hidrolasa de sales biliares
Cy5	Indodicarbocianina
DGGE	electroforesis en gradiente denaturante
ERIC	Secuencias intergénicas consenso en enterobacterias
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Forward scatter
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
GI	Gastrointestinal
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IBD	Enfermedad inflamatoria del intestino
IgAs	Inmunoglobulina A secretora
LAB	Bacteria ácido-láctica
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácido lipoteicoico
MRS	Mann-Rogosa-Sharp
MUB	Proteína de unión a mucosa
NCC	Nestlé Culture Center
PBS	Buffer fosfato salino
PCA	Agar de conteo en placa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVPP	Polivinilpirrolidona
rm	RNA ribosomal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Side scatter
TE	Tris-EDTA
TFF3	Trefoil factor
Tm	Temperatura de melting
tRNA	RNA de transferencia
TTGE	Electroforesis en gradiente temporal de temperatura
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Lactobacillus johnsonii La1 (La1) es un probiótico capaz de adherir a células epiteliales intestinales, interferir con patógenos gastrointestinales y estimular la respuesta inmune local y sistémica del huésped. Dado que uno de los mecanismos importantes implicados en las propiedades beneficiosas de los probióticos es su capacidad de regular la microbiota intestinal, el objetivo de este estudio fue evaluar cómo la ingestión de distintas cantidades de La1 modula las principales poblaciones bacterianas de la microbiota intestinal en voluntarios sanos. Ocho sujetos participaron en este estudio. Después de un periodo basal, cada voluntario ingirió diariamente 100 ml de un producto que contenía 10^8 CFU/ml de La1 durante una semana, 200 ml diarios la segunda semana y 500 ml diarios del producto durante la tercera. En este último periodo los voluntarios ingirieron además esporas de *Bacillus stearothersophilus* como marcador de tránsito intestinal. Se recolectaron muestras de deposición durante el periodo basal, al final de cada periodo de ingestión, y hasta 49 días del periodo post-ingestión. Los niveles de *Lactobacillus* totales y de esporas de *B. stearothersophilus* fueron determinados por cultivo en MRS y en PCA, respectivamente. Las colonias morfológicamente identificadas como La1 fueron confirmadas mediante ERIC-PCR. Las poblaciones intestinales de *Bacteroides/Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium*, clúster de *Clostridium histolyticum*, *Atopobium* y *Lactobacillus* fueron cuantificadas mediante FISH y citometría de flujo. Los cambios en el perfil de la microbiota fecal y de la población de *Lactobacillus* se evaluaron a lo largo del estudio mediante PCR-TTGE. Se confirmó que La1 fue capaz de sobrevivir al tránsito a lo largo del tubo digestivo,

observándose un aumento de su excreción fecal durante el periodo de ingestión. La excreción del probiótico no fue detectada en ninguno de los voluntarios siete semanas después de haber terminado la ingestión del producto. Se observaron, tanto por cultivo como por FISH, niveles relativamente altos de lactobacilli ($>10^8$ /g deposición). La ingestión de La1 indujo una disminución significativa de los niveles de *F. Prausnitzii* mientras que los niveles de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y de *C. histolyticum* aumentaron. Durante el periodo post-ingestión las poblaciones tendieron a volver a su estado basal. El análisis por TTGE detectó la aparición de La1 durante el periodo de ingestión; sin embargo La1 no modificó significativamente la diversidad de la microbiota fecal total ni aquella de las distintas especies de *Lactobacillus*. Este estudio indica que La1 es capaz de sobrevivir su tránsito intestinal a concentraciones suficientes que le permiten modular la microbiota intestinal.

ABSTRACT

Lactobacillus johnsonii La1 (La1) is a probiotic strain capable of adhering to epithelial intestinal cells, interfering with gastrointestinal pathogens, and stimulating the local and systemic immune response. One of the most important mechanisms involved in the beneficial effects upon host health of probiotics is their ability to modulate the homeostasis of intestinal microbiota. The objective of this study was to evaluate how the ingestion of different concentrations of La1 modulates the main bacterial populations of the intestinal microbiota in healthy human volunteers. Eight subjects were enrolled in this study. After a basal period, each volunteer ingested 100 ml daily of a product containing 10^8 CFU/ml of La1 during a week; 200 ml daily during the second week, and 500 ml during the third week. Besides, in the latter period the ingestion of La1 was accompanied by the ingestion of *B. stearothersophilus* spores used as transit marker. Fecal samples were obtained during the basal period, at the end of every ingestion period, and until 49 days in the post-ingestion period. The levels of total *Lactobacillus* and *B. stearothersophilus* spores were determined by culture in MRS and PCA, respectively. The colonies morphologically identified as La1 were confirmed by ERIC-PCR. The intestinal populations of *Bacteroides/Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium*, *Clostridium histolyticum* cluster, *Atopobium* and *Lactobacillus/Enterococcus* were quantified by FISH and flow cytometry. Changes in the profiles of total fecal microbiota and *Lactobacillus* population were evaluated along the study by PCR-TTGE. It was confirmed that La1 was capable of surviving along the gastrointestinal tract, and its concentration was augmented in the five bottles ingestion period. The excretion of the probiotic was not detected seven weeks ended

the ingestion of the product. It was observed, by anaerobic culture and FISH, relatively high levels of lactobacilli ($>10^8$ /g stool). The ingestion of La1 induced a significant decrease in the levels of *F. Prausnitzii*, while the levels of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *C. histolyticum* increased. These populations tended to return to their basal levels during the post-ingestion period. PCR-TTGE analysis detected the appearance of La1 during the latter ingestion period; however La1 did not modify significantly the diversity of the total intestinal microbiota nor the *Lactobacillus* population diversity. This study indicates that La1 is able of surviving its transit along the intestine at sufficient concentrations that allow it modulate in a positive way the intestinal microbiota.

INTRODUCCION

1. Estructura y función del tracto gastrointestinal

El tubo digestivo constituye la mayor superficie de contacto e interacción del organismo con el medio externo. Una vez ingeridos, los alimentos pasan por el estómago y luego recorren los distintos segmentos del intestino delgado, duodeno, yeyuno e ileón, donde son sucesivamente procesados para ser finalmente absorbidos. La fracción no digerida llega al colon donde parte de ella es fermentada, produciendo gases y ácidos grasos volátiles los que a su vez son absorbidos, contribuyendo de esta forma al rescate de energía. Durante este tránsito, los alimentos se mezclan con las secreciones biliares y las secreciones enzimáticas e hidroelectrolíticas liberadas por las glándulas salivarias, gástricas e intestinales, las cuales permiten la realización de los procesos digestivos y de absorción.

El epitelio intestinal constituye una estructura altamente especializada para la digestión terminal de nutrientes y su transporte. Forma evaginaciones e invaginaciones denominadas respectivamente vellosidades y criptas que le dan su aspecto de terciopelo. Las vellosidades miden entre 0.5 y 1.5 mm y están constituidas por una extensión de la lámina propia recubierta por un epitelio columnar unicelular que incluye varios tipos celulares (Figura 1). Alrededor de cada vellosidad se abren cinco criptas de Lieberkuhn, estructuras tubulares al fondo de las cuales se encuentran las células troncales que están implicadas en la renovación del epitelio. Estas células

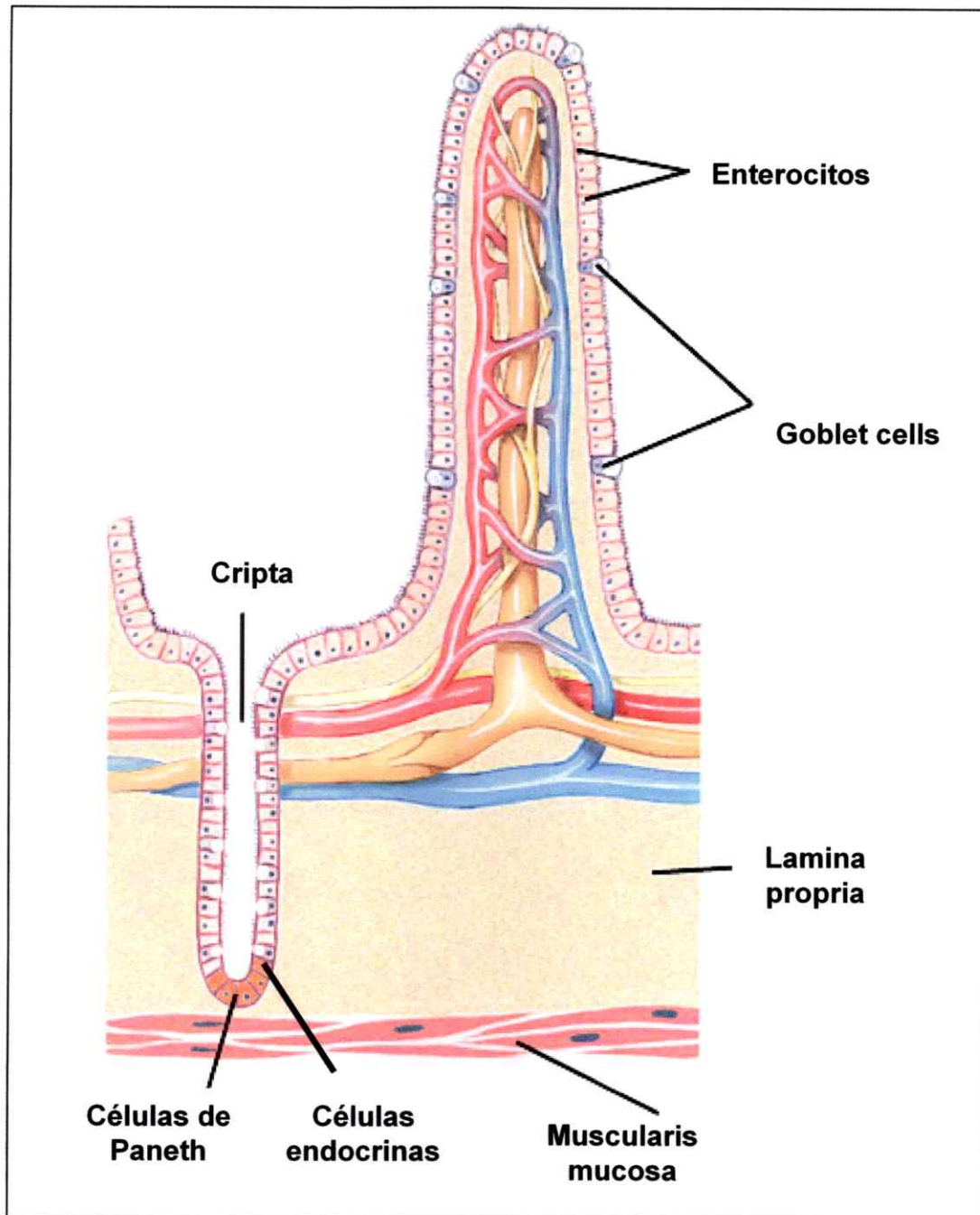


Figura 1: Esquema del epitelio intestinal y algunos tipos celulares. La figura corresponde a la distribución encontrada en el intestino delgado. Se muestran los enterocitos, goblet cells, así como también células endocrinas y de Paneth en la base de la cripta que poseen una función secretora. Cada vellosidad está irrigada por vasos sanguíneos, y soportada por la lámina propia que alberga además placas de Peyer y otros componentes inmunológicos.

dan lugar a cuatro linajes celulares principales, de las cuales tres, (enterocíticas, enteroendocrinas y caliciformes) completan su diferenciación durante su migración, mientras la cuarta, las células de Paneth, se diferencia en la base de la cripta (Stappenbeck y col, 2002). El sistema cripta/vellosidad constituye la unidad funcional primaria del epitelio intestinal; en términos generales, los fenómenos de absorción ocurren en la vellosidad mientras que aquellos de secreción ocurren a nivel de las criptas.

El tipo celular predominante del epitelio corresponde a los enterocitos. Son células columnares con un núcleo basal y que poseen en su superficie apical microvellosidades que constituyen el ribete estriado cuyo objetivo es incrementar aún más la superficie luminal de absorción de nutrientes.

Las células caliciformes (goblet cells), productoras de mucus, son el segundo tipo celular más abundante en el epitelio intestinal, encontrándose dispersas entre los otros tipos celulares. Su abundancia se incrementa desde el duodeno hacia el recto. El mucus recubre el epitelio y ejerce un papel de protección y de lubricación del contenido luminal participando en la función gastrointestinal de barrera. Está constituido de glicoproteínas de alto peso molecular, las mucinas, asociadas con péptidos en hoja de trébol (trefoil factor family, TFF3) con los cuales forman complejos macromoleculares que aumentan su visco-elasticidad. Estos péptidos además promueven la restitución del epitelio cuando éste está dañado (Vandenbroucke y col, 2004; Taupin & Podolsky, 2003).

Las células de Paneth están ubicadas en el fondo de las criptas y secretan lisozima, defensinas y son ricas en metalotioneína, por lo cual se relacionan con la defensa del epitelio. Como además son capaces de fagocitar bacterias y protozoos, se

ha sugerido que las células de Paneth poseen un rol en la regulación de la microbiota intestinal (Stappenbeck y col, 2002).

El epitelio intestinal contiene además células enteroendocrinas que se encuentran preferencialmente en las criptas. Poseen gránulos de secreción con mediadores hormonales como la colecistoquinina, que estimula la secreción pancreática y la contracción de la vesícula biliar, la secretina que estimula la secreción de bicarbonato biliar y pancreático y el Péptido Gástrico Inhibitorio (GIP), que inhibe la secreción de ácido gástrico (Solcia y col, 1987).

Las células M (Microfold cells) corresponden a otro tipo celular presente en el epitelio a nivel de los folículos linfoides y de las placas de Peyer. Tienen un papel importante en el muestreo de antígenos dietarios o de microorganismos presentes en el lumen y en el desarrollo de la respuesta inmune secretora local, en asociación con linfocitos B y T y células presentadoras de antígeno (APC) del GALT (tejido linfoide asociado al intestino) (Man y col, 2004)

2. La microbiota intestinal

La microbiota del tracto gastrointestinal es cualitativa y cuantitativamente la más importante del organismo. Se estima que más de 10^{13} microorganismos están presentes en el tubo digestivo, un número diez veces mayor que el de células que componen nuestro cuerpo. En término de genes, el microbioma intestinal posee más de cien veces el número de genes de nuestro genoma (Backhed y col, 2005). La microbiota intestinal puede ser considerada como un órgano que convive en una estrecha relación con el organismo que la hospeda. La interacción microbiota-huésped ha sido descrita como simbiótica, mutualista o comensalista por diversos reportes, los que coinciden en que el limitado conocimiento actual de esta interacción no permite dar una definición clara (Tannock, 2005; Backhed y col, 2005). Las distintas poblaciones bacterianas que componen la microbiota intestinal son capaces de comunicarse entre ellas y con el huésped (Isolauri & Salminen, 2005); pueden consumir, almacenar y redistribuir energía, realizar importantes transformaciones químicas y pueden replicarse y mantenerse en el tiempo (Backhed y col, 2005).

Más de mil microorganismos distintos han sido aislados a partir del tracto GI humano, que pertenecen a los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya (Eckburg y col, 2005). Las bacterias de la microbiota intestinal alcanzan la mayor densidad celular registrada en cualquier otro ecosistema (Backhed y col, 2005). Estos microorganismos se distribuyen a lo largo del tubo digestivo según una gradiente de concentración próximo-distal (Isolauri y col, 2004). La microbiota del estómago es escasa ($<10^3$ CFU/ml), siendo limitada por las fuertes condiciones de acidez, mientras que las concentraciones bacterianas aumentan gradualmente en los segmentos duodeno-yeyunal (10^5 CFU/g) e ileal (10^6 CFU/g). La presencia de sales biliares y las

secreciones enzimáticas así como los movimientos peristálticos son factores que controlan la proliferación bacteriana. En estos segmentos generalmente predominan microorganismos anaeróbicos facultativos tales como *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Finalmente en el colon las concentraciones logran los 10^{12} CFU/g, y se destaca el predominio de anaerobios estrictos pertenecientes a los géneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* (renombrado como *Faecalibacterium* gen. nov.), *Atopobium*, *Clostridium*, y *Bifidobacterium* (Figura 2), los que son entre diez y cien veces más abundantes que los aerobios o anaerobios facultativos. Normalmente este gran número de microorganismos convive en un estado de homeostasis y pueden ejercer actividades benéficas o perjudiciales para el huésped (Figura 2). El contenido bacteriano puede representar entre un 30 y un 55 % del peso total de las deposiciones, según la dieta del individuo (Isolauri y col, 2004).

Además de la existencia de un gradiente de concentración bacteriana a lo largo del tubo digestivo, es posible que las poblaciones presentes en el compartimiento intraluminal difieran de aquellas en la superficie de la mucosa. Mientras el potencial redox luminal contribuye a crear un ambiente anaeróbico, se estima que la difusión a través de la mucosa del oxígeno aportado por la circulación favorecería un ambiente microaerófilico. Tanto la liberación de sustancias antimicrobianas por parte de las células de Paneth como la de IgAs por los enterocitos contribuyen también a modular la microbiota asociada a la mucosa, haciéndola distinta en su composición a la luminal (Zoetendal y col, 2002). Se ha sugerido que las bacterias que habitan la capa de mucus rica en polisacáridos que cubre el epitelio intestinal constituyen un biofilm y que su retención beneficia al huésped al promover funciones como la digestión de nutrientes luminare y estimulación del sistema inmune (Sonnenburg y col, 2004).

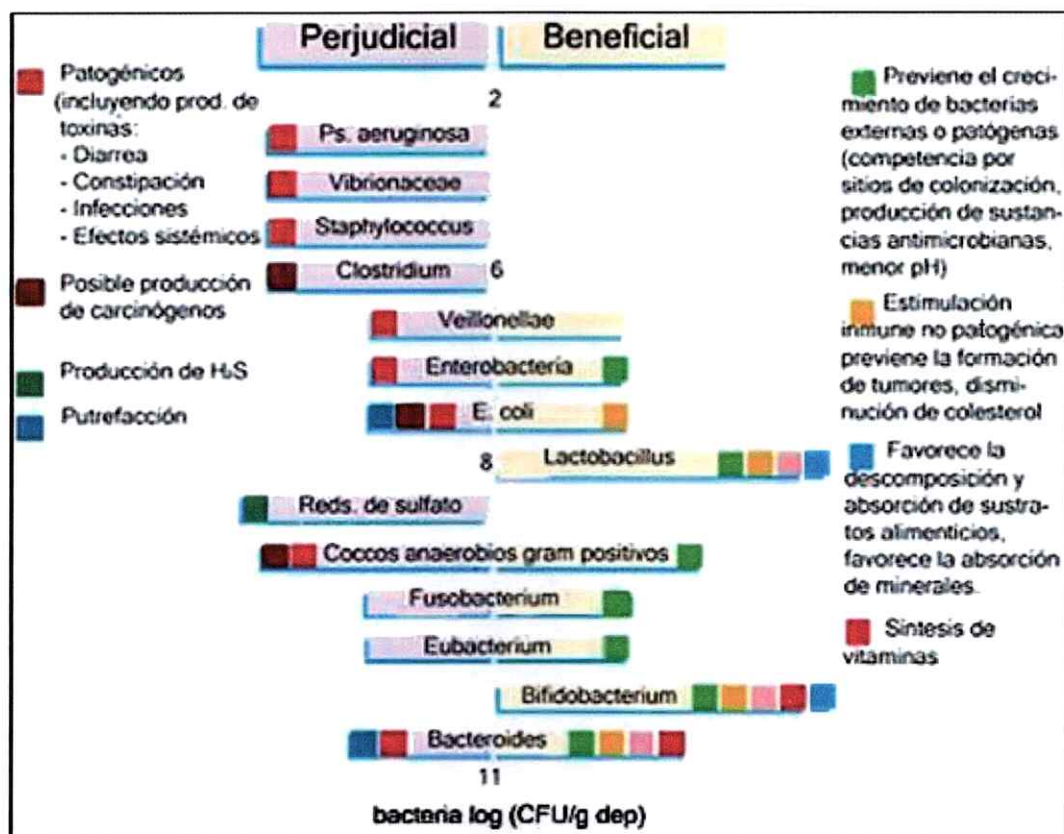


Figura 2: Principales poblaciones encontradas en la microbiota intestinal, ordenadas de acuerdo a su concentración. Se muestran en la figura distintas actividades beneficiosas o perjudiciales para la salud del huésped que ellas ejercen.

La mayoría de los estudios sobre microbiota intestinal se han realizado a partir de muestras de deposición, cuya composición es similar a la del colon distal (Moore y col, 1978). Sin embargo, estudios recientes sugieren que la microbiota fecal no es totalmente similar a aquella presente a nivel colónico y que además, existen diferencias cualitativas y cuantitativas entre la microbiota del colon proximal y la del colon distal, debido a las distintas cantidades de nutrientes que llegan a estos distintos niveles (Marteau y col, 2001).

La microbiota intestinal es capaz de ejercer múltiples actividades que afectan al organismo tanto a nivel local como general, y que pueden variar durante el curso de la vida del individuo, como de un sujeto a otro. La microbiota posee un importante papel metabólico, nutricional y de defensa (Gotteland, 1999; Isolauri y col, 2004).

Se considera que la microbiota intestinal ejerce una actividad metabólica equivalente a la del hígado. Participa en la regulación del pH y del potencial redox intraluminal y sobretodo, la gran diversidad de actividades enzimáticas presentes en la microbiota permite la degradación de casi todos los compuestos exógenos y endógenos que ingresan al colon. Por ejemplo, juega un papel en la desconjugación y deshidroxilación de los ácidos biliares, en la degradación del colesterol, en la síntesis de amoníaco a partir de úrea, así como en el metabolismo de xenobióticos. Por otra parte, enzimas expresadas por algunas poblaciones bacterianas también participan en la producción de metabolitos mutagénicos o procancerígenos para las células del tracto GI (McBain & MacFarlane, 1998).

A nivel nutricional, cabe destacar que varios miembros de la microbiota producen vitaminas, principalmente B12 y K, las que son absorbidas por el organismo. También la microbiota participa de manera activa en la degradación de las proteínas, lípidos y sobretodo de los hidratos de carbono (fibras) que no han sido hidrolizados por

las enzimas pancreáticas e intestinales ni absorbidos por la mucosa intestinal y que llegan al colon proximal. Este fenómeno llamado **rescate colónico**, libera gases (H_2 , CH_4 , CO_2) y ácidos orgánicos (acetato, propionato, butirato, lactato, etc.), que son absorbidos y metabolizados por el organismo, limitando así la pérdida energética que representa su eliminación en las deposiciones (Simon & Gorbach, 1984; Leclerc & Moriamez, 1980). La importancia de este fenómeno está ilustrado en ratones axénicos (concebidos y criados en condiciones de esterilidad, de forma tal que no albergan microorganismos), los que requieren un 30% más de energía en su dieta, y suplementación de vitaminas B y K, para mantener una curva de peso similar a la de los animales convencionales (Hooper y col, 2002).

La microbiota intestinal tiene un papel importante en la defensa de la mucosa intestinal: las poblaciones dominantes ejercen un "efecto de barrera" frente a potenciales patógenos presentes en el lumen, mediante competencia por los sustratos disponibles y por los sitios de adhesión en la mucosa; acidificación del medio intraluminal por la producción de ácidos orgánicos; y la liberación de actividades bactericidas, y estimulación del sistema inmune (Gronlund y col, 2000; Cebra, 1999). La ruptura de esta barrera, por ejemplo mediante la administración de antibióticos, puede resultar en la proliferación de poblaciones oportunistas, tal como *Clostridium difficile*, lo que representa un riesgo para la salud del huésped (Adlerberth y col, 2000).

Finalmente, la microbiota intestinal constituye un importante estímulo para la maduración del sistema inmune local y el desarrollo de la respuesta inmune secretora. Al nacimiento, el sistema inmune asociado a la mucosa del tracto GI (GALT) es inmaduro y se desarrolla principalmente gracias al contacto con microorganismos; el número y tamaño de las placas de Peyer y el número de células productoras de IgAs se incrementa en su presencia, promoviendo el componente inmunológico de la

barrera intestinal (Moreau, 2000). Los animales axénicos tienen un número menor de folículos linfoides y placas de Peyer, y menores niveles de IgAs.

La microbiota está también implicada en la regulación de la angiogénesis intestinal y en la modulación de la proliferación y diferenciación de los distintos lineajes epiteliales (Stappenbeck y col, 2002), y en el almacenaje de grasa y su distribución (Backhed y col, 2004). La ausencia de microbiota en los animales axénicos se asocia con un aumento notable en el tamaño del ciego, en cambios morfológicos de la mucosa, en la disminución del recambio celular y del índice mitótico del epitelio, en una menor vascularización de las vellosidades, y en la reducción del peristaltismo (Gotteland, 1999).

3. Establecimiento y alteraciones de la microbiota intestinal

El recién nacido nace con un tracto GI estéril. Inmediatamente después del parto empieza la colonización microbiana del tubo digestivo. En caso de parto natural el neonato está expuesto a la microbiota vaginal y sobretodo fecal de la madre. Los primeros microorganismos que colonizan el intestino del recién nacido en este caso son en general anaerobios facultativos, los cuales consumen el oxígeno presente y reducen el potencial redox intraluminal. Estos contribuyen a generar un ambiente más favorable para los anaerobios estrictos de tal manera que después de dos o tres días, éstos se convierten en la microbiota dominante del recién nacido (Favier y col, 2002).

En el caso de parto por cesárea, la colonización es más aleatoria y los microorganismos que colonizan provienen en general del personal hospitalario presente. Se estima que la colonización es menos intensa y más lenta que en caso de parto vaginal. La asepsia del lugar de parto y/o la intensidad de la contaminación microbiológica del ambiente es también un factor importante: se ha observado, por ejemplo que la colonización de niños nacidos en Pakistán es más rápida e intensa que aquella de niños nacidos en Suecia (Adlerberth y col, 1991). El establecimiento de la microbiota está, además, profundamente influenciado por la dieta a la cual el recién nacido está sometido. La presencia de altas concentraciones de oligosacáridos en la leche materna (> 10 g/l) hace que los niños amamantados posean una microbiota más homogénea y dominada por bacterias del género *Bifidobacterium*, mientras que la colonización de los niños alimentados por fórmula es más heterogénea e involucra tanto a *Bifidobacterium* como a otras especies, como *Streptococcus*, *Bacteroides* y *Clostridium* (Favier y col, 2002). La microbiota de los niños adquiere mayor complejidad cuando se empieza a diversificar su alimentación al momento del destete. Se estima

que la microbiota del niño se estabiliza alrededor de los 3 años (Favier y col, 2002). Durante la vida adulta, la microbiota intestinal es extremadamente estable y única para cada individuo en el tiempo. Sin embargo, los niveles de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* tienden a disminuir durante el envejecimiento, probablemente debido a cambios en las propiedades de adhesión de la mucosa (Saunier & Doré, 2002; Ouwehand y col, 1999). El hecho de que la composición de esta microbiota sea única para cada individuo puede sugerir que factores idiosincrásicos, relacionados con la constitución genética del huésped modulan la microbiota intestinal (Tannock, 2005).

Por otra parte, es importante destacar que las alteraciones de la microbiota intestinal están asociadas con varias situaciones patológicas: lo más común es el caso de los individuos con constipación o con diarrea aguda, persistente o asociada a antibióticos (Sullivan y col, 2001). Más complejo es el caso de los pacientes que padecen patologías inflamatorias crónicas del intestino, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En dichas patologías, miembros de la microbiota como *Fusobacterium*, *Eubacterium* o levaduras han sido implicados directamente como agentes etiológicos (Marteau y col, 2004; Ohkusa y col, 2003). Alteraciones del sistema inmune tales como aquellas observadas en niños alérgicos se asocian a menores niveles de bifidobacteria y mayores niveles de clostridiales comparados con niños no-alérgicos. (Kirjavainen y col, 2002). Personas que padecen de ciertas patologías auto-inmunes como artritis reumatoide también presentan desequilibrios de su microbiota (Mercenier y col, 2002). Cabe destacar que las alteraciones de la microbiota presentes en aquellas patologías, frecuentemente se asocian con alteraciones de la función gastrointestinal de barrera, lo que se refleja en un aumento de la permeabilidad intestinal. La microbiota intestinal también puede ser alterada por el consumo de fármacos como laxantes, antiinflamatorios y sobre todo antibióticos (Brunser y col, en prensa).

En la actualidad se ha propuesto el consumo de compuestos dietarios específicos como una manera de regular la homeostasis de la microbiota intestinal. Entre ellos están los prebióticos, carbohidratos no digestibles que estimulan selectivamente el crecimiento de bifidobacteria y lactobacilli a nivel colónico (Manning & Gibson, 2004; Gibson, 1999), y los probióticos, microorganismos seleccionados por sus propiedades específicas beneficiosas para la salud.

4. Probióticos

Muchos de los alimentos que se han ingerido desde la antigüedad son fermentados y contienen microorganismos que probablemente afectan a la microbiota del huésped. La generalización de las técnicas de esterilización de los alimentos, sin embargo, ha resultado en una disminución progresiva de la ingestión de estos microorganismos de la dieta. Es interesante notar que, paralelamente a la disminución del consumo de alimentos fermentados con microorganismos vivos ocurrida en las últimas décadas, se ha observado un aumento de la prevalencia de las patologías inflamatorias crónicas del intestino, autoinmunes y alérgicas. Fue Metchnikoff, a principios del siglo pasado, quien primero propuso que la longevidad de los campesinos búlgaros se debía a su consumo de importantes cantidades de yogurt fermentado con *Lactobacillus* (Metchnikoff, 1907). El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido un mejor conocimiento de los ecosistemas bacterianos, tanto de los alimentos fermentados como del tubo digestivo, lo cual ha favorecido la emergencia del concepto de probiótico.

Un probiótico se ha definido actualmente como un *microorganismo vivo que, administrado en cantidades adecuadas, confiere un beneficio para la salud del huésped.* (Reid y col, 2003).

Varios tipos de microorganismos son actualmente usados como probióticos. Los más comunes pertenecen al grupo de las bacterias lácticas (LABs) que incluyen a microorganismos del género *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*), *Bifidobacteria* (*B. breve*, *B. lactis*) y *Enterococcus*, los que en su

mayoría son también miembros de la microbiota intestinal humana. Otros géneros incluyen a cepas de *Escherichia coli*, *Streptococcus*, y a *Saccharomyces boulardii*.

Varios criterios son tomados en cuenta para la selección de probióticos (Mercenier y col, 2002; Gotteland, 1999). Las cepas deben ser inocuas para el ser humano, genéticamente estables y poseer propiedades tecnológicas compatibles con los procesos de producción. Deben ser preferencialmente de origen humano lo cual le asegura un mayor tropismo con el huésped y una mayor probabilidad de sobrevivir en el tubo digestivo, es decir, de resistir al pH gástrico y a las sales biliares. La capacidad de adhesión a la mucosa intestinal, considerado como criterio de selección por un largo tiempo, es actualmente debatido ya que podría favorecer la traslocación microbiana a través de la mucosa. Finalmente las cepas seleccionadas deben ejercer efectos fisiológicos específicos y que resulten beneficiosos para la salud del huésped.

Entre los principales efectos de los probióticos están la estimulación del sistema inmune local y sistémico, la defensa e interferencia frente a patógenos gastrointestinales, la regulación de los procesos inflamatorios y la disminución de actividades enzimáticas procarcinogénicas, entre otras. Dichos efectos han sido evaluados utilizando como modelos distintas patologías en las cuales la microbiota intestinal está alterada tales como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, cáncer colorectal, constipación, colon irritable, diarrea asociada a antibióticos, infecciosa o por *Clostridium difficile*, o la colonización gástrica por *Helicobacter pylori*. También se utilizan en caso de intolerancia a la lactosa y en otras patologías como alergia o la artritis (Isolauri y col, 2004; Mercenier y col, 2002; Ouwehand y col, 2002). El hecho que los probióticos ejerzan ciertos efectos protectores en situaciones patológicas sugiere que podrían cumplir un rol preventivo en los individuos sanos.

5. *Lactobacillus johnsonii* La1

Lactobacillus johnsonii La1 (NCC 533) es una bacteria originalmente aislada de heces humanas, cuyas propiedades probióticas han sido ampliamente descritas tanto en modelos *in vitro* y animales como en ensayos clínicos. Actualmente entra en la composición de productos probióticos comercializados en varios países incluyendo Chile; se estima que durante el año 1997 se han consumido más de 10^{18} células vivas de La1 en el mundo (Lapierre y col, 1999).

Taxonómicamente, *L. johnsonii* pertenece al grupo de *Lactobacillus acidophilus*, que comprende además 5 otros subgrupos al nivel de especies (homología DNA-DNA): *L. acidophilus*, *L. gallinarum*, *L. crispatus*, *L. amylovorus* y *L. gasseri* (Fujisawa y col, 1992). El contenido de G+C del DNA en *L. johnsonii* varía entre 32.7 y 34.8%. Morfológicamente aparecen en el microscopio como bastones largos (0.5 a 1.5 μm de ancho y 1.5 a 10 μm de largo) e individualizados, en pares o en cadenas cortas. Fujisawa y col. (1992) describe a *L. johnsonii* como un bacilo anaerobio facultativo, Gram-positivo, no formador de esporas, catalasa negativo, tolerante a 4% NaCl, y que produce, sin liberación de gas, ácido D y L-láctico como principal producto de fermentación a partir de glucosa, manosa, maltosa, galactosa, sacarosa, fructosa, celobiosa, dextrina, escualina, salicina y amigdalina. El principal nicho ecológico conocido para *L. johnsonii* es el tracto GI de humanos y animales.

L. johnsonii La1 fermenta la glucosa produciendo una mezcla racémica de ácido D(-) y L(-) láctico, en una relación 60:40%, y la no aparición de otros subproductos revela que La1 es un homofermentativo estricto (Lapierre y col, 1999). La1 es capaz de adherir a células epiteliales intestinales *in vitro*, mediante el ácido lipoteicoico, uno de

los principales constituyentes de su pared celular (Granato y col, 1999) y el factor de elongación EF-TU (Granato y col, 2004). La1 sobrevive a pH gástrico y expresa tres actividades hidrolasas de sales biliares (BSH) que le permiten desconjugar estas sales y resistir a su acción bactericida (Elkins y col, 2001). La1 estimula la respuesta inmune local y sistémica, aumentando los niveles de IgAs y las actividades fagocíticas y de las células Natural Killer (NK) (Haller y col, 2000). Además, es capaz de antagonizar la respuesta proinflamatoria inducida por LPS (mediada por el sCD14) (Vidal y col, 2002) y ejercer actividades inhibitorias frente a un amplio espectro de patógenos (Bernet-Camard y col, 1997), como ha sido mostrado, por ejemplo, *H. pylori* en adultos y niños (Cruchet y col, 2003; Gotteland & Cruchet, 2003).

La reciente secuenciación del genoma de *Lactobacillus johnsonii* La1 ha aportado valiosa información acerca de este microorganismo (Pridmore y col, 2004). Su genoma mide 1.99Mb, con un contenido de G+C de un 34.6%, posee seis copias del operón *mm* ubicados en cuatro loci, 79 tRNAs, y dos profagos completos (Ventura y col, 2003a). Su análisis muestra que La1 es incapaz de llevar a cabo la síntesis *de novo* de la mayoría de los aminoácidos, dada su carencia en las distintas vías metabólicas requeridas para este proceso. También carece de genes relacionados con la asimilación de amonio y la síntesis *de novo* de purinas, así como genes relacionados con el metabolismo de oligo y polisacáridos, a diferencia de, por ejemplo *L. plantarum* (Klaenhammer y col, 2005). Por otra parte el 15% de los ORFs del genoma de La1 está involucrado en funciones de transporte de cofactores, aminoácidos y otros precursores esenciales; se observa además una sobreabundancia de ciertos tipos menos comunes de transportadores. La1 posee un número inusual de transportadores de péptidos, así como peptidasas y proteinasas, las cuales están presentes en la pared celular o en el

citoplasma. Se destaca también la presencia de varias disacaridasas citoplasmáticas y transportadores de mono, di y trisacáridos.

También se destaca en La1 la presencia de varios ORFs relacionados con los procesos de adhesión y de inmunomodulación a nivel de mucosa intestinal: lipoproteínas de superficie, proteínas de unión a mucosa (MUBs), proteínas fimbriales, IgA proteasas así como enzimas que catalizan la producción de polisacáridos. Finalmente, La1 posee en su genoma los genes necesarios para la síntesis de una bacteriocina, la lactacina F (Abee y col, 1994), la que parece no expresarse debido a la presencia de un elemento de inserción en uno de estos genes.

La información aportada por el análisis del genoma de La1 revela que este microorganismo posee una marcada adaptación fisiológica y metabólica a las condiciones que prevalecen en el intestino delgado, pero sugiere que no es particularmente competitivo en el medio colónico.

6. Métodos moleculares aplicadas al estudio de la microbiota intestinal y bacterias lácticas

La microbiota fecal se ha estudiado tradicionalmente mediante cultivo en medios selectivos, en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis. Se estima, sin embargo, que más del 60% de las bacterias pertenecientes a la microbiota intestinal no es cultivable con los medios clásicos (Kimura y col, 1997). El desarrollo de las técnicas moleculares basadas en ácidos nucleicos bacterianos ha permitido superar las limitaciones asociadas al uso de medios selectivos y ha reactivado el estudio de los ecosistemas bacterianos complejos como la microbiota intestinal, permitiendo una evaluación rápida y completa de su biodiversidad.

Estas técnicas utilizan principalmente el DNA ribosomal o el rRNA de la subunidad 16S o 23S, presente en un alto número de copias en todas las células, donde ejerce la misma función. Esta molécula constituye un buen marcador de evolución, ya que los cambios debidos a mutaciones del RNA 16S permiten definir regiones conservadas y regiones variables, convirtiéndolo en una molécula mosaico. Además, la molécula es lo suficientemente larga para ser informativa. Los dominios conservados son útiles para comparar especies o géneros distantes mientras que las regiones variables permiten comparar especies próximas taxonómicamente.

A partir del rDNA 16S extraído de una comunidad bacteriana se pueden construir inventarios moleculares mediante amplificación por PCR con primarios universales y la posterior clonación y secuenciación de los amplicones obtenidos. La secuenciación de algunos de estos clones ha puesto en evidencia diferentes especies bacterianas jamás encontradas, donde cerca del 80% de los clones obtenidos desde

una muestra fecal corresponde a microorganismos no conocidos (Suau y col, 1999; Vaughan y col, 2005).

El uso del rDNA 16S en ecología microbiana presenta algunas limitaciones: el número de copias del operón *rrn* en el DNA en procariontes es variable, de uno a quince por célula. Además, existen reportes de casos de transferencia horizontal de esta molécula, y en algunos casos el rDNA 16S no es capaz de discriminar ciertas especies bacterianas. En este caso, una alta homología a nivel del rDNA 16S no se refleja en la homología DNA/DNA (Forney y col, 2004).

Una de las técnicas independientes de cultivo y basada en las regiones conservadas y variables del rRNA es la Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH). El uso de sondas oligonucleotídicas específicas, marcadas en su extremo 5' con un fluorocromo, y cuya secuencia blanco es el rRNA 16S, permite la detección de células individuales en ecosistemas complejos gracias al gran número de esta molécula presente en las bacterias (unas 20 a 30.000 copias) lo cual permite una gran amplificación de la señal. La cuantificación puede realizarse mediante microscopía de fluorescencia, así como también mediante citometría de flujo (Rigottier-Gois y col, 2003; Rochet y col, 2001; Daims y col, 1999; Franks y col, 1998; Harmsen y col, 1999; Harmsen y col, 2002; Harmsen y col, 2003; Suau y col, 2001).

Otros métodos de tipificación o identificación son independientes del rRNA 16S, como por ejemplo la Amplificación al Azar de DNA Polimórfico (RAPD) o la Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE), entre otras. Una reciente aplicación a este campo consiste en el uso de secuencias repetitivas conservadas dispersas en el genoma de enterobacterias (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences, ERIC-PCR), la cual genera patrones de amplificación que permiten

diferenciar las bacterias incluso al nivel de cepa (Ventura y col, 2003b; Ventura & Zink, 2002; Wei y col, 2004; Jersek y col, 1999; de Bruijn, 1992).

Otra forma semicuantitativa de estimar la biodiversidad de comunidades microbianas complejas a partir de su DNA es el PCR asociado con electroforesis en gradiente de temperatura o de denaturación (PCR-TTGE o DGGE, Temporal Temperature Gradient Electrophoresis o Denaturant Gradient Gel Electrophoresis respectivamente). En ambos métodos, el DNA bacteriano total presente en la comunidad es extraído y una región variable del 16S rDNA es amplificada usando partidores específicos donde uno de ellos posee una extensión (clamp) de GC. Este proceso genera una mezcla de fragmentos del mismo tamaño pero de distinta secuencia y composición en guanina y citosina, los que luego son sometidos a una electroforesis en gradiente de denaturación o en un gradiente temporal de temperatura. La TTGE en particular separa dichos fragmentos según su movilidad electroforética, la cual es función de la temperatura a la cual ocurre su denaturación. Cuando la gradiente de temperatura alcanza la temperatura de melting (T_m) de los fragmentos de DNA en migración, estos se denaturan parcialmente y detienen su migración. La presencia de la extensión GC impide que los fragmentos denaturados sean eliminados del gel (Kimura y col, 1997; Ogier y col, 2002; McCartney y col, 1996; Tannock y col, 2004b; Simpson y col, 1999).

HIPOTESIS

Se plantea que el consumo regular de un producto que contiene *L. johnsonii* La1 modula la microbiota intestinal en adultos sanos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto de la ingestión de distintas cantidades de un producto con *L. johnsonii* La1 sobre la microbiota intestinal en adultos sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar cuantitativamente la excreción fecal de La1 en función de las distintas cantidades de probiótico ingerido y comparar la eliminación del probiótico con aquella de un marcador de tránsito intestinal.
2. Cuantificar los géneros dominantes y subdominantes de la microbiota intestinal y analizar su variación según la ingestión de distintas cantidades de La1, mediante Hibridación Fluorescente *in situ* acoplada con citometría de flujo.
3. Evaluar los cambios en las especies moleculares dominantes de la microbiota intestinal, así como en las poblaciones de *Lactobacillus*, debido a la ingestión de La1, mediante PCR-TTGE.

MATERIALES Y METODOS

1. Reclutamiento de voluntarios

Ocho voluntarios asintomáticos, cuatro hombres y cuatro mujeres (27.3 ± 7.6 años; rango [19-40 años]), sin diagnóstico previo de patologías gastrointestinales o historial de administración de antibióticos, antiácidos, laxativos o prokinéticos, a lo menos tres meses antes del inicio del estudio, fueron reclutados en el estudio. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del INTA, y cada voluntario firmó una carta de consentimiento informado para ser aceptado en el protocolo. Los voluntarios no modificaron su dieta durante el estudio, salvo la limitación en el consumo de otros productos lácteos fermentados y probióticos durante la duración del estudio. El producto lácteo que contenía La1 fue ofrecido como una botella de 100 ml, la cual contenía 14.7 g de carbohidratos, 0.9 g de proteínas y 0.03 g de lípidos, y aportando 63 Kcal (Chamyto, Nestlé Chile SA, Santiago, Chile). *Lactobacillus johnsonii* La1 estaba presente en el producto a una concentración de 1×10^8 CFU/ml; además, una cepa no-probiótica requerida para la elaboración del producto (*L. helveticus*) estaba presente en el producto a una concentración de 2×10^7 CFU/ml.

2. Diseño del protocolo

Un esquema del protocolo del estudio se muestra en la Tabla 1. Después de un periodo basal de cinco días, los voluntarios ingirieron diariamente una unidad del producto que contenía La1 (100 ml) durante una semana, dos unidades diarias la segunda semana (200 ml) y cinco unidades diarias (500 ml) durante la tercera semana. Durante el último periodo de ingestión, simultáneamente con la ingestión de cada botella los voluntarios ingirieron una alícuota de 100 µl de una suspensión que contenía 7×10^7 CFU/ml de esporas de *Bacillus stearothermophilus* (Merck, Darmstadt, Alemania) usadas como marcador de tránsito intestinal (Bouhnik y col, 1992). El estudio contempló además un periodo post-ingestión donde los voluntarios dejaron de ingerir el producto y mantuvieron la limitación del consumo de otros productos lácteos fermentados (Tabla 1). Se recolectaron muestras fecales frescas en los días -5 y 0 (i.e. antes del tratamiento), en los días 7, 14, 18 y 21 del periodo de tratamiento y a los 3, 7, 10, 14 y 49 días después de haber terminado la ingestión del producto (Tabla 1). Las muestras fueron colocadas en recipientes estériles y guardadas en condiciones de anaerobiosis (Anaerocult, Merck, Darmstadt, Germany) a 4° C hasta su procesamiento en el laboratorio, por no más de cuatro horas. La eventual aparición de sintomatologías gastrointestinales fue registrada durante el estudio.

Tabla 1: Protocolo del estudio. Se muestran los tres periodos de ingestión del producto, los días en los cuales se realizaron la toma de muestras fecales, los días en los cuales los voluntarios ingirieron el marcador de tránsito intestinal, y las muestras (marcadas con una X) sobre las cuales se hizo el análisis por recuento en MRS o PCA, FISH o PCR-TTGE.

PERIODO	BASAL		INGESTION				POST-INGESTION				
	-5	-0	100 ml	200 ml	500ml		3	7	10	14	49
Días (Muestreo)			7	14	18	21					
Esporas					X	X					
MRS-PCA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
FISH	X	X	X	X		X		X		X	X
PCR-TTGE		X				X				X	

3. Cuantificación de *Lactobacillus* totales, La1 y *B. stearothermophilus*

Para este análisis se consideraron las muestras fecales correspondientes a los días -5 y 0 del periodo basal, los días 7, 14, 17 y 21 del periodo de ingestión, y las correspondientes a los días 3, 7, 10, 14, y 49 del periodo post-ingestión (Tabla 1). Un gramo de cada muestra fecal fue diluido 10 veces en PBS estéril y homogeneizada por vórtex con seis perlas de vidrio de seis mm de diámetro. Una centrifugación de 2 min a 300g a 4° C permitió eliminar las partículas de mayor tamaño. El sobrenadante fue diluido serialmente y las diluciones adecuadas fueron plaqueadas en agar Mann-Rogosa-Sharp (MRS), o en Plate Counting Agar (PCA) para la cuantificación de lactobacilli total y *B. stearothermophilus*, respectivamente. Las placas de MRS agar fueron incubadas 48h a 37° C en condiciones anaeróbicas, usando generadores de anaerobiosis (Anaerokult, Biomerieux), y las placas PCA fueron incubadas por 24 h a 65° C en aerobiosis. Los niveles de *Lactobacillus* totales y *B. stearothermophilus* fueron evaluados mediante recuento de las unidades formadoras de colonia, en las placas que contenían entre 30 y 300 colonias. La detección de La1 fue realizada en principio mediante el aspecto morfológico de las colonias, luego diez colonias en cada placa fueron recultivadas en 1 ml de caldo MRS por 24 h a 37° C, y una alícuota fue conservada en MRS-glicerol 30% a -80° C.

4. Confirmación molecular de la identidad de La1 por ERIC-PCR

Las colonias almacenadas fueron recultivadas en caldo MRS, rayadas en MRS agar y cultivadas por 48 h. a 37° C; una colonia fue suspendida en 50 µL de Tris-EDTA y esta suspensión fue puesta por 10 min a 95° C. Un microlitro de esta suspensión fue agregada a una mezcla de reacción de PCR, la que contenía 2.5 U de Taq Polimerasa, 200 µM dNTPs, 3mM MgCl₂ y 1 µM de los partidores ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC-II (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3') (Ventura & Zink, 2002) en un volumen final de 25 µl. El DNA bacteriano fue amplificado usando un termociclador M.J. Research. El programa de amplificación incluyó un paso de denaturación inicial (10 min a 95° C), seguido de 40 ciclos de denaturación (1 min. a 95° C), apareamiento (1 min a 48° C) y extensión (5 min a 72° C), y una extensión final (7 min a 72° C). Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en agarosa al 2%, teñidos en una solución de 0.5 ng/ml bromuro de etidio, y visualizados en un transiluminador a 254 nm.

5. Análisis de las poblaciones predominantes de la microbiota intestinal mediante FISH y citometría de flujo

El análisis por FISH fue hecho en las muestras correspondientes a los días -5 y 0 del periodo basal, los días 7, 14 y 21 del periodo basal, y los días 7, 14 y 49 del periodo post-ingestión (Tabla 1). Doscientos microlitros de cada muestra fecal previamente diluida y homogeneizada fueron fijados por 16 h a 4° C en paraformaldehído 4%. Este proceso tiene como fin la inactivación del metabolismo celular y nucleasas, sin destruir la arquitectura celular de las bacterias. Esta suspensión fue posteriormente conservada a -80° C hasta su procesamiento. Las muestras fijadas fueron lavadas con PBS, centrifugadas a 8000 rpm por 3 min, y nuevamente lavadas en buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), y permeabilizadas 10 min con lisozima (1 mg/ml en buffer TE). La presencia de bacterias Gram positivas en la microbiota intestinal vuelve necesario el uso de lisozima para permeabilizar dichas células y permitir el ingreso de las sondas oligonucleotídicas. El pellet bacteriano fue nuevamente lavado en PBS, centrifugado y resuspendido en buffer de hibridación (0,9 M NaCl, 20 mM Tris HCl, 0,01% SDS, 30% formamida). La formamida es un agente denaturante que disminuye la estrictez del medio, y dada la variabilidad en la composición nucleotídica de las sondas y en su temperatura de hibridación con el rRNA 16S, permite el uso de una temperatura de hibridación uniforme. La suspensión fijada en el buffer de hibridación (450 µl) fue alicuotada en ocho tubos (50 µl/tubo). A cada tubo se le adicionó 4 µl de una solución de la sonda oligonucleotídica universal EUB338-FITC (50 ng/µl) para la determinación del nivel total de bacterias, y 4 µl de

Tabla 2: Sondas oligonucleotídicas usadas en el estudio

Sondas	Secuencia 5'- 3'	Código OPD	Referencia
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	S-D-Bact-0338-a-A-18	Amann y col, 1995
NonEub338	ACATCCTACGGGAGGC	NA	Wallner y col, 1993
Bac303	CCAATGTGGGGACCTT	S*-Bacto-0303-a-A-17	Manz y col, 1996
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	S-G-Bif-0164-a-A-18	Langendijk y col, 1995
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	S*-Lab-0158-a-A-20	Harmsen y col, 1999
Chis150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	S*-Chis-0150-a-A-23	Franks y col, 1998
Erec482	GCTTCTTAGTCARGTACCG	S*-Erec-0482-a-A-19	Franks y col, 1998
Fprau645	CCTCTGCACTACTCAAGAAAAC	S*-Fprau-0645-a-A-23	Suau y col, 2001
Ato291	GGTCGGTCTCTCAACCC	S*-Ato-0291-a-A-17	Harmsen y col, 2000

otra sonda género-específica oligonucleotídica (50 ng/μl) marcada en su extremo 5' con Cy5 (Tabla 2). Un tubo control, que contiene las sondas Eub338-FITC y NONEub-Cy5, fue usado en cada caso para evaluar el nivel de autofluorescencia de las muestras. Después de una incubación de 16h a 35° C, las bacterias fueron lavadas en 200 μl de la solución de lavado (0.065 M NaCl, 20 mM Tris HCl [pH 8.0], 5 mM EDTA [pH 8.0], 0,01% SDS), y resuspendidas en 200 μl de PBS estéril.

Una alícuota de la suspensión hibridada (50 μl) fue adicionada a 1 ml de FacsFlow (Becton Dickinson) en un tubo de poliestireno. Adicionalmente a los tubos correspondientes a la sonda Lab158 se les agregó 2 μl de una suspensión previamente sonicada de microesferas fluorescentes de poliestireno de 6 μm (Molecular Probes) con el fin de hacer un recuento absoluto de este género.

Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, usando un equipo FacsCalibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA). Se registraron las señales correspondientes a forward scatter (FSC), side scatter (SSC), y dos señales de fluorescencia. Un filtro de 530 nm fue usado para detectar la fluorescencia verde (FL1, FITC), y un filtro de 661 nm para detectar la fluorescencia roja (FL4, Cy5). En cada muestra se analizaron 100.000 eventos fluorescentes. La cuantificación de las microesferas presentes en los tubos correspondientes a la sonda Lab158 fue hecha mediante un gráfico Dot Plot de FSC versus SSC. El valor obtenido permitió determinar el volumen leído por el citómetro, a partir del cual se pudo calcular la concentración de la población en cuestión (número de eventos por gramo de deposición).

6. Extracción de DNA desde muestras fecales

Se extrajo el DNA de las muestras correspondientes a los días 0 del periodo basal, 21 del periodo de ingestión y 14 días del periodo de post-ingestión (Tabla 1). El protocolo fue adaptado de Godon (Godon y col, 1997). Alrededor de 125 mg de cada muestra congelada a -80° C, fueron mezclados con 38 μ l una solución de SDS al 10% y 250 μ l de isotiocianato de guanidinio 4M en Tris-Cl 0.1M pH 7.5. Esta última tiene como función inhibir la presencia de nucleasas. Esta mezcla fue homogeneizada en vórtex, e inmediatamente se le adicionó 500 μ L de SDS 5% en tampón fosfato 0.1M pH 8.0. Después de una incubación a 70° C por una hora para prelisar las células, se le adicionó a cada tubo un volumen de esferas estériles de zirconio de 0.1 mm de diámetro. Los tubos fueron puestos en un Mini Bead Beater (Biospec products) y se agitaron dos veces cinco min a velocidad media (3000 rpm). Este paso tiene por fin romper las células mecánicamente y liberar el DNA. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 15 mg de polivinilpirrolidona (PVPP), compuesto que actúa como un quelante de anillos aromáticos que pueden actuar como inhibidores de la reacción de PCR. Después de una centrifugación de 3 min a 15.000 g, el sobrenadante fue puesto en otro tubo y el precipitado que contenía las esferas y el material sólido fue lavado tres veces con 500 μ L de buffer TENP (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% PVPP), reuniendo cada sobrenadante obtenido con el primero. Una centrifugación de 1 min a 15.000g permitió que precipiten las suspensiones. A cada sobrenadante se le adicionó 1 ml de isopropanol, luego el contenido fue mezclado por

inversión y puesto 10 min a temperatura ambiente. Después de una centrifugación a 15000 g por 15 min, el DNA presente en el pellet fue resuspendido en 450 μ L de tampón fosfato 0.1M pH 8.0 y 50 μ L de KAc 5M, y puesto 90 min en hielo a fin de eliminar impurezas y DNA plasmidial. Estas impurezas fueron eliminadas mediante centrifugación a 15.000g por 30 min. Posteriormente, cada sobrenadante fue incubado con 20 μ L de RNAsa A (1 mg/ml), 30 min a 37° y el DNA fue precipitado mediante adición de 1 ml de etanol al 100% y NaAc 3M. En este punto el DNA fue recuperado por centrifugación: después de incubar el precipitado 10 min a temperatura ambiente la solución fue centrifugada 15 min a 15000g y el pellet se resuspendió en 500 μ L de buffer TE, luego de que se le adicionaron 500 μ L de isopropanol. Estos tres últimos pasos fueron repetidos tres veces. Finalmente, el precipitado se lavó con etanol 70%, fue centrifugado 5 min a 15000g, secado y resuspendido en buffer TE.

7. PCR-TTGE

Para este análisis se consideraron las muestras fecales a las cuales se les extrajo DNA (Tabla 1). Estos DNA fueron usados en dos reacciones de PCR, mediante amplificación usando partidores universales y otra con partidores específicos para *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weisella*. Para el primer análisis, 1 µl de la dilución 1 en 10 de cada DNA fue adicionada a una mezcla de reacción que contiene en un volumen final de 25 µl, Buffer Taq, 200 µM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 2.5U de Taq polimerasa, y 0.5 µM de los partidores HDA1GC (5' -**CGC CCG GGC CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T**- 3'), y HDA2 (5' GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C 3'). En negrita se muestra la extensión GC (Tannock y col, 2000). La amplificación consistió en un paso inicial de denaturación (94° C, 2 min), denaturación (94° C, 30 seg), apareamiento (58° C, 30 seg), y extensión (72° C, 1 min), por 25 ciclos, y finalmente un paso de extensión final de 72° C por cinco min. Estos partidores universales amplifican un fragmento de 180 bp, entre las posiciones 350 y 530 del operón *rmn* de *E. coli*, lo que corresponde a las regiones V2 y V3.

Para la reacción de PCR con los partidores lacto-específicos, un microlitro de cada DNA sin diluir fue adicionado a una mezcla de reacción que contiene en un volumen final de 25 µl, Buffer Taq, 200 µM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, 2.5U de Taq Polimerasa, y 0.5 µM de los partidores Lac1 (5' -AGC AGT AGG GAA TCT TCC A- 3'), y Lac2GC (5'-**CGC CCG GGC CGC GCC CCG GGC GGC CCG GGG GCA CCG GGG GAT TYC ACC GCT ACA CAT G**- 3'). En negrita se muestra la extensión

GC. (Walter y col, 2001) Este set de primers amplifica la zona V3 del 16S rRNA, entre las posiciones 352 y 700 del rDNA de *E. coli*, produciendo un fragmento de 340 bp. La amplificación consistió en un paso inicial de denaturación (94° C, 2 min), denaturación (94° C, 30 seg), apareamiento (56° C, 30 seg), extensión (72° C, 1 min) por 35 ciclos y finalmente un paso de extensión final (72° C, 5 min)

Los productos de ambas reacciones fueron verificados en electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y visualizados en un transiluminador a 254 nm.

Para la electroforesis en gradiente de temperatura (TTGE), se usaron vidrios de 16×16×1 cm. La composición fue la siguiente: úrea 7M, 1.25X de buffer TAE, y 10% de acrilamida/bisacrilamida para el gel con los productos de PCR con partidores universales, y 8% en el caso del PCR con partidores para *Lactobacillus*. La adición de 550 µl de persulfato de amonio (APS), al 10%, y 55 µl de Temed permitió la polimerización del gel. La electroforesis fue hecha en un equipo Decode Universal Detection System (Biorad, Hercules, California) en presencia de buffer TAE 1.25X. Una vez que la cubeta alcanzó una temperatura de 60° C, una alícuota de 8 µl de cada producto de PCR fue mezclada con 10 µl de un tampón de carga (0.05% azul de bromofenol, y 70% de glicerol) y cargada en cada pocillo. Como condiciones de corrida para la TTGE con partidores universales se usaron un rango de temperatura de entre 66 y 70.5° C, con una rampa de 0.4° C/h a 55 V, y para la TTGE con partidores lacto-específicos un rango de temperatura de entre 64 y 70° C, con una rampa de 0.2° C/h a 63V. Una vez terminada la migración y estabilizado el equipo, el gel fue lavado en agua destilada por 20 min y teñido con SYBRGreen 1X (SYBRGreen I Nucleic Acid Gel Stain, Invitrogene).

8. Análisis estadísticos

Las concentraciones de *Lactobacillus* totales y La1 fueron expresadas como \log_{10} (UFC) por gramo de deposición (promedio \pm error estándar medio). Los resultados de la FISH fueron expresados como \log_{10} (conteos celulares)/g deposición o como el porcentaje con respecto al total de eventos fluorescentes detectados con la sonda universal EUB338 (promedio \pm error estándar del promedio). Los cambios en los niveles de lactobacilli y La1 por cultivo anaeróbico, así como los de lactobacilli por FISH, fueron evaluados por análisis de varianza (Friedman test) para muestras repetidas y, en caso de diferencia significativa, estas diferencias fueron analizadas mediante el test de Wilcoxon. Los cambios en los porcentajes de las poblaciones bacterianas estudiadas por FISH fueron también determinados por el test de Friedman de varianzas para muestras repetidas, previa transformación angular de los datos, y también analizadas por el test de Wilcoxon en caso de diferencia significativa.

Los perfiles obtenidos en la TTGE usando partidores específicos para *Lactobacillus* fueron analizados mediante el software Gel-Pro Analyzer 3.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, Georgia). Para el análisis de cada carril se tomó en cuenta el número de bandas, su migración relativa y su respectiva intensidad medida como el área de su peak. La matriz generada fue analizada con los índices de Simpson, Shannon, y Sorenson (Simpson y col, 1999; <http://www.tiem.utk.edu/~gross/bioed/bealsmodules/shannonDI.html> - SimpsonDI.html). El índice de Shannon (D) es una estimación matemática que caracteriza la diversidad de especies en una comunidad. La proporción de cada especie i , relacionada al número total de especies, es calculada y elevada al cuadrado. La proporción de todas

las especies es sumada, y el recíproco corresponde al valor de D , según la fórmula $D = 1 / \sum (p_i)^2$

La equitatividad (E_D) puede ser calculada tomando el valor del índice de Simpson obtenido, y expresándolo como una proporción del máximo valor de D ($D_{max} = S$, número total de especies en la comunidad). La equitatividad toma un valor de 1 cuando cada especie está representada en la misma cantidad en la muestra.

El índice de Shannon (H) es otro índice usado para caracterizar la diversidad de especies en una comunidad. Como el índice anterior, toma cuenta de la abundancia y la uniformidad de una muestra. La proporción de una especie i relacionada al número total de especies es calculada y luego multiplicada por el logaritmo natural de esta proporción. El producto resultante es sumado entre las especies, y multiplicado por -1 : $H = -\sum (p_i \times \ln p_i)$.

La equitatividad del índice de Shannon (E_H), puede ser calculada dividiendo H por el valor de H_{max} , donde $H_{max} = \ln S$ (número total de especies en la muestra). El valor de E_H asume valores entre 0 y 1, siendo 1 completa uniformidad entre las especies.

El índice de Sorenson (C) sólo toma en cuenta el número de especies sin importar su abundancia y mide la similitud de especies en una muestra sólo considerando la presencia o ausencia de especies. El índice toma un valor de 0 si las muestras no tienen especies en común y 1 si son completamente similares. El índice corresponde a la siguiente fórmula: $C = 2j / (a + b)$, donde j es el número de especies en común en ambas muestras, a es el número de especies en la muestra A y b es el número de especies en la muestra B.

En el caso de los índices de Simpson y Shannon, cada valor de equitatividad obtenido para cada muestra y en cada voluntario fue recalculado mediante

transformación angular, y estos valores sometidos a un test de Friedman de varianzas para muestras repetidas. El análisis de los valores de Sorenson obtenidos para cada comparación (basal-ingestión-post-ingestión), fue sometido a transformación angular y al test de Friedman de varianzas para muestras repetidas. En los tres índices los resultados se expresaron como el promedio \pm error estandar medio.

RESULTADOS

1. Sujetos

Todos los voluntarios completaron el estudio y demostraron una buena tolerancia al producto, reportando sólo un leve incremento en la presencia de ruidos intestinales en la tercera semana de ingestión de cinco unidades diarias.

2. Determinación de los niveles fecales de *Lactobacillus*, *B. stearothermophilus* y La1

A nivel basal, el nivel promedio de *Lactobacillus* determinado por cultivo anaeróbico en MRS, fue de 8.44 ± 0.33 log UFC/g. Este valor fue modificado levemente por la ingestión de La1 (Friedman ANOVA: $\chi^2=18.4$; $p=0.049$), encontrándose que los niveles detectados de lactobacilli eran significativamente menores en los días 13, 17 y 20 del periodo postingestión, comparado con los niveles registrados durante la primera semana de ingestión (Figura 3).

La1 no fue detectado en ninguno de los voluntarios antes del periodo de ingestión. La administración de La1 resultó en la aparición del probiótico en las deposiciones de los ocho voluntarios durante el periodo de ingestión. La identidad de las colonias preidentificadas como La1 fue confirmada por ERIC-PCR (Figura 4) de

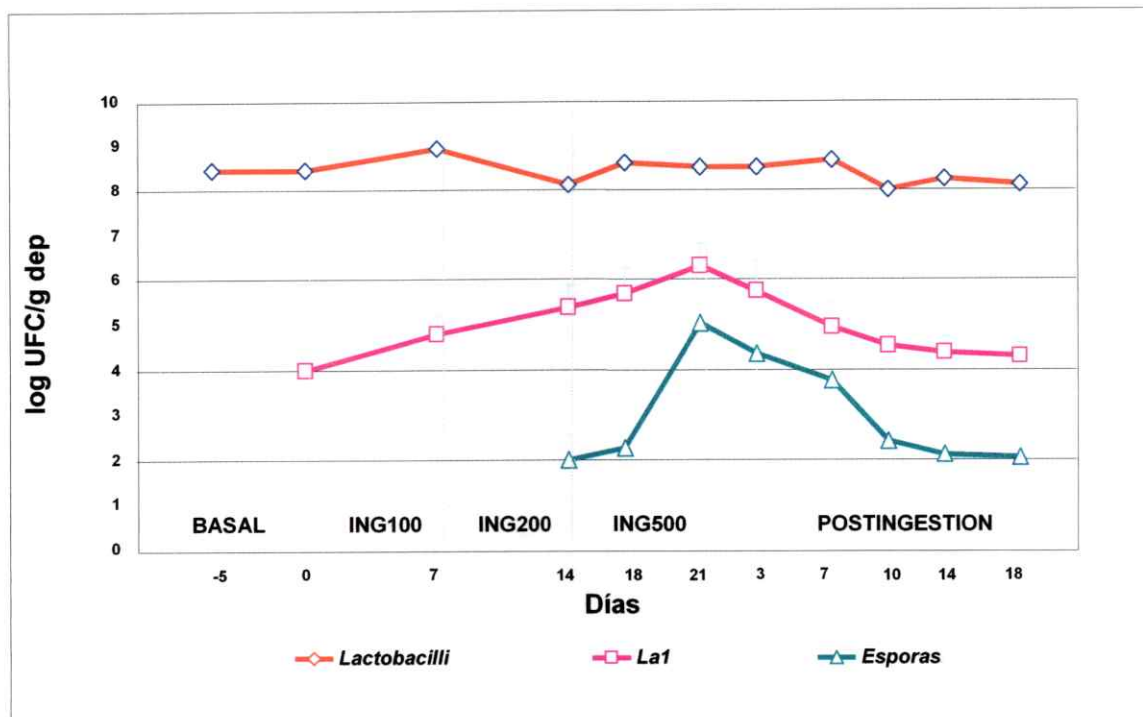


Figura 3: Recuento microbiológico de los niveles fecales de *Lactobacillus* totales (\diamond), *L. johnsonii* La1 (\square), y esporas de *B. stearothermophilus* (\triangle), en voluntarios sanos durante el periodo basal, periodo de ingestión, y periodo post-ingestión. Cada punto corresponde al promedio más error estándar medio del valor obtenido para cada voluntario en cada muestra

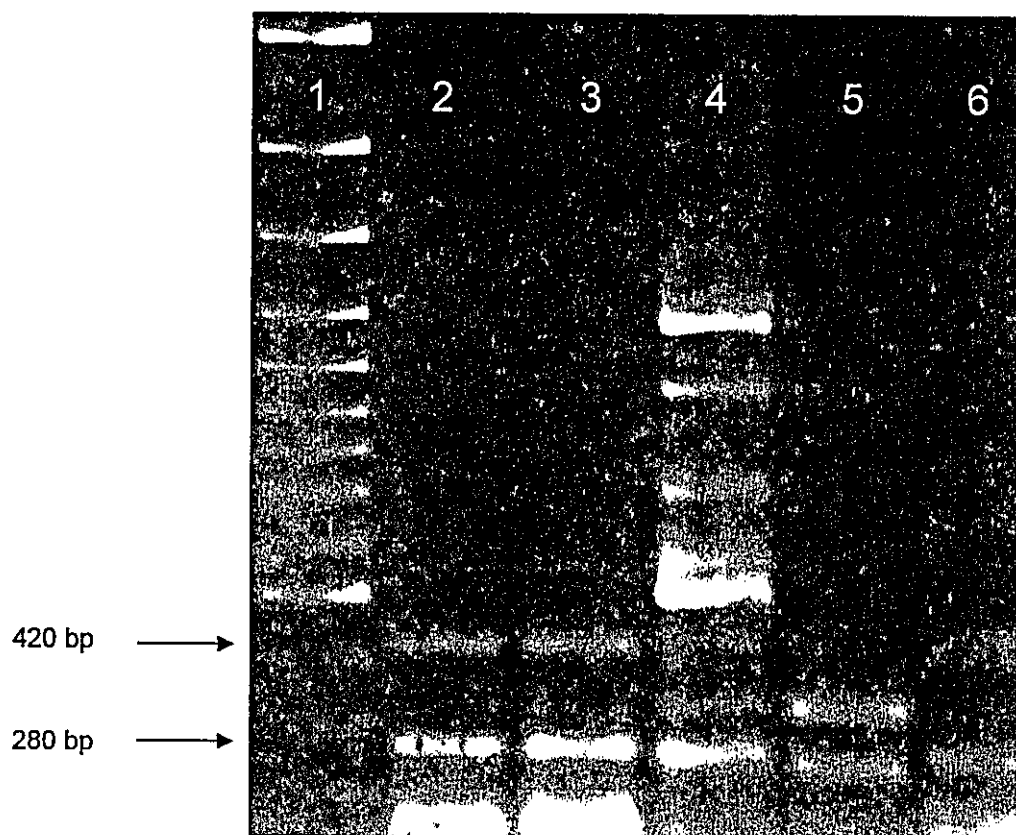


Figura 4: Identificación por ERIC-PCR de colonias de lactobacilli de origen fecal crecidas en agar MRS. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 bp; carril 2: control positivo La1; carriles 3 y 6: aislados identificados como La1; carriles 4 y 5: aislados no identificados como La1.

acuerdo a la aparición de por lo menos dos bandas específicas de *L. johnsonii*, una de 420 bp y otra de 280 bp (Ventura & Zink, 2002).

La concentración promedio de La1 en las muestras fecales aumentó paralelamente con la cantidad de producto ingerida (Figura 3), resultando en niveles superiores a 10^6 UFC/g de deposición (Friedman ANOVA: $\chi^2=25.8$; $p=0.0025$). Sin embargo, esta concentración de La1 representó sólo el 0.63% de la población total de *Lactobacillus*. Una vez finalizada la ingestión del producto, la excreción fecal del probiótico decayó en forma constante, siguiendo la misma cinética de eliminación del marcador de tránsito usado, esporas de *B. stearothermophilus*, las que son eliminadas pasivamente por el peristaltismo intestinal (Figura 3).

Después de siete días de haber terminado la ingestión del producto, La1 fue detectado en 7 de los 8 voluntarios; en el octavo voluntario La1 desapareció al día 17 post-ingestión. Siete semanas después de haber terminado la ingestión ningún voluntario presentó niveles detectables del probiótico en sus deposiciones (Figura 3).

3. Evaluación de los cambios en las poblaciones intestinales por FISH y Citometría de Flujo.

Usando un panel de sondas oligonucleotídicas fluorescentes cuyo blanco era el rRNA 16S bacteriano se evaluaron las proporciones de las principales poblaciones intestinales y cómo estas poblaciones fueron afectadas por la ingestión del producto. Las tres principales poblaciones observadas a nivel basal fueron el cluster de *E. rectale/C. coccoides*, *F. prausnitzii* y *Bacteroides/Prevotella*, las cuales representaron respectivamente el 37.7%, 18.3% y el 13.2% del total de bacterias detectadas con la sonda universal Eub338 (Figura 5A). El cluster de *Atopobium* representó un 8.6%, mientras que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus/Enterococcus* y el cluster de *C. histolyticum* estuvieron presentes como poblaciones subdominantes, representando sólo un 2.05%, 0.95% y 2.30% respectivamente del total de bacterias marcadas con la sonda Eub338 (Figura 5B). El panel de sondas oligonucleotídicas usado abarcó un 80% del total de bacterias detectadas con la sonda universal.

El uso de microesferas fluorescentes en los tubos con la sonda Lab158, específica para las especies de *Lactobacillus/Enterococcus*, permitieron realizar un recuento absoluto de esta población. Los niveles basales observados con esta sonda (8.0 log cél/g) fueron similares para los observados mediante cultivo anaeróbico.

La ingestión de La1 resultó en la alteración de las concentraciones de algunas poblaciones bacterianas evaluadas en este estudio. Se observó una disminución significativa en los niveles del cluster de *F. prausnitzii* (Friedman ANOVA: $\chi^2=20.1$, $p=0.005$) a los días 21 del periodo de ingestión y al día 7 del periodo post-ingestión,

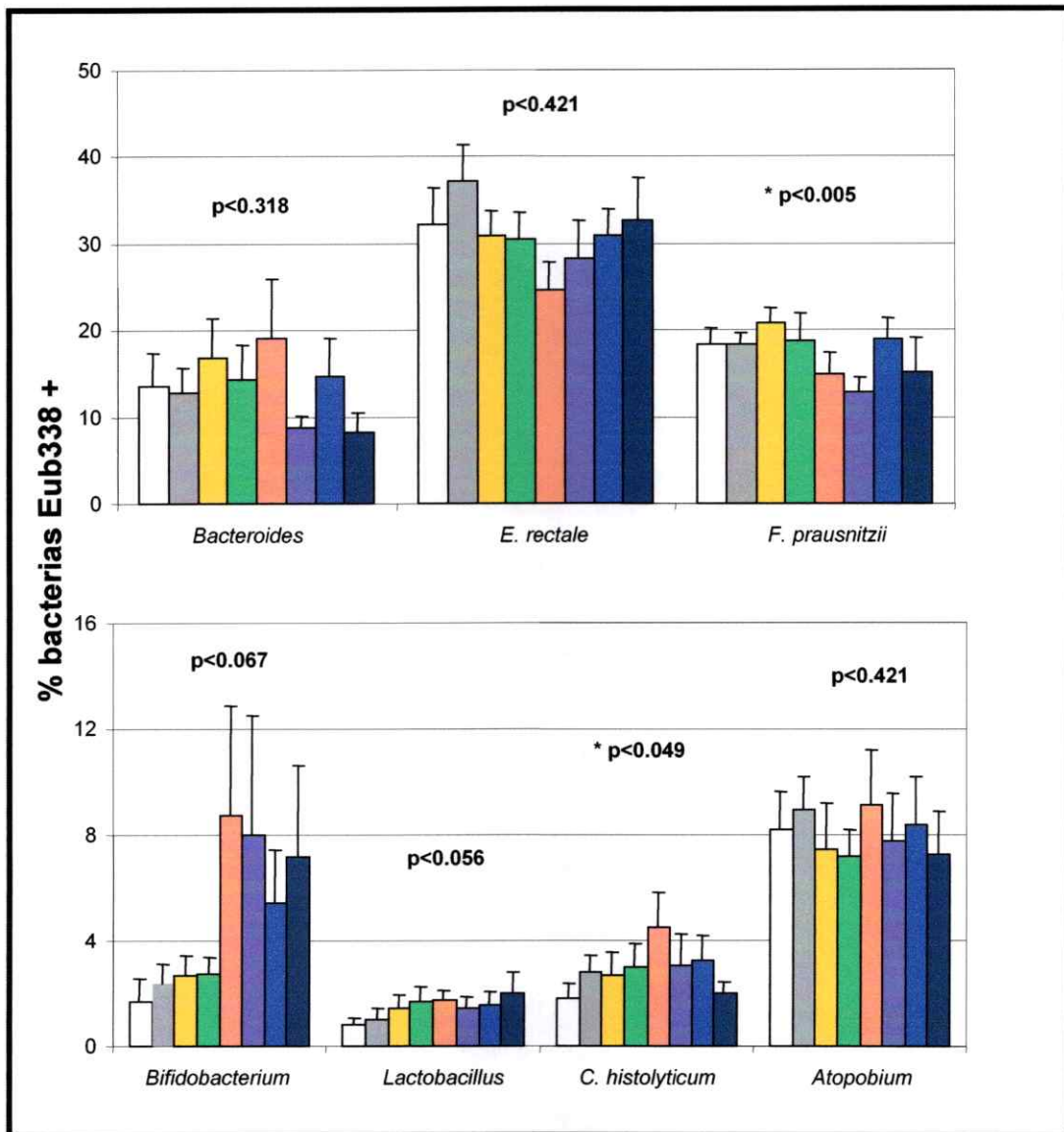


Figura 5: Cambios en los porcentajes (promedio \pm SEM) de las principales poblaciones de la microbiota intestinal en respuesta a la ingestión de La1, medidos por FISH y Citometría de Flujo, durante el periodo basal en los días -5 (\square) y 0 (\blacksquare), durante el periodo de ingestión a los días 7 (\blacksquare), 14 (\square) y 21 (\blacksquare), y durante el periodo post-ingestión en los días 7 (\blacksquare), 14 (\blacksquare) y 49 (\blacksquare). A: Poblaciones de *Bacteroides/Prevotella* (Bac303), cluster de *E. rectale/C. coccoides* (Erec482), y el cluster de *F. prausnitzii* (Fprau645). B: Poblaciones de *Bifidobacterium* (Bif164), *Lactobacillus/Enterococcus* (Lab158), cluster de *C. histolyticum* (Chis150), y cluster de *Atopobium* (Ato291).

comparado con el nivel basal ($14.9 \pm 2.4\%$, $p=0.049$ y $12.7 \pm 1.8\%$, $p=0.036$, respectivamente). Posteriormente los niveles de este cluster volvieron a su nivel basal. No se registraron cambios significativos en las poblaciones de *Bacteroides/Prevotella*, ni en el cluster de *E. rectale/C. coccoides* (Friedman ANOVA: $\chi^2=8.17$, $p=0.32$ y $\chi^2=7.08$, $p=0.42$, respectivamente).¹

Como se muestra en la figura 5B, la ingestión de La1 produjo un aumento significativo en los niveles del cluster de *C. histolyticum* (Friedman ANOVA: $\chi^2=14.2$, $p=0.049$). Una tendencia similar se observó con las poblaciones de *Bifidobacterium* y las poblaciones de *Lactobacillus/Enterococcus* (Friedman ANOVA: $\chi^2=13.2$, $p=0.067$ y $\chi^2=13.7$, $p=0.056$, respectivamente), mientras que no se registraron cambios en los niveles del cluster de *Atopobium* (Friedman ANOVA: $\chi^2=7.08$, $p=0.42$).

4. Evaluación de los cambios en la microbiota intestinal por PCR-TTGE

Los perfiles obtenidos por TTGE usando partidores universales para las muestras fecales de cada individuo en el periodo basal, al final del periodo de ingestión de cinco unidades del producto y dos semanas después de haber terminado la ingestión se muestran en la Figura 6. La técnica fue capaz de detectar un gran número de poblaciones distintas o especies moleculares, por cada individuo, las que corresponden al componente predominante de la microbiota intestinal (Walter y col, 2001).

También se observó que la composición de la microbiota encontrada por TTGE es única para cada individuo, de acuerdo al perfil de bandas obtenido. Sin embargo, algunas bandas fueron comunes en uno o más sujetos.

La ingestión de La1 modificó parcialmente el perfil de bandas obtenido para cada voluntario, lo cual se tradujo en la aparición y/o desaparición de algunas bandas, así como también en cambios en la intensidad de algunas (Figuras 6A y 6B). Sin embargo, estos cambios fueron menores, y en general el perfil de bandas fue muy similar en las tres muestras analizadas, lo que revela la gran estabilidad de la microbiota intestinal. Dado que ninguna de las bandas pudo ser secuenciada, no se pudo comparar los efectos de la ingestión de La1 sobre ciertas poblaciones evaluadas por FISH, con los cambios observados por TTGE en la microbiota intestinal.

La evaluación por PCR-TTGE fue realizada en las mismas muestras usando también partidores específicos para *Lactobacillus* y géneros relacionados. El uso de estos partidores específicos permitió la detección de un género que es subdominante

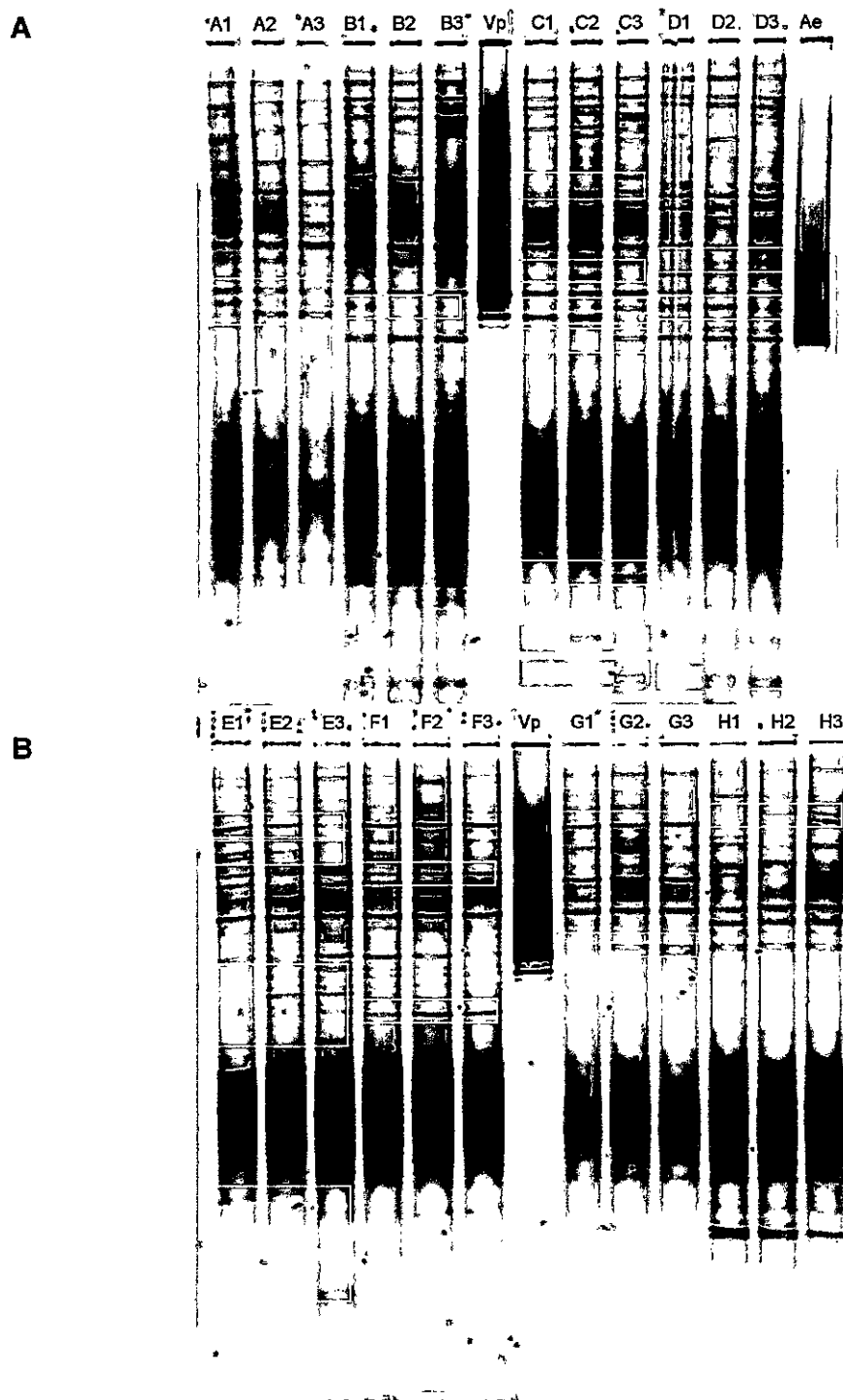


Figura 6: PCR-TTGE con partidores universales para el dominio Eubacteria de las poblaciones fecales en el periodo basal (1), durante la ingestión de 500 ml diarios (2), y dos semanas del periodo postingestión (3), para los ocho voluntarios enrolados en el estudio. A: Voluntarios A al D; B: Voluntarios E al H. Se incluyen también los controles de migración de *V. parahemoliticum* (Vp), y *Aeromonas sp.* (Ae). Se encuadran en plomo algunas diferencias entre los perfiles de cada voluntario.

en la microbiota intestinal, y que no es detectable mediante el uso de partidores universales (Walter y col, 2001). En esta evaluación se detectaron varias poblaciones de *Lactobacillus* en todos los voluntarios, las cuales en número variaron entre una y seis en el periodo basal (Figuras 7A y 7B). Así como en el análisis por TTGE usando partidores universales, algunas poblaciones de *Lactobacillus* fueron comunes en algunos voluntarios.

El uso de un amplicón de La1 como control positivo en la TTGE evidenció la ausencia del probiótico en el periodo basal en todos los voluntarios. La aparición de una banda con la misma migración relativa que La1 se observó en el periodo de ingestión en siete de los ocho voluntarios, confirmando lo encontrado en el cultivo anaeróbico. Dicha banda se detectó también en el mismo voluntario que presentaba niveles detectables de La1 por cultivo dos semanas después de haber terminado la ingestión del producto (Figuras 7A y 7B).

El perfil de bandas obtenido para cada voluntario con los partidores específicos para *Lactobacillus* fue analizado mediante los índices de Simpson (D), Shannon (H'), y los valores de equitatividad E correspondientes, así como el índice de Sorenson (C), los cuales determinan la diversidad de especies en cada muestra. En este caso, estos índices fueron usados para evaluar el impacto de la ingestión de La1 sobre la biodiversidad de *Lactobacillus* en las muestras fecales de los voluntarios. El análisis estadístico de estos tres índices no reveló cambios estadísticamente significativos en la diversidad de especies de lactobacilli debida a la ingestión del probiótico (Tabla 3).

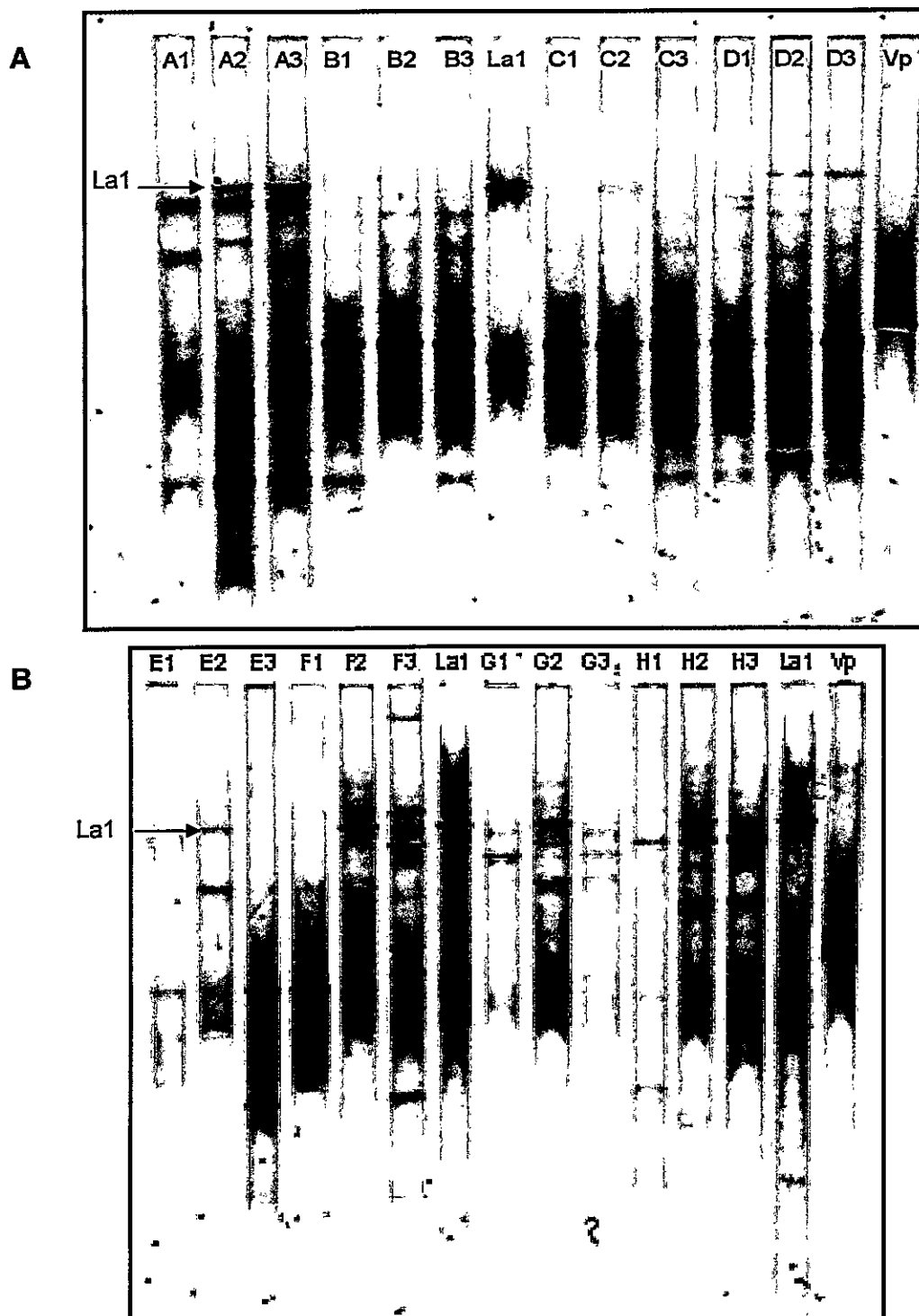


Figura 7: PCR-TTGE para *Lactobacillus* en la microbiota fecal usando partidores específicos, para las muestras correspondientes al periodo basal (1), durante la ingestión de 500 ml del producto (2), y dos semanas del periodo postingestión (3). A: Voluntarios A al D; B: Voluntarios E al H. Se incluyen también los controles de migración correspondientes a *V. parahemoliticum* (Vp), y *L. johnsonii* La1.

Tabla 3: Valores de diversidad (promedio \pm error estándar del promedio) para el género *Lactobacillus* en los periodos basal (día 0), ingestión de 500 ml diarios, y postingestión (día 14).

INDICE	FORMULA	Basal	500 ml	Post Ingestión	F	p
Simpson	$D = 1 / \sum (p_i)^2$ $E_D = D/S$	0.59 ± 0.07	0.58 ± 0.08	0.53 ± 0.09	0.38	0.69
Shannon	$H = -\sum (p_i * \ln p_i)$ $E_H = H/\ln S$	0.75 ± 0.04	0.80 ± 0.05	0.75 ± 0.05	0.75	0.49
Sorenson	$C = 2j / (a + b)$	0.51 ± 0.06 (M1-M2)	0.48 ± 0.03 (M1-M3)	0.47 ± 0.07 (M2-M3)	0.28	0.76

DISCUSION

1. Adhesión y persistencia

Uno de los principales criterios de selección de los probióticos es su capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal y persistir en niveles suficientes que aseguren sus efectos beneficiosos sobre la salud del huésped. Varios son los mecanismos involucrados en la sobrevivencia y adhesión de cepas probióticas, que han sido descritos principalmente para el género *Lactobacillus*, incluyendo a La1 (de Champs y col, 2003; Alander y col, 1999; Granato y col, 2004; Roos & Johnson, 2002). Sin embargo, no existen actualmente estudios que hayan mostrado que La1 puede adherirse *in vivo* a la mucosa colónica.

En este estudio, mediante métodos de cultivo se confirmó la sobrevivencia de La1 en el tracto GI. Antes de la ingestión del producto, ninguno de los voluntarios poseía niveles detectables de La1, lo cual fue demostrado por cultivo anaeróbico y ERIC-PCR, así también como por PCR-TTGE. Sin embargo, el probiótico pudo ser detectado en las muestras fecales de los ocho voluntarios y en una concentración promedio superior a 10^6 CFU/g dep. durante el periodo de ingestión de cinco unidades del producto. Una vez terminada la ingestión del probiótico, La1 fue eliminado del tracto GI por peristaltismo, siguiendo la cinética de eliminación del marcador de tránsito intestinal.

Este mecanismo de eliminación del tracto GI es común a todas las cepas probióticas estudiadas. Esto indica que a pesar de sus propiedades de adhesión, estos microorganismos son gradualmente eliminados del colon y no permanecen en el tubo digestivo si no existe una ingestión continua que asegure la presencia y actividad del probiótico en el tracto gastrointestinal. Esto se relaciona con el concepto de

colonización transitoria donde las bacterias probióticas, si bien son capaces de atravesar el tracto GI, son eliminadas progresivamente cuando termina su aporte y no pueden colonizarlo permanentemente (Vesa y col, 2000).

Estos hechos confirman que un probiótico como La1, aunque posee un origen humano, actúa en la mayoría de las personas como un microorganismo alóctono que transita a lo largo del tracto gastrointestinal del huésped pero sin colonizarlo, debido a la eficiente función de barrera ejercida, entre otros, por la microbiota autóctona.

2. Técnicas moleculares aplicadas al estudio del tracto GI y de bacterias ácido lácticas

La presencia del género *Lactobacillus* en muestras fecales o intestinales ha sido tradicionalmente evaluada mediante medios de cultivo selectivos. Sin embargo, los recuentos microbiológicos de células vivas cultivables pueden diferir significativamente de las determinaciones moleculares basadas en ácidos nucleicos, debido al DNA proveniente de células muertas o de células vivas que se encuentran en un estado incultivable (Vaughan y col, 2005; Walter y col, 2001). En general las bacterias ácido-lácticas en el tracto GI son difíciles de detectar mediante técnicas moleculares debido a que estas bacterias constituyen sólo una parte menor de la microbiota intestinal. Sin embargo, la sensibilidad de la Hibridación Fluorescente *In situ* debida a la gran amplificación de la señal proveniente del gran número de moléculas de rRNA 16S en las células permite la detección de bacterias ácido-lácticas tanto en productos fermentados como en la microbiota intestinal. Por otro lado en la TTGE, el uso de partidores género-específicos para *Lactobacillus* y géneros relacionados baja el límite de detección de este género en la reacción de PCR permitiendo la detección de especies que se encuentran en un nivel superior a 10^6 CFU/g de deposición, con una cantidad de DNA bacteriano total equivalente a 10^{11} CFU/g de deposición.

Es importante también destacar en este punto los fundamentos en los que se basan estas técnicas y su limitación. Si bien la TTGE es un método muy sensible en la identificación de distintas especies moleculares, varios sesgos pueden aparecer durante el proceso de extracción de DNA así como durante la posterior etapa de amplificación por PCR. Por ejemplo diferencias en la composición de las paredes celulares de los distintos miembros de la microbiota intestinal pueden favorecer la extracción de DNA y la amplificación preferencial de ciertas especies; por otro lado,

distintos sets de partidores universales o género-específicos pueden producir diferencias en las estimaciones de diversidad. Además, el hecho que estas técnicas estén basadas en el rRNA 16S puede permitir la sobreestimación de una especie, o también que especies o tal vez géneros relacionados compartan la misma migración relativa (Forney y col, 2004). Es interesante considerar que los estudios basados en el rDNA 16S sólo pueden ofrecer un cuadro filogenético de la comunidad en cuestión. Por otro lado, el análisis mediante extracción de RNA, que corresponde principalmente a RNA ribosomal, permite estimar la actividad metabólica ya que la relación ribosoma/célula es proporcional a la tasa de crecimiento (Tannock y col, 2004; Tannock, 2005).

En el caso de la FISH, se debe considerar como factor importante de variabilidad la permeabilidad de la pared celular de los distintos géneros debido a diferencias en su composición. Es importante considerar que en este estudio, con el panel de sondas usadas se cubrió sobre el 80% del total de bacterias detectadas con la sonda universal EUB338. Sin embargo, esta sonda es capaz de detectar sólo alrededor del 90% del total de bacterias en muestras intestinales. Pese a estas limitaciones, ambas técnicas han sido utilizadas exitosamente en estudios de la microbiota intestinal.

3. Presencia del género *Lactobacillus* en el tracto GI

Varios reportes aluden a la inestabilidad del género *Lactobacillus* en la microbiota intestinal (Tannock y col, 2000). Esto se traduce en la aparición y desaparición de especies dentro del perfil de especies en un mismo individuo, además del hecho de que en algunos sujetos los recuentos fluctúan entre 10^4 y 10^9 CFU/g dep. De la misma forma, en varios sujetos este género no es detectado. Sin embargo en el presente estudio se encontró que el 100% de los voluntarios poseían niveles detectables de *Lactobacillus* superando las 10^8 CFU/g dep, de acuerdo a lo observado por cultivo en MRS. Valores similares fueron encontrados por FISH y citometría de flujo y además, la presencia de este género se hizo patente en el análisis por TTGE donde cada uno de los voluntarios poseía a lo menos una especie del género en el periodo basal. Es posible que esta población relativamente importante de lactobacilli autóctonos actúe como un fuerte competidor frente a La1 y que esto puede explicar porqué los niveles de La1 no fueron mayores que 10^7 CFU/g de deposición, considerando un consumo diario de 5×10^{10} CFU diarios de La1.

Los valores de *Lactobacillus* encontrados fueron relativamente estables en cada una de las muestras analizadas, lo cual se aleja de lo observado por otros estudios (Tannock y col, 2000), lo que puede sugerir la existencia de factores individuales, raciales y/o dietarios asociados a la composición de la población de *Lactobacillus*. Pese a que no se determinó la identidad de las especies de lactobacilli encontradas en el recuento microbiológico ni en la TTGE, el hecho de que la ingestión de La1 no altere significativamente la diversidad de especies encontradas en la TTGE confirma que esta población es estable. La ingestión de La1 entonces puede incrementar los niveles de *Lactobacillus* sin modificar la diversidad de especies.

4. Modulación de la microbiota intestinal

La modulación de la microbiota intestinal es un punto básico en el concepto de probiótico. El efecto de los probióticos en este sentido se relaciona en general con una reducción del número de coliformes y clostridiales, y un aumento correlativo de los números de lactobacilli y bifidobacteria debido al aporte de bacterias exógenas (Ouwehand y col, 2002). Los probióticos que sobreviven el tránsito gastrointestinal probablemente producen un incremento en los niveles fecales de su género en particular, especialmente cuando los niveles iniciales son bajos. Debido a la competencia por sitios de adhesión y nutrientes, y en algunos casos a la producción de sustancias antimicrobianas, los niveles de ciertos géneros pueden disminuir. Un incremento concomitante en los niveles fecales de géneros distintos al probiótico consumido también se ha observado en ciertos casos. Por ejemplo, se ha mostrado que el consumo de *L. rhamnosus* GG se asocia con un incremento en los niveles fecales de bifidobacteria (Benno y col, 1996); también se ha reportado un aumento en los niveles de *Enterococcus* concomitante con la ingestión de *L. salivarius* UCC118 (Mattila-Sandholm y col, 1999), así como la ingestión de *L. rhamnosus* DR20 se asocia con un aumento en la frecuencia de detección de *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Tannock y col, 2000). Sin embargo, se observa que las alteraciones en la microbiota intestinal producidas por la ingestión de probióticos durante el periodo de administración son sólo transitorias. Además, se cree que el efecto de esta administración sea más notorio en el intestino delgado, donde pocos géneros pueden establecerse y se favorece el desarrollo de microorganismos microaerofílicos como *Lactobacillus*.

Aunque La1 es un probiótico cuyos efectos beneficiosos sobre la salud han sido bien descritos, es escasa la información acerca de sus efectos sobre la microbiota intestinal. Los resultados del presente estudio mostraron que la ingestión regular de un producto que contiene La1 afecta algunas poblaciones bacterianas intestinales. Las poblaciones de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y el cluster de *Clostridium histolyticum* aumentaron sus niveles significativamente, medidos como porcentaje del total de bacterias detectadas por la sonda universal Eub338, mientras que el cluster de *F. prausnitzii* disminuyó sus niveles. Los géneros de *Bacteroides*, *Atopobium* y *E. rectale* no fueron afectados por la ingestión de La1. Después de terminar el periodo de administración del producto, la eliminación gradual de La1 del lumen intestinal fue acompañada también de una recuperación de los niveles basales de las poblaciones intestinales afectadas.

Tal efecto modulador es probablemente debido a la capacidad de La1 de sobrevivir el tránsito a lo largo del tracto gastrointestinal y a su presencia en el lumen o mucosa intestinal a concentraciones que le permiten ejercer actividades que afectan directa o indirectamente el ecosistema intestinal, interactuando probablemente con la mucosa intestinal, con el sistema inmunológico subyacente, y con las distintas poblaciones de la microbiota (Haller y col, 2000; Bernet-Camard y col, 1997; Kalliomaki & Isolauri, 2003; Cruchet y col, 2003).

El incremento en los niveles del cluster de *C. histolyticum*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* puede ser favorecido, entre otros factores, por el descenso de los niveles de poblaciones dominantes como *F. prausnitzii* así como también otras especies o géneros no detectados por las sondas usadas en este estudio. En otros estudios se ha observado que la ingestión de probióticos conlleva un aumento significativo en los niveles de este género; sin embargo, en este estudio el aumento de los niveles de

Lactobacillus no puede relacionarse directamente a la ingestión de La1, dado que en el periodo de ingestión de cinco unidades del producto que contiene La1 esta cepa sólo constituyó el 0.63% del total de *Lactobacillus*. Esto sugiere la existencia de otros mecanismos, como por ejemplo la liberación de sustancias que favorezcan el crecimiento de otras cepas de lactobacilli.

El incremento en los niveles de *Bifidobacterium* durante los periodos de ingestión y post-ingestión es interesante y confirma recientes observaciones llevadas a cabo hechas en un estudio en niños que recibieron una fórmula láctea suplementada con La1 por siete semanas (Brunser et al., 2005). En estos niños, la ingestión de La1 produce un aumento en la población de *Bifidobacterium* desde menos de un 5% del total de bacterias a sobre un 20% después de siete semanas; sin embargo, esto no se asoció con cambios en las poblaciones de *Clostridium*, *Bacteroides* o *Enterococcus*. En relación con estos hechos, es interesante notar que la reciente descripción del genoma de La1 (Pridmore y col, 2004) indica que este microorganismo posee las vías metabólicas necesarias para sintetizar y liberar moléculas de fructanos al lumen intestinal. Tales moléculas son conocidas como prebióticos (Gibson, 1999; Manning y col, 2004), es decir carbohidratos no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad metabólica de las poblaciones endógenas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el colon, tal como fue observado en este estudio. Es probable que esta propiedad "prebiótica" no sea general a todas las especies de *Lactobacillus*, ya que, por ejemplo la ingestión regular de *L. rhamnosus* DR20, no se asoció con cambios en las concentraciones fecales de bifidobacteria en humanos (Tannock y col, 2000); estos autores no observan alteraciones de las poblaciones de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium* o *Atopobium* asociadas con la ingestión de DR20. Esto puede sugerir que

cada probiótico posee propiedades o actividades específicas que influyen su relación con otras poblaciones autóctonas presentes en el ecosistema intestinal.

Se observó que la ingestión de La1 produce un descenso significativo del cluster de *F. prausnitzii*. La regulación de los niveles de *Faecalibacterium prausnitzii* puede ser interesante para la salud del huésped ya que por ejemplo, se ha observado que especies de *Fusobacterium* aisladas de pacientes con colitis ulcerativa son capaces de inducir colitis cuando son administradas a ratas, implicando estos microorganismos como un posible factor etiológico de enfermedades inflamatorias crónicas del tubo digestivo (IBD) (Ohkusa y col, 2003). El género *Eubacterium* también ha sido relacionado con las IBD pero en este estudio no se observó ningún efecto significativo de La1 sobre la población del cluster de *E. rectale*, quizás debido a la alta variabilidad encontrada en los niveles basales de este género en los voluntarios.

CONCLUSION

Este estudio muestra que el consumo de un producto lácteo que contiene La1 modula la microbiota intestinal en voluntarios sanos, incrementando los niveles de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *C. Histolyticum*, y a la vez disminuyendo los niveles de *F. prausnitzii*. El aumento de los niveles de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como la disminución de los niveles de *F. prausnitzii*, se relacionan directamente con un estado de homeostasis de la microbiota intestinal.

Técnicas como la Hibridación Fluorescente In Situ y la Electroforesis en Gradiente de Temperatura aportaron una amplia y clara descripción de la composición de la microbiota intestinal, permitiendo en el primer caso obtener una estimación de la abundancia de distintas poblaciones pertenecientes a esta microbiota, y en el segundo un perfil completo y específico que permite además analizar las variaciones en la microbiota intestinal. El uso de partidores género-específicos permitió la identificación de especies que se encuentran sub-representadas en la microbiota por TTGE. Además, el uso de sondas oligonucleotídicas permitió detectar sobre el 80% del total de bacterias reconocidas por la sonda universal Eub338.

Los resultados confirman también que La1 no coloniza permanentemente el tracto gastrointestinal del huésped, si no que es eliminado por peristaltismo cuando su ingestión cesa, resultando también en una recuperación de los niveles basales de las poblaciones bacterianas afectadas.

Estas observaciones sugieren que la regulación de la homeostasis intestinal puede ser un factor importante dentro de los efectos beneficiosos de La1 sobre la salud del consumidor.

BIBLIOGRAFIA

- Abee, T., Klaenhammer, T.R., Letellier, L. 1994. Kinetic studies of the action of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1006-1013.
- Adlerberth, I., Carlsson, B., de Man, P., Jalil, F., Khan, S.R., Larsson, P., Mellander, L., Svanborg, C., Wold, A.E., Hanson, L.A. 1991. Intestinal colonization with *Enterobacteriaceae* in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta Paediatr. Scand.* **80**: 602-10.
- Adlerberth, I., Cerquetti, M., Poilane, I., Wold, A., Collignon, A. 2000. Mechanisms of colonisation and colonization resistance of the digestive tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* **11**: 223-239.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., von Wright, A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 351-354.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* **307**: 1915-1919.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I. 2004. The gut microbiota as an Environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:15718-15723.
- Benno, Y., He, F., Fosoda, M., Hashimoto, H., Kojima, T., Yamakazi, K., Iino, K., Mykkanen, H., Salminen, S. 1996. Effects of *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. *Nutrition today.* **31**: 9S-11S
- Bernet-Camard, M.F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L., Hudault, S. 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain La1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2747-2753.
- Bounnik, Y., Pochart, P., Marteau, P., Arlet, G., Goderel, I., Rambaud, J.C. 1992. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. *Gastroenterology.* **102**: 875-878.
- Brunser, O., Figueroa, G., Gotteland, M., Haschke-Becher, E., Magliola, C., Cruchet, S., Gibson, G.R., Palframan, R., Rochat, F., Chauffard, F., Haschke, F. Effect of probiotic or prebiotic supplemented milk formulae on fecal microflora composition in infants. *En Prensa en Asia Pac. J. Clin. Nutr.*
- Brunser, O., Gotteland, M., Cruchet, S., Garrido, D., Figueroa, G. Effect of an infant formula with prebiotics on the intestinal microbiota after an antibiotic treatment. *En prensa en Pediatr. Res.*

- Cebra, J.J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Amer. J. Clin. Nutrition.* **69**: 1046-1051.
- Cruchet, S., Obregon, M.C., Salazar, G., Diaz, E., Gotteland, M. 2003. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition.* **19**: 716-721.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *System. Appl. Microbiol.* **22**: 434-444.
- de Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2180-2187.
- de Champs, C., Maroncle, N., Balestrino, D., Rich, C., Forestier, C. 2003. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1270-1273.
- Diversity indices: Simpson
<http://www.tiem.utk.edu/~gross/bioed/bealsmodules/simpsonDI.html>
- Diversity indices: Shannon
<http://www.tiem.utk.edu/~gross/bioed/bealsmodules/shannonDI.html>
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* **308**:1635-1638.
- Elkins, C.A., Moser, S.A., Savage, D.C. 2001. Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. *Microbiology.* **147**: 3403-12.
- Favier, C.F, Vaughan, E.E, de Vos, W.M., Akkermans, AD. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 219-226.
- Forney, L., Zhou, X., Brown, C. 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 210-220.
- Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F., Welling, G.W. 1998. Variations of bacterial populations in human faeces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3336-3345.
- Fujisawa, T., Benno Y., Yaeshima, T., Mitsuoka, T. 1992. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* Group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *Int. J. Systematic Bacteriology.* **42**: 487-491.
- Gibson, G.R. 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutr.* **129(S)**: 1438S-41S.
- Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., Moletta, R. 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2802-2813.

- Gotteland, M. 1999. Probióticos, microorganismos de la dieta al servicio de la salud. *Rev. Chil. Nutr.* **26**: 45-52.
- Gotteland, M., Cruchet, S. 2003. Suppressive effect of frequent ingestion of *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in asymptomatic volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 1317-1319.
- Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M., Corthésy-Theulaz, I.E. 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human intestinal cells and mucins. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2160-2169.
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., Brassart, D. 1999. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1071-1077.
- Gronlund, M.M., Arvilommi, H., Kero, P., Lehtonen, O.P., Isolauri, E. 2000. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* **83**: F186-F192.
- Haller, D., Blum, S., Bode, C., Hammes, W.P., Schiffrin, E.J. 2000. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. *Infect. Immun.* **68**: 752-759.
- Harmsen, H.J., Raangs, G.C., He, T., Degener, J.E., Welling, G.W. 2002. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2982-2990.
- Harmsen, H.J., Wildeboer-Veloo, A.C., Grijpstra, J., Knol, J., Degener, J.E., Welling, G.W. 2000. Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their Application for enumeration of *Coriobacteriaceae* in human feces from volunteers of different age groups. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4523-4527.
- Harmsen, H.J., Elfferich, P., Schut, F., Welling, G. 1999. A 16S rRNA-targeted probe for detection of *Lactobacilli* and *Enterococci* in faecal samples by fluorescent in situ hybridization. *Microb. Ecol. Health Dis.* **11**: 3-12.
- Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient Environment of mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* **22**: 283-307.
- Isolauri, E., Salminen, S. 2005. Probiotics, gut inflammation and barrier function. *Gastroenterol Clin North Am.* **34**: 437-50.
- Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **18**: 299-313.
- Jersek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N., Herman, L. 1999. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 103-9.
- Kalliomaki, M., Isolauri, E. 2003. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **3**: 15-20.
- Kimura, K., McCartney, A.L., McConnell, M.A., Tannock, G.W. 1997. Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3394-3398.

- Kirjavainen, P.V., Arvala, T., Salminen, S.J., Isolauri, E. 2002. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut*. **51**: 51-55.
- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 393-409.
- Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H., Welling, G.W. 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its Application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3069-3075.
- Lapiere, L., Germond, J.E., Ott, A., Delley, M., Mollet, B. 1999. D-Lactate dehydrogenase gene (*ldhD*) inactivation and resulting metabolic effects in the *Lactobacillus johnsonii* strains La1 and N312. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4002-4007.
- Leclerc, H., Moriamez, J. 1980. Etude quantitative de la flore fecal de l'adulte et du nourrisson alimenté artificiellement. *Pathol. Biol.* **28**: 217-226.
- Man, A.L., Prieto-Garcia, M.E., Nicoletti, C. 2004. Improving M cells mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys?. *Immunology*. **113**: 15-22
- Manning, T.S, Gibson, G.W. 2004. Prebiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**: 287-298.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K.H. 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural Environment. *Microbiology*. **142**: 1097-1106.
- Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Doré, J., Pochart, P., Seksik, P. 2004. Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **20**:18-23.
- Marteau, P., Pochart, P., Doré, J., Béra-Maillet, C., Bernalier, A., Corthier, G. 2001. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4939-4942.
- Mattila-Sandholm, T., Blum, S., Collins, J.K., Crittender, R., de Vos, W., Dunne, C., Fonden, R., Grenov, G., Isolauri, E., Kiely, B., Marteau, P., Morelli, L., Ouwehand, A., Reniero, R., Suareala, M., Salminen, S., Saxelin, M., Schiffrin, E., Shanahan, F., Vaughan, E., von Wright, A. 1999. Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food Sci. Technol.* **10**: 393-399.
- McBain, A.J., Macfarlane, G.T. 1998. Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J. Med. Microbiol.* **47**: 407-16.
- McCartney, A.L., Wenzhi, W., Tannock, G.W. 1996. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and *Lactobacillus* microflora of humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2160-2169.
- Mercenier, A., Pavan, S., Pot, B. 2002. Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects. *Curr Pharmaceutical Design.* **8**: 99-110.
- Metchnikoff, E. 1907. The prolongation of life. Optimistic studies. William Heinemann, London, United Kingdom.

- Moore, W.E., Cato, E.P., Holdeman, L.V. 1978. Some current concepts in intestinal bacteriology. *Am. J. Clin. Nutr.* **31**: S33-42.
- Moreau, M.C. 2000. Flore intestinale, prébiotique et effets sur la reponses immunitaire intestinale á IgA. *Arch. Pédiatrie* **7**: 247-248.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3691-3701.
- Ohkusa, T., Okayasu, I., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M., Sato, S. 2003. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut.* **52**: 79-83.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**: 279-289.
- Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., Salminen, S.J. 1999. Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiol. Lett.* **172**: 61-4.
- Pridmore, R.D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A.C., Zwahlen, M.C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., Mollet, B., Mercenier, A., Klaenhammer, T., Arigoni, F., Schell, M.A. 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 2512-2517.
- Reid, G., Sanders, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C., Klaenhammer, T.R. 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* **37**:105-118.
- Rigottier-Gois, L., Le Bourhis, A., Gramet, G., Rochet, V., Doré, J. 2003. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**: 237-245.
- Rochet, V., Rigottier-Gois, L., Béguet, F., Doré, J. 2001. Composition of human intestinal flora analysed by fluorescent in situ hybridization using group-specific 16S rRNA targeted oligonucleotidic probes. *Genet. Sel. Evol.* **33(S1)**: S339-S352.
- Roos, S., Johnson, H. 2002. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology.* **148(Pt2)**: 433-432.
- Saunier, K., Doré, J. 2002. Gastrointestinal tract and the elderly: functional foods, gut microflora and healthy ageing. *Dig. Liver Dis.* **34(S2)**: S19-24.
- Simon, G., Gorbach, S. 1984. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology.* **86**: 174-193.
- Simpson, J., McCracken, V., White, B., Gaskins, H., Mackie, R. 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J. Microbiol. Methods.* **36**: 167-179.
- Solcia, E., Usellini, L., Buffa, R., Rindi, G., Villani, L., Zampatti, C., Silini, E. 1987. Endocrine cells producing regulatory peptides. *Experientia.* **43**: 839-580.
- Sonnenburg, J., Angenent, L., Gordon, J. 2004. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nature Immun.* **3**: 569-573.
- Stappenbeck, T., Hooper, L., Gordon, J. 2002. Development regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Nat. Ac. Soc.* **99**: 15451-15455.

- Suau, A., Rochet, V., Sghir, A., Gramet, G., Brewaeys, S., Sutren, M., Rigottier-Gois, L., Dore, J. 2001. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**: 139-145.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Doré, J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **11**: 4799-807.
- Sullivan, A., Edlund, C., Nord C. 2001. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect. Dis.* **1**: 101-114.
- Tannock, G.W. 2005. New perceptions of the gut microbiota: implications for future research. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* **34**: 361-382.
- Tannock, G.W., Munro, K., Bibiloni, R., Simon, M.A., Hargreaves, P., Gopal, P., Harmsen, H., Welling, G. 2004. Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2129-2136.
- Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J., Welling, G.W., Smart, J., Gopal, P.K. 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2578-2588.
- Taupin, D., Podolsky, D.K. 2003. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 721-732.
- Vandenbroucke, K., Hans, W., Van Huysse, J., Neiryneck, S., Demetter, P., Remaut, E., Rottiers, P., Steidler, L. 2004. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology.* **127**: 502-513.
- Vaughan, E.E., Heilig, H.G., Ben-Amor, K., de Vos, W.M. 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 477-490.
- Ventura, M., Canchaya, C., Pridmore, D., Berger, B., Brussow, H. 2003. Integration and distribution of *Lactobacillus johnsonii* prophages. *J. Bacteriol.* **185**: 4603-4608.
- Ventura, M., Meylan, V., Zink, R. 2003. Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4296-301.
- Ventura, M., Zink, R. 2002. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **217**: 141-154.
- Vesa, T., Pochart, P., Marteau, P. 2000. Pharmacokinetics of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826, *Lactobacillus fermentum* KLD and *Lactococcus lactis* MG1363 in the human gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **14**: 823-828.
- Vidal, K., Donnet-Hughes, A., Granato, D. 2002. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus johnsonii* strain La1 and *Lactobacillus acidophilus* strain La10 antagonize the responsiveness of human intestinal epithelial HT29 cells to lipopolysaccharide and gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* **70**: 2057-2064.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W. 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry.* **14**: 136-143.

- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G., Lis, C., Munro, K., Hammes, W. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weisella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2578-2595.
- Wei, G., Pan, L., Du, H., Chen, J., Zhao, L. 2004. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts. *J. Microbiol. Methods.* 2004. **59**: 91-108.
- Zoetendal, E., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A., de Vos, W. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3401-3407.

ANEXO

Modulation of the fecal microbiota by the intake of a *Lactobacillus johnsonii* La1-containing product in human volunteers

Daniel Garrido ^a, Antonia Suau ^b, Philippe Pochart ^b,
Sylvia Cruchet ^a, Martin Gotteland ^{a,*}

^a Laboratory of Microbiology, Institute of Nutrition and Food Technology (INTA), University of Chile, J.P. Alessandri 5540, Macul, Santiago, Chile

^b Laboratoire de Biologie EA3199 Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM), Paris, France

Received 11 April 2005; received in revised form 24 May 2005; accepted 27 May 2005

First published online 13 June 2005

Edited by E. Ricca

Abstract

Lactobacillus johnsonii La1 (La1) is a probiotic strain capable of stimulating the immune system of the host and interfering with gastrointestinal pathogens. This study evaluates how the ingestion of different amounts of La1 influences the main bacterial populations of the fecal microbiota. Eight asymptomatic volunteers participated in the study. After a basal period, they ingested daily 100 mL of a product containing 10^8 CFU mL⁻¹ of La1 during the first week, 200 mL during the second week and 500 mL during the third week. Fecal samples were obtained at the end of each period and subsequently during 7 weeks. Lactobacilli were determined by culture on MRS agar and La1 colonies were confirmed by ERIC-PCR. The main populations of fecal bacteria were identified by FISH and flow cytometry. At baseline, 37.7% of the total fluorescent bacteria were *Eubacterium rectale*, 18.3% *Fusobacterium prausnitzii*, 13.2% *Bacteroides*, 8.6% *Atopobium*, 2.30%, *Clostridium histolyticum*, 2.05% *Bifidobacterium* and 0.95% *Lactobacillus*. Fecal excretion of La1 increased during the intake period and decreased during the post-ingestion period, so that no La1 was observed in the stools of the volunteers seven weeks after the intake product has been finished. La1 intake increased the populations of *C. histolyticum* ($p = 0.049$), *Lactobacillus* ($p = 0.056$) and *Bifidobacterium* ($p = 0.067$), and decreased those of *F. prausnitzii* ($p = 0.005$) while it did not affect *Bacteroides*, *E. rectale* and *Atopobium* populations. These bacterial populations returned to their baseline levels during the post-ingestion period. The regular intake of a La1-containing product beneficially affects the homeostasis of the human fecal microbiota, probably contributing to the health-promoting effects of this probiotic.

© 2005 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Probiotics; *Lactobacillus johnsonii*; Intestinal microbiota; FISH

1. Introduction

Fermentation processes of food by lactic acid bacteria have been used since antiquity as a way to avoid pathogen contamination and increase food palatability

[1]. In the last decades it has been shown that lactic acid bacteria are associated with a wide range of health benefits for the consumer, including immune stimulation [2], defense against pathogens [3], and stabilization of the gastrointestinal barrier function [4]. In consequence, research focused on the development of probiotic strains of lactic acid bacteria and on the demonstration of their health-promoting effects is receiving considerable attention from the scientific and clinical communities [5].

* Corresponding author. Tel.: +56 2 6781468; fax: +56 2 2214030.
E-mail address: mgottela@inta.cl (M. Gotteland).

An important mechanism that may explain the health-promoting effects of probiotics is their capacity to modulate the intestinal microbiota and to maintain an equilibrium between the intestinal populations of beneficial and potentially harmful bacteria. Disruption of the homeostasis of the intestinal microbiota is observed in several disorders such as the inflammatory bowel diseases (IBD), allergies and rheumatoid arthritis, and probiotics have been proposed as an alternative approach for the dietary management of these pathologies [6–8]. However, although modulation of intestinal microbiota homeostasis constitutes a basic aspect of the probiotic concept, few studies have evaluated this property in humans. Tannock et al., for example, have shown that the administration of a milk product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20 to human volunteers resulted in a significant increase of *Lactobacillus* and *Enterococcus* species in feces, without affecting other bacterial populations such as *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium* or *Atopobium* [9].

Lactobacillus johnsonii La1 (La1) is another well described strain currently used for the elaboration of probiotic-containing products. Interestingly, the La1 genome has been recently published and its analysis indicates that it is well adapted to survive and compete in the human small intestine, where it is living in close symbiosis with the host [10]. La1 has been shown to stimulate the local and systemic immune systems in humans [2,11,12] and various studies indicate that it may also exert anti-bacterial activities against gastrointestinal pathogens [3,13,14]. For example, we have recently shown that regular ingestion of a dietary product containing La1 may interfere with *H. pylori* colonization in children [15], and that more frequent ingestion of the product throughout the day resulted in a more intense effect against this pathogen [16]. In the case of La1, it is not known whether this probiotic strain affects the commensal bacterial flora of human hosts.

In consequence, the aim of the present study was to evaluate in human volunteers how the administration of different amounts of a product containing La1 may affect the composition of the dominant fecal bacterial populations: *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Eubacterium rectale*, *Clostridium*, *Atopobium* and *Lactobacillus*, by using fluorescent in situ hybridization (FISH) and flow cytometry.

2. Subjects and methods

2.1. Subject recruitment

Eight asymptomatic volunteers, 4 men and 4 women (27.3 ± 7.6 years; range [19–40 years]) without previously diagnosed gastrointestinal pathologies or history of antibiotic, antacid, laxative or prokinetic drug treat-

ments, were recruited for the study. The protocol was approved by the Ethics Committee of INTA, and an informed consent form was signed by all the subjects who agreed to participate in the protocol. Volunteers were asked to avoid consumption of other commercial fermented dairy and probiotic products throughout the duration of the study. The product used was offered as a 100 mL bottle containing 14.7 g of carbohydrate, 0.9 g of protein and 0.03 g of lipids, and providing 63 kcal (Chamyto, Nestlé Chile SA, Santiago, Chile). La1 was present in the product at a concentration of 1×10^8 CFU mL⁻¹; in addition, a non-probiotic strain of *L. helveticus* was also present in the product at a concentration of 2×10^7 CFU mL⁻¹, as required for the elaboration of the product.

2.2. Protocol design

After a five-day baseline period, volunteers ingested one bottle (100 mL) of the product containing La1 daily during the first week, two bottles (200 mL) during the second week and five bottles (500 mL) during the third week. During the last period of La1 ingestion, simultaneously with the intake of every bottle of the product, volunteers had to ingest, 100 µL of a suspension of 7×10^7 CFU mL⁻¹ *Bacillus stearothermophilus* spores (Merck, Darmstadt, Germany) as marker of intestinal transit [17]. Fresh fecal samples were obtained on days 5 and 0 (i.e., before treatment), on days 7, 14, 17 and 21 of the treatment period and on days 3, 7, 13, 17, 20 and 49 post-ingestion. Fecal samples were collected in sterile flasks and stored under conditions of anaerobiosis (Anaerocult, Merck, Darmstadt, Germany) at 4 °C until processing in the laboratory, for no more than 4 h. Gastrointestinal symptomatology was recorded throughout the duration of the study.

2.3. Quantification of total *Lactobacillus* population, La1 and *B. stearothermophilus*

About one gram of feces was diluted 10-times in sterile PBS and homogenized by mixing with a vortex in presence of six glass beads. Gross particles were pelleted by 2-min centrifugation at 300g at 4 °C; afterwards, serial dilutions of the suspension were spread on Mann–Rogosa–Sharp (MRS) agar or on Plate Counting Agar (PCA) (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) for quantification of total lactobacilli and *B. stearothermophilus*, respectively. MRS plates were incubated for 48 h at 37 °C under anaerobic conditions, and the PCA plates were incubated for 24 h at 65 °C. Total lactobacilli were quantified by counting colony-forming units on the MRS plates corresponding to the last readable dilution. The colonies suspected to be La1 based on their morphological aspect were grown in MRS and stored in MRS-glycerol at –80 °C until the subsequent

confirmation of their identity through ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences-PCR) [18].

2.4. *LaI* confirmation by ERIC-PCR

Each stored colony was grown in MRS broth, spread on MRS agar for 48 h at 37 °C and a colony was suspended in 50 µL of Tris–EDTA and heated for 10 min at 95 °C. One microliter of this suspension containing the bacterial DNA was immediately added to a reaction mixture containing 2.5 U *Taq* Polymerase (Fermentas AB, Vilnius, Lithuania), 200 µM dNTPs, 3 mM MgCl₂ and 1 µM of the primers ERIC-I (5'-ATGTAAGCTC-CTGGGATTAC-3') and ERIC-II (5'-AAGTAA-GTGACTGGGGTGAGCG-3') in a final volume of 25 µL. Bacterial DNA was amplified by PCR using a M.J. Research (Waltham, MA, USA) thermocycler: the amplification program included an initial step of denaturation (10 min at 95 °C) followed by 40 cycles of denaturation (1 min at 95 °C), annealing (1 min at 48 °C) and extension (5 min at 72 °C), and a final step of extension (7 min at 72 °C). Amplified DNA products were separated by 2% agarose gel electrophoresis, stained with 0.5 ng mL⁻¹ ethidium bromide and visualized on a UV-transilluminator at 254 nm.

2.5. Fecal microbiota analysis by FISH and flow cytometry

FISH analysis was carried out as described by Rigottier-Gois et al. [19]. Eight fecal samples were obtained from each subject corresponding to days 5 and 0 before treatment, days 7, 14 and 21 of the treatment period, and days 7, 13 and 49 post-ingestion. The following probes were used to detect bacterial groups in the fecal samples (Table 1): Eub338 (total bacteria), Bac303 (*Bacteroides* and *Prevotella* sp.), Erec482 (*Eubacterium rectale*–*Clostridium coccooides* cluster), Lab158 (*Lactobacillus* and *Enterococcus* spp.), Ato291 (*Atopobium*, *Eggerthella*, and *Collinsella* spp.), Fprau645 (*Fusobacterium prausnitzii* cluster), Bif164 (*Bifidobacterium* spp.), Chis150 (*Clostridium*

histolyticum cluster). Oligonucleotidic probes were 5'-labelled with indodicarbocyanine (Cy5) or fluorescein isothiocyanate (FITC) and purified by HPLC (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). Two-hundred microliters of the fecal sample diluted and homogenized in PBS were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and stored at –80 °C until processing. The fixed samples were washed in TE buffer (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA), and permeabilized with lysozyme (1 mg mL⁻¹ in TE buffer) for 10 min. After centrifugation, the pellet was washed in PBS and resuspended in hybridization buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 8.0, 0.01% SDS, and 30% formamide). 50 µL of this suspension was mixed with 4 µL of the FITC-labeled EUB338 probe (50 ng µL⁻¹) and 4 µL of another, genus-specific, Cy5-labeled probe as described in Table 1. After a 16 h incubation at 35 °C in the dark, the bacteria were washed for 20 min at 37 °C with 200 µL of washing buffer (0.065 M NaCl, 20 mM Tris–HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, pH 8.0, and 0.01% SDS) and resuspended in 200 µL of sterile PBS. One mL of sterile PBS was added to 50 µL of the hybridized samples; 2 µL of a solution of microsphere standard beads 6 µm in diameter (Bacteria Counting Kit, Molecular Probes, Eugene, USA) at known concentrations and according to the manufacturer's instructions were added in the tube containing the Lac158 probe. These served as an internal standard to calibrate sample volumes and to determine absolute counts of *Lactobacillus/Enterococcus*, for comparison with MRS counts. Samples were analyzed by flow cytometry, using a FacsCalibur flow cytometer (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, USA). An air-cooled argon ion laser (488 nm) and a red diode laser (635 nm) were used for excitation, and the green and red signals of the bacteria and beads were collected in the FL1 (515–545 nm) and FL4 (653–669 nm) detectors, respectively. The acquisition threshold was set on forward scatter signals (FSC) and 100,000 fluorescent events were stored in list mode files. Subsequent analysis was performed by using WinMDI software (version 2.8; <http://facs.Scripps.edu/software.html>). Cell numbers corresponding

Table 1
Oligonucleotidic probes used in the FISH study

Probes	Sequences from 5' to 3'	OPD code	Refs.
Eub338	GCYGCCYCCCGTAGGAGT	S-D-Bact-0338-a-A-18	[20]
NonEub338	ACATCCTACGGGAGGC	NA	[21]
Bac303	CCAATGTGGGGACCTT	S*-Bacto-0303-a-A-17	[22]
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	S-G-Bif-0164-a-A-18	[23]
Lab158	GGTATFAgCAYCTGTFYCCA	S*-Lab-0158-a-A-20	[24]
Chis150	TTATGCGGTATTAATCTYCTTT	S*-Chis-0150-a-A-23	[25]
Erec482	GCTTCTTAGTCARGTACCG	S*-Erec-0482-a-A-19	[25]
Fprau645	CCTCTGCACTACTCAAGAAAAAC	S*-Fprau-0645-a-A-23	[26]
Ato291	GGTCGGTCTCTCAACCC	S*-Ato-0291-a-A-17	[27]

to every bacterial group were determined by combining in one hybridization tube the EUB 338-FITC probe with one the group-specific probe labeled with Cy5. An FL1 histogram was built to determine the total number of bacteria present in the sample and hybridizing with EUB 338. A gate was created in the FL1 histogram and a FL4 histogram was subsequently used to determine the proportion of cells hybridizing with the group-specific Cy5-probe. This proportion was corrected by eliminating the background of red fluorescence, determined by using the NON EUB 338-Cy5 probe as a negative control. Results were expressed as the proportion of cells hybridizing with the specific-group-Cy5 probe in relation to the total bacteria hybridizing with the EUB 338-FITC probe.

2.6. Statistical analysis

Concentrations of total *Lactobacillus* and La1 were expressed as \log_{10} (CFU or cells) per gram of stool (means \pm SEM). Statistical analysis was carried out by using Statistica package software (StatSoft, Tulsa, OK, USA). FISH results were expressed as the percentage of the total fluorescent events labeled with the Eub338 probe (means \pm SEM). Changes in the percentages of the bacterial populations were analyzed by Friedman analysis of variances for repeated measurements after angular transformation and, in case of significant results, differences were analyzed by the Wilcoxon test.

3. Results

3.1. Subjects' response

All the volunteers completed the study protocol and showed good tolerance for the product, reporting only mild increases of borborygmi during the third week when they ingested 500 mL per day of it.

3.2. Fecal determination of total *Lactobacillus* population and La1

High counts of *Lactobacillus* were observed in all the volunteers. As shown in Fig. 1, about $8.44 \pm 0.33 \log$ CFU g^{-1} of stool were observed in the basal period; these high concentrations were only slightly affected by La1 intake (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 18.4$; $p = 0.049$), with lower levels of *Lactobacillus* observed at days 13, 17 and 20 post-ingestion, compared with the levels seen during the first week of La1 intake.

Quantification by FISH and flow cytometry of total lactobacilli with the Lab158 probe specific for *Lactobacillus/Enterococcus* species, was carried out with the use

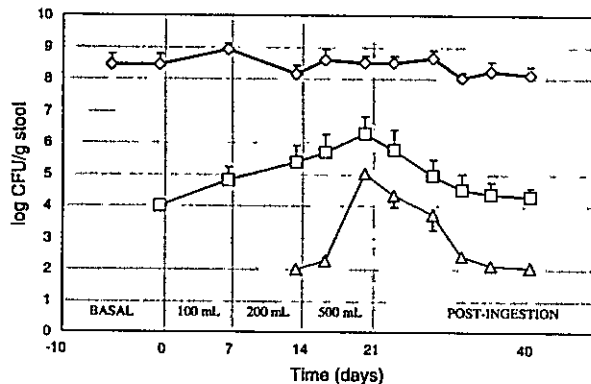


Fig. 1. Fecal excretion of total lactobacilli (\diamond), La1 (\square) and spores of *B. stearothermophilus* (Δ) in healthy volunteers during the basal, ingestion and post-ingestion periods. Each point represents the mean \pm SEM of the concentration measurements of eight volunteers.

of glass beads as described. Basal levels (about $8.0 \log$ cell g^{-1}) were similar to those previously observed by culture in MRS agar, and no changes were observed during ingestion and post-ingestion periods (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 4.50$; $p = 0.72$) (data not shown).

Fecal concentrations of La1 were evaluated by ERIC-PCR, a recently described typing technique first used with enterobacteria. The profiles generated by PCR have been shown to be resolutive for strains within a single species and this method allowed identification of La1 within the *L. johnsonii* species [18]. In Fig. 2, the profiles by ERIC-PCR of isolated colonies of fecal lactobacilli grown in MRS agar are compared with a positive control strain of La1. No La1 was found in any volunteer at baseline and the intake of this probiotic during the ingestion period resulted in its appearance

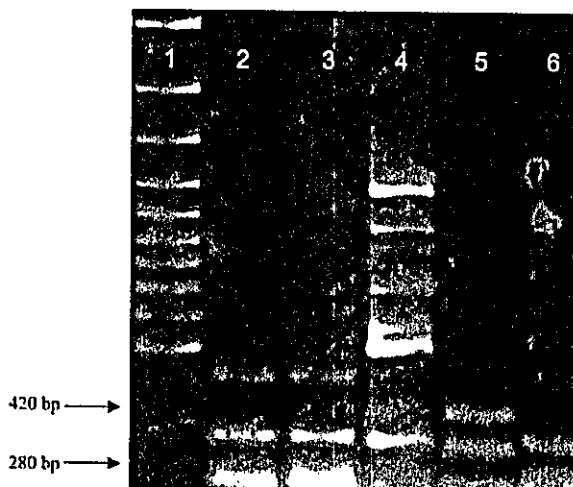


Fig. 2. Identification by ERIC-PCR of fecal lactobacilli from isolated colonies grown in MRS agar. Lane 1: molecular weight ruler; lane 2: positive control strain of La1; lanes 3 and 6: strains identified as La1; lanes 4 and 5: other strains.

in the stools of all the subjects, as shown by ERIC-PCR (Fig. 2). Fecal concentrations of La1 increased with the amount of product ingested, resulting in concentrations exceeding 10^6 g^{-1} at the end of the ingestion period (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 25.8$; $p = 0.0025$). At this point, however, La1 represented only the 0.63% of the total lactobacilli. Once the intake of the product with La1 ended, the fecal excretion of the probiotic regularly decreased, following the same decline pattern as that of the *B. stearothersophilus* spores, which are passively cleared by the intestinal peristaltism (Fig. 1). Fecal excretion of La1 was observed in 7/8 volunteers on day 7 post-ingestion and in 1/8 volunteers on day 17 post-ingestion. On day 49, i.e., 7 weeks after the end of the ingestion period, no La1 excretion was detected.

3.3. Evaluation of fecal populations by FISH

Fig. 3 shows how the different fecal bacterial populations were affected by the ingestion of the La1-containing product. The three main populations observed at baseline were *E. rectale*, *F. prausnitzii* and *Bacteroides* which represented 37.7%, 18.3% and 13.2% of the total bacteria detected, respectively (Fig. 3(a)). The *Atopobium* cluster represented 8.6% while *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and the *C. histolyticum* cluster were present as subdominant populations representing only 2.05%, 0.95% and 2.30%, respectively, of the EUB338-positive bacteria (Fig. 3(b)). All these populations represented 80% of the total bacteria detected by the universal EUB338 probe.

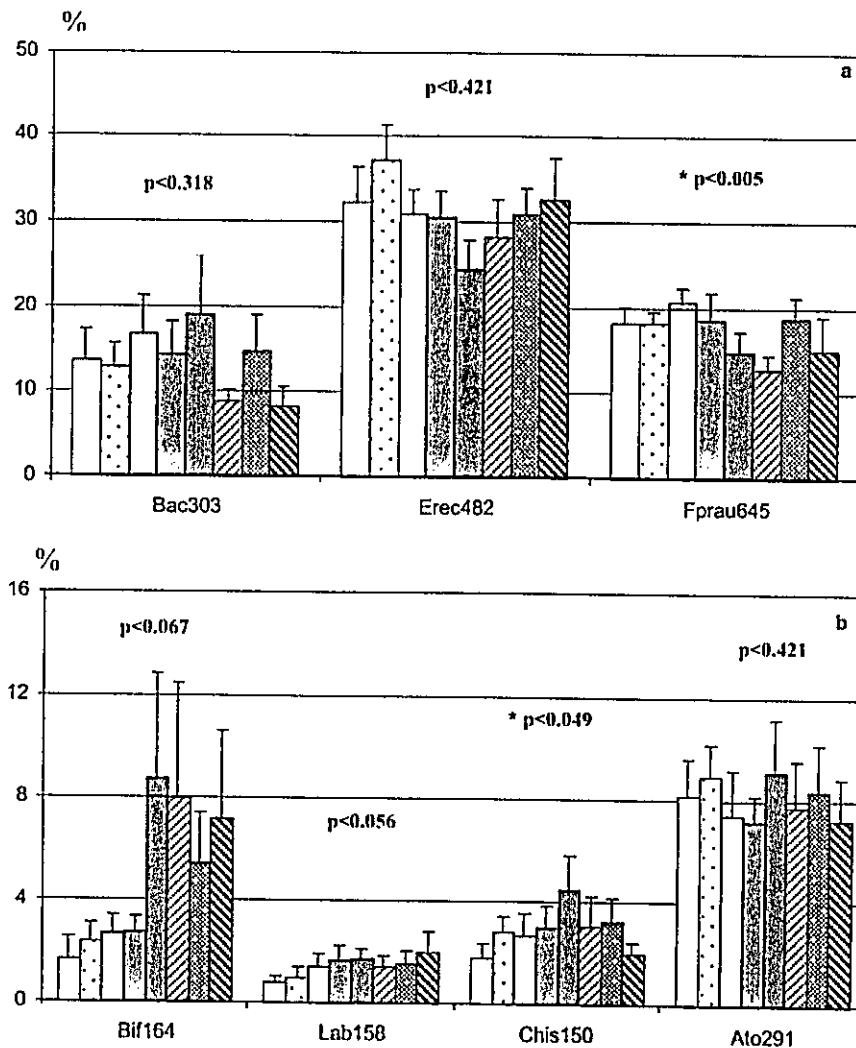


Fig. 3. Changes in the percentages (means \pm SEM) of the main fecal populations in response to La1 intake as measured by FISH and flow cytometry during the basal period, at days 5 (\square) and 0 (\square), the ingestion period, at days 7 (\square), 14 (\square) and 21 (\square) and the post-ingestion period, at days 7 (\square), 13 (\square) and 49 (\square). (a) Populations of *Bacteroides/Prevotella* (Bac303), *E. rectale/C. coccoides* cluster (Erec482), and *F. prausnitzii* cluster (Fprau645). (b) Populations of *Bifidobacterium* (Bif164), *Lactobacillus/Enterococcus* (Lab158), *C. histolyticum* cluster (Chis150), and *Atopobium* cluster (Ato291).

La1 ingestion resulted in the alteration of some of the bacterial populations evaluated in this study. A significant decrease was observed in the *F. prausnitzii* cluster (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 20.1$, $p = 0.005$) at days 21 of the period of ingestion and at day 7 post-ingestion, compared with baseline ($14.9 \pm 2.4\%$, $p = 0.049$ and $12.7 \pm 1.8\%$, $p = 0.036$, respectively) afterwards the levels of this population returned to baseline. No changes were observed for the *Bacteroides* and *E. rectale* populations (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 8.17$, $p = 0.32$ and $\chi^2 = 7.08$, $p = 0.42$, respectively).

As shown in Fig. 3(b), La1 intake increased the proportion of the *C. histolyticum* cluster (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 14.2$, $p = 0.049$), as well as the *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus/Enterococcus* populations (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 13.2$, $p = 0.067$ and $\chi^2 = 13.7$, $p = 0.056$, respectively), while no changes were observed in the *Atopobium* cluster (Friedman ANOVA: $\chi^2 = 7.08$, $p = 0.42$).

4. Discussion

Modulation of the intestinal microbiota is basic in the concept of probiotic utilization. Although La1 is a probiotic whose health-promoting effects are well described, data about its effect on human intestinal microbiota are scarce. Access to colonic lumen requires invasive methods and in consequence, most of the studies evaluating the effect of dietary manipulations of the microbiota have to be carried out on fecal samples; however it is important to take into account that the fecal microbiota is not an exact reflection of the cecal microbiota [28]. The results of the present study show that the regular ingestion of a La1-containing product affects the fecal bacterial populations of healthy human volunteers. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *C. histolyticum* cluster populations were increased as percentages of the total bacteria detected by the Eub338 probe, while the cluster corresponding to *F. prausnitzii* was decreased and those of *Bacteroides*, *Atopobium* and *E. rectale* were not affected by La1 ingestion. Such an effect is probably related to the ability of La1 to survive its transit along the gastrointestinal tract, as shown by the fecal excretion of living La1, and to its presence in the intestinal lumen at concentrations allowing health-promoting effects [2,3,6,15]. However, after completing the period of administration of the product, La1 was rapidly eliminated from the intestinal lumen, following the pattern of *B. stearothersophilus* spores clearance and the affected bacterial populations generally tended to return to their baseline levels. These findings confirm that a probiotic such as La1, although of human origin, acts in most people as an allochthonous microorganism which transits along the gastrointestinal tract of the host but without colonizing it. This is due to the efficient bar-

rier function exerted, among others, by the autochthonous microbiota. Compared with other human studies [9,29], high concentrations of total lactobacilli ($>10^8$ g^{-1} of stool) were detected in our subjects by culture methods as well as by FISH and flow cytometry. It is possible that this relatively important population of autochthonous lactobacilli acts as a strong competitor for La1 and that this may explain why La1 levels were not higher than 10^7 g^{-1} of stool, in spite of the daily consumption of 5×10^{10} La1.

The increase of *C. histolyticum* cluster, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* is probably favored by the decrease of the dominant populations of *F. prausnitzii* and perhaps other species not detected by the probes used in this study. The increase in *Bifidobacterium* population during the ingestion and post-ingestion periods is interesting and confirms recent observations we carried out in infants who received a La1-supplemented milk-formula for 7 weeks (Brunser et al., submitted for publication). In these infants, La1 intake increased the *Bifidobacterium* population from less than 5% of the total bacteria at baseline to a level of about 20% after 7 weeks; however this was not associated with changes in *Clostridium*, *Bacteroides* or *Enterococcus* populations. In relation with these findings, it is interesting to note that the recent description of the La1 genome [10] indicates that this microorganism possesses the metabolic pathways necessary to synthesize and release fructan molecules in the gut lumen. Such molecules are known to act as prebiotics [29], selectively stimulating the growth of endogenous *Bifidobacterium* populations in the colon, as it was observed in this study. It is probable that this "prebiotic" property is not general to all *Lactobacillus* sp. but is specific of La1 as the regular ingestion of *L. rhamnosus* DR20, for example, was not associated with changes in fecal bifidobacteria concentrations in humans [9]; these authors did not observe alterations of the populations of *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium* or *Atopobium* associated with DR20 intake. In opposition with these findings, we observed that La1 ingestion resulted in a lower *F. prausnitzii* population. Regulation of *Fusobacterium* levels may be interesting for the host's health as *Fusobacterium* species isolated from patients with ulcerative colitis have been shown to be capable of inducing colitis in rats, implicating these microorganisms as a possible etiologic factor in IBD [30]. *Eubacterium* has also been implicated in IBD [31] but in this study we do not observe any significant effects of La1 on the *E. rectale* cluster population, perhaps due to the high variability in their basal levels. When our results are compared with those of Tannock et al. [9], it is interesting to notice that La1 and DR20 exert different effects on the human fecal microbiota. This suggests that every probiotic strain possesses specific properties or activities that influence their interrelationships with the autochthonous bacterial populations in the human gut

ecosystem. More studies are necessary to clarify this point.

In conclusion, our results show that consumption of a Lactobacillus-containing product by human volunteers modulates their fecal microbiota, as shown by the higher levels of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *C. histolyticum* populations and lower levels of *F. prausnitzii*. They also confirm that Lactobacillus does not colonize permanently the gastrointestinal tract of the host, but that it is rapidly cleared when its intake is stopped. This results in the return of the affected bacterial populations to their baseline levels. These observations suggest that regulation of intestinal homeostasis may be an important factor in the health-promoting effects attributed to Lactobacillus.

Acknowledgments

This study was supported by Fondecyt 1010673, Fondecyt 7010673, ECOS C01S03 and Nestle-Chile. We thank the volunteers for their contribution to the study, Ms. Rebecca Montalba for flow cytometry analysis, and Dr. Oscar Brunser for reviewing the manuscript.

References

- [1] Ghalioungui, P. (1979) Fermented beverages in antiquity In: Fermented Food Beverages in Nutrition (Gastineau, Clifford F., Darby, William J. and Turner, Thomas B., Eds.), pp. 3–19. Academic Press, London.
- [2] Haller, D., Blum, S., Bode, C., Hammes, W.P. and Schiffrin, E.J. (2000) Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. *Infect. Immun.* 68, 752–759.
- [3] Bernet-Camard, M.F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. and Hudault, S. (1997) The human *Lactobacillus acidophilus* strain La1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2747–2753.
- [4] Gotteland, M., Cruchet, S. and Verbeke, S. (2001) Effect of *Lactobacillus* ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indomethacin in humans. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15, 11–17.
- [5] Reid, G., Sanders, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C. and Klaenhammer, T.R. (2003) New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* 37, 105–118.
- [6] Kalliomaki, M. and Isolauri, E. (2003) Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 3, 15–20.
- [7] Kanauchi, O., Mitsuyama, K., Araki, Y. and Andoh, A. (2003) Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr. Pharm. Des.* 9, 333–346.
- [8] Hatakka, K., Martio, J., Korpela, M., Herranen, M., Poussa, T., Laasanen, T., Saxelin, M., Vapaatalo, H., Moilanen, E. and Korpela, R. (2003) Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis – a pilot study. *Scand. J. Rheumatol.* 32, 211–215.
- [9] Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J., Welling, G.W., Smart, J. and Gopal, P.K. (2000) Analysis of the faecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2578–2588.
- [10] Pridmore, R.D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A.C., Zwahlen, M.C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., Mollet, B., Mercenier, A., Klaenhammer, T., Arigoni, F. and Schell, M.A. (2004) The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC533. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2512–2517.
- [11] Haller, D., Bode, C., Hammes, W.P., Pfeifer, A.M., Schiffrin, E.J. and Blum, S. (2000) Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47, 79–87.
- [12] Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E.J. and von der Weid, T. (2003) Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infect. Immun.* 71, 428–436.
- [13] Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. and Servin, A.L. (1994) *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 35, 483–489.
- [14] Neeser, J.R., Granato, D., Rouvet, M., Servin, A., Teneberg, S. and Karlsson, K.A. (2000) *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology* 10, 1193–1199.
- [15] Cruchet, S., Obregon, M.C., Salazar, G., Diaz, E. and Gotteland, M. (2003) Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition* 19, 716–721.
- [16] Gotteland, M. and Cruchet, S. (2003) Suppressive effect of frequent ingestion of *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in asymptomatic volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1317–1319.
- [17] Bouhnik, Y., Pochart, P., Marteau, P., Arlet, G., Goderel, I. and Rambaud, J.C. (1992) Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp. ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 102, 875–878.
- [18] Ventura, M. and Zink, R. (2002) Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 141–154.
- [19] Rigottier-Gois, L., Le Bourhis, A.G., Gramet, G., Rochet, V. and Dore, J. (2003) Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 237–245.
- [20] Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- [21] Wallner, G., Amann, R. and Beisker, W. (1993) Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136–143.
- [22] Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. and Schleifer, K.H. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142, 1097–1106.
- [23] Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H. and Welling, G.W. (1995) Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3069–3075.
- [24] Harmsen, H.J.M., Elfferich, P., Schut, F. and Welling, G.W. (1999) A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli

- and enterococci in fecal samples by fluorescent in situ hybridization. *Microbiol. Ecol. Health. Dis.* 11, 3–12.
- [25] Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., Jansen, G.J., Schut, F. and Welling, G.W. (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3336–3345.
- [26] Suau, A., Rochet, V., Sghir, A., Gramet, G., Brewaeys, S., Sutren, M., Rigottier-Gois, L. and Dore, J. (2001) *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 139–145.
- [27] Harmsen, H.J., Wildeboer-Veloo, A.C., Grijpstra, J., Knol, J., Degener, J.E. and Welling, G.W. (2000) Development of 16S rRNA-based probes for the *Coriobacterium* group and the *Atopobium* cluster and their application for enumeration of coriobacteriaceae in human feces from volunteers of different age groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4523–4527.
- [28] Marteau, P., Pochart, P., Dore, J., Bera-Maillet, C., Bernalier, A. and Corthier, G. (2001) Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4939–4942.
- [29] Gibson, G.R. (1999) Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.* 129 (Suppl.), 1438S–1441S.
- [30] Ohkusa, T., Okayasu, I., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M. and Sato, S. (2003) Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 52, 79–83.
- [31] Wensinck, F. and Van de Merwe, J.P. (1981) Serum agglutinins to *Eubacterium* and *Peptostreptococcus* species in Crohn's and other diseases. *J. Hyg. (Lond.)* 87, 13–24.