# Caracterización de bacterias ácido-lácticas con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras y su investigación aplicada en sanidad animal

## Autor: María Bravo Santillana

Página 1:  
 TESIS DOCTORAL  
  
  
  
 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS CON  
PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS E INMUNOMODULADORAS  
 Y SU INVESTIGACIÓN APLICADA EN SANIDAD ANIMAL  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA  
  
  
 PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL  
  
 2021

Página 3:  
 TESIS DOCTORAL  
  
  
  
 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS CON  
PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS E INMUNOMODULADORAS  
 Y SU INVESTIGACIÓN APLICADA EN SANIDAD ANIMAL  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA  
  
  
 PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL  
  
 2021  
  
  
  
 CONFORMIDAD DE LOS CODIRECTORES  
  
  
  
«La conformidad de los directores aparece firmada en la versión original en papel de  
 esta Tesis Doctoral»

Página 5:  
Dr. Joaquín Rey Pérez, Profesor Titular del Departamento de Sanidad Animal de la  
  
Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, como tutor de la estudiante  
de doctorado y codirector de la tesis doctoral; Dr. David Risco Pérez, investigador en  
  
Sanidad Animal en INGULADOS y NEOBEITAR, y Dra. Rosario Cerrato Horrillo  
investigadora y responsable del Departamento I+D+i en INGULADOS, codirectores de la  
  
tesis doctoral.  
  
CERTIFICAN  
  
Que la tesis doctoral titulada «Caracterización de bacterias ácido-lácticas con  
propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras y su investigación aplicada en  
  
sanidad animal» ha sido desarrollada con financiación del Programa de Doctorados  
Industriales (Agencia Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia, Innovación y  
  
Universidades, DI-17-09603) para su desempeño en INGULADOS SL bajo la tutela de la  
Universidad de Extremadura.  
  
  
Que la mencionada tesis doctoral debe estar sometida a un proceso de protección  
  
debido a la transferencia de tecnología y conocimiento que conlleva la solicitud de dos  
  
patentes de invención y debe quedar eximida temporalmente de la obligación de ser  
publicada de manera completa en el repositorio digital abierto durante un periodo de 5  
  
años.  
  
  
  
Que la tesis doctoral codirigida por nosotros y realizada por María Bravo Santillana  
  
reúne los requisitos para optar al título de Doctora Internacional así como para la  
Mención Industrial al título.  
  
  
  
 «El informe favorable de los directores aparece firmado en la versión original en  
 papel de esta Tesis Doctoral y los documentos que certifican las menciones se  
 entregarán una vez autorizado el procedimiento de confidencialidad»

Página 7:  
Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a:  
  
  
Subvenciones para contratos para la formación de doctores en empresas  
(DI-17-09603) del Programa de Doctorados Industriales de la Agencia  
Estatal de Investigación del Ministerio de Ciencia, Innovación y  
Universidades, 2017.  
  
  
  
  
  
Becas QUERCUS+ para la financiación de formaciones prácticas mediante  
estancias en el extranjero, 2016-2017.  
  
  
  
  
  
Y ha sido consecuencia de la participación en los siguientes proyectos de  
I+D+i:  
  
  
«Alternativa a antibióticos para el control de enfermedades en especies  
cinegéticas (INMUNOBALANCE)» del Centro para el Desarrollo Tecnológico  
Industrial (IDI-20201262) y el Ministerio de Ciencia, Innovación y  
Universidades

Página 8:  
«Nuevos compuestos postbióticos procedentes de ungulados para la  
mejora del sistema inmune de los corderos (POSBIOLAMB)» de la  
Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital de la Junta de  
Extremadura (IDA2-19-002-3)  
  
  
  
  
  
«Interacción sinérgica de antibióticos con nuevos compuestos bioactivos  
secretados por bacterias» y «Efectos de la administración de elementos  
inmunomoduladores en rumiantes» del ICEX (España Exportación e  
Inversiones) y el Ministerio de Industrial, Comercio y Turismo.  
  
  
  
  
  
«Caracterización de productos inmunomoduladores para el control de la  
tuberculosis bovina en fauna salvaje» de la Consejería de Economía e  
Infraestructuras de la Junta de Extremadura (AA/17-0001-1).

Página 12:  
 AGR | Agradecimientos  
  
Llevo días, incluso meses, pensando en cómo trasladar mi gratitud a todas las personas  
  
que me han acompañado en este camino. Espero saber transmitir con palabras los  
  
agradecimientos de corazón que tengo en mi cabeza desde hace mucho tiempo.  
  
  
En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores. Gracias a Joaquín Rey, que fue  
la primera persona que vio en mí esa chispa que yo aún no sabía que tenía. Muchas  
  
gracias por estar conmigo desde el primer día, a ti puedo considerarte mi padre en el  
mundo de la investigación y te estaré eternamente agradecida por darme la primera  
  
oportunidad de mi vida, por querer siempre lo mejor para mí y por facilitarme la toma  
de decisiones en todo momento. Gracias a Rosario Cerrato, que me propuso el cambio  
  
de rumbo que, sin duda, habrá marcado para siempre mis comienzos en este mundo.  
Nada de esto habría sido posible sin tus ideas, sin tu apoyo constante y sin tu optimismo,  
  
sin todo el trabajo en la sombra que haces por mí y por todos los que trabajamos en  
  
INGULADOS. Tú eres mi madre y la madre de todos en esta familia que se ha formado  
gracias a ti y gracias a Pedro. Gracias a David Risco, por hacer que hasta lo más difícil  
  
pareciese sencillo, por darme la confianza que he necesitado en algunos momentos y  
porque, cuando las cosas se pusieron del revés, te cruzaste en mi camino para ponerlas  
  
de frente. Te has convertido en mi referente, eres ese hermano mayor al que todos  
quieren parecerse. «Si he llegado a ver más lejos, ha sido encaramándome a hombros  
  
de gigantes» – Isaac Newton  
  
  
Gracias a Pedro Fernández, por dejarme crear y ayudarme a crecer, por darle valor a mis  
  
ideas y ayudarme a materializarlas. Gracias por apostar por mí, por darme el impulso  
que he necesitado siempre en el momento preciso, y por implicarte siempre en aportar  
  
lo que me faltaba en ocasiones para que pudiese seguir avanzando. Muchas gracias por  
preocuparte por mi bienestar, eres el ejemplo perfecto del jefe perfecto. «Locura es  
  
hacer lo mismo una y otra vez esperando obtener resultados diferentes» – Albert  
Einstein.  
  
  
Muchísimas gracias a todo el equipo de INGULADOS, espero que todos sintáis cada  
  
página de este trabajo como vuestra, porque sin vosotros nada de esto habría sido  
  
posible. Gracias a Waldo, por todo lo que has aportado al desarrollo de esta tesis, por  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 12

Página 13:  
AGR | Agradecimientos  
  
sacarme al campo a respirar el aire que me ha dado la vida y por dejarme aprender de  
  
ti. Hemos estado en los momentos difíciles estos últimos años y espero que podamos  
  
seguir acompañándonos, sobre todo, en los momentos felices. Gracias a Pilar, más que  
una compañera, mi amiga, por tener siempre buenas palabras, me has transmitido tu  
  
cariño, tu apoyo y, sobre todo, tu confianza en mí. Gracias por haber sabido elegir los  
momentos para darme buenos consejos que me llevo para siempre y por tu  
  
predisposición a ayudarme y enseñarme siempre. Gracias a Verónica, porque tu  
colaboración ha sido fundamental para que muchos estudios saliesen adelante, igual  
  
que el trabajo diario que haces en laboratorio con una labor indispensable para este  
equipo. Gracias por tu entrega y por tu apoyo, que ha sido esencial tanto laboral como  
  
personalmente. Gracias a Maru, la pieza fundamental que hace que todo el trabajo que  
los demás hacemos encaje, por tu paciencia con nosotros y por intentar entendernos  
  
para ayudarnos siempre. Da mucha confianza tener a una persona como tú, siempre un  
  
paso por delante, detrás de todo. Gracias a María José, porque desde el primer día que  
iniciábamos la carrera como novatas hasta el día de hoy, el destino ha querido que nos  
  
uniésemos cada día más, tu apoyo ha sido fundamental en esta fase final. Gracias a  
Carlos, a Javier y a todos los que han pasado por nuestros laboratorios en determinados  
  
momentos, porque han empleado sus horas de trabajo en darme a mí un tiempo  
valiosísimo que necesitaba para sacar esto adelante. Gracias a Julián Navarro, que nos  
  
permite tener lo que hoy disfrutamos, que nos ha aportado el impulso que  
necesitábamos para crecer y ha confiado en este y todos nuestros proyectos. Gracias  
  
por darme un futuro en este camino que he elegido. «Solo la ciencia nos puede otorgar  
  
los elementos para salvar a la naturaleza y, con ello, a la humanidad» – Félix Rodríguez  
de la Fuente.  
  
  
Me gustaría expresar mi gratitud hacia todas las personas e instituciones que han hecho  
  
posible el desarrollo de esta tesis doctoral. Gracias a todas las empresas colaboradoras,  
a todos los trabajadores y propietarios de las fincas y las cooperativas que han  
  
participado en los estudios de este trabajo. Agradezco enormemente a Jesús Núñez por  
hacer de esta tesis doctoral tan personal un documento con el que me siento  
  
identificada, gracias por ocuparte de la maquetación como un grandísimo profesional.  
  
Gracias también a Paco Pulido, que realizó la fotografía que fue elegida como portada  
  
  
 13 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 14:  
 AGR | Agradecimientos  
  
de esta tesis y por cederla de forma desinteresada. «Mucha gente pequeña, en lugares  
  
pequeños, haciendo cosas pequeñas, puede cambiar el mundo» – Eduardo Galeano.  
  
  
Quiero agradecer especialmente a Jorge Gutiérrez, por descubrirme el maravilloso  
  
mundo de las bacterias ácido-lácticas, sin duda tus contribuciones han dotado de calidad  
científica esta tesis doctoral y marcaron el inicio del camino que me dio el salto que  
  
necesitaba para crecer profesional y personalmente. Gracias por todos tus consejos  
siempre en buen momento. Gracias a la University of Surrey, a Fernando Martínez,  
  
Arnoud van Vliet y Theo por vuestras aportaciones y a Katie y Athanasios por vuestro  
apoyo y vuestra ayuda. Gracias todos los que hicieron que las estancias en Inglaterra  
  
fuesen de las mejores experiencias de mi vida, en especial a Iliana, a Marco, a Manuel,  
a Pablo, a Corrado y a todos los brindaron de recuerdos mi estancia allí. «The microbe is  
  
nothing, it’s the environment» – Louis Pasteur.  
  
  
Muchas gracias al grupo de investigación en Configuración de Sistemas Moleculares y  
  
Celulares (COSMYC) por abrirme las puertas, por despertar mi curiosidad y acercarme al  
mundo de la biología molecular. Gracias a Paco Centeno, a Chema Carvajal y a Ángel  
  
Román por poner vuestros conocimientos y laboratorios a nuestra disposición, por  
entender y respetar mis tiempos y mis ideas, por permitirme aprender de vosotros y con  
  
vosotros. Mil gracias a todos vuestros pupilos que tanta ayuda desinteresada me han  
brindado, en especial a Sergio y Selene, por acogerme en Badajoz como una más, por  
  
mandarme vuestra fuerza y confianza en la fase final. Todas las estancias allí han  
  
aportado mucho y los proyectos nos auguran un camino juntos que será seguro muy  
enriquecedor. «Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar erróneamente es  
  
mejor que no pensar nada» – Hipatia de Alejandría.  
  
  
Mi agradecimiento hacia a los miembros de la Unidad de Infecciosas del HCV-UEx.  
Gracias a Juanma, a Javier y a Miguel, por vuestras enseñanzas, a Remi, que me enseñó  
  
a coger una pipeta y creyó en mí desde la primera vez que pisé un laboratorio, a María  
Gil, que compartió muchos momentos conmigo en ese periodo de mi formación, a  
  
Almudena y al resto de personas que me ayudasteis cuando estaba allí. Gracias a mis  
  
compañeros de promoción, en especial a Ángela, a Marga, a Jaime Galeano y a María  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 14

Página 15:  
AGR | Agradecimientos  
  
Matilla, pero también a todos los que fuisteis importantes en esa etapa, que me  
  
aportasteis tanto en los pasos previos a esto y con los que compartí muchos instantes  
  
en un momento especial de mi vida, sin el cual no estaría ahora aquí. Gracias a todos los  
profesores y profesionales que me enseñaron durante el Grado en Veterinaria las bases  
  
de lo que hoy se refleja en este trabajo, en especial a Joaquín Sánchez, a Rafael Barrera  
y a Patricia Ruiz, os guardo un cariño especial. «Nada en este mundo debe ser temido,  
  
sino entendido» – Marie Curie.  
  
  
Durante toda mi trayectoria académica he tenido la suerte de contar con muchas  
personas que me han impulsado a llegar hasta aquí. Gracias al colegio San Antonio de  
  
Padua, su actual Directora Titular Sonia Martín, por contar conmigo y permitirme  
transmitir mi pasión por la investigación a los alumnos cada año y a todos los demás  
  
profesores y resto de profesionales que participaron en mi educación y a día de hoy  
  
siguen mis pasos y me apoyan en mi camino. Ojalá pudiese nombraros a todos los que  
me aportasteis tanto, «porque dando, se recibe» – San Francisco de Asís. El colegio me  
  
inició en el deporte que ha marcado mi vida y mi trayectoria personal. Gracias a todos  
mis entrenadores, compañeras de equipo y a todas las personas que me ha regalado el  
  
baloncesto, que me aportaron muchísimo dentro de las pistas y que me ha servido de  
vía de escape durante toda mi etapa académica y también laboral. Gracias a todas las  
  
personas que me han permitido transmitir a las niñas mi pasión por este deporte.  
Gracias a Martina, que ha sido un gran apoyo en los momentos difíciles en el ámbito  
  
personal y que me ha acompañado también durante esta tesis doctoral. Gracias a Pedro  
  
Juan, a Sergio Martínez, a David González, por todo vuestro apoyo y a todo el equipo de  
Salubriá y, en especial, a Mario Díaz, por cuidar de mi rodilla y de mi cabeza en muchas  
  
ocasiones. «No es que queramos ganar, es que queremos ser mejores» – Laia Palau.  
  
  
Mi agradecimiento especial para mis míticos, mis amigos de siempre y para siempre. A  
Marina, mi «superstar», gracias por hacer que la distancia entre Irlanda y España parezca  
  
cercana, por hacerme sentir cada vez que nos reencontramos que el tiempo no pasa por  
nuestra amistad y que vamos a ser Best Friends Forever. A Jorge, por no fallar nunca, por  
  
estar siempre ahí con tu alegría y tu forma especial de ver las cosas, por tus intentos de  
  
entender cada palabra complicada que sale de mi boca y que hace que sienta que tengo  
  
  
 15 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 16:  
 AGR | Agradecimientos  
  
un amigo apoyándome al lado. A Carolina, por confiar en mí con los ojos cerrados, por  
  
esa risa contagiosa y todas las palabras bonitas que te salen de lo más profundo y me  
  
han dado la energía cuando más lo necesitaba, sin saberlo. A Pedro, por volver siempre  
a recordarnos que somos los de siempre, por esas tonterías que te sacan las sonrisas. A  
  
Inés, a Judith, a Maru, a los Albertos, por hacer de cada vez que nos juntamos todos,  
momentos memorables. Mención especial a mi Chef Pound, gracias a Carmen, María,  
  
Jorge, Sergio y Marta me he sentido acompañada, ellos me han facilitado el camino.  
Gracias por enseñarme el licor de crema catalana el día de mi 30 cumpleaños, sin el cual  
  
la recta final habría sido un infierno. Gracias por los viernes y domingos de baloncesto,  
por conformar este grupo burbuja que nos ha ayudado a superar una pandemia. «Lo  
  
más importante es intentar inspirar a las personas, para que ellos puedan ser grandes  
en cualquier cosa que quieran hacer» – Kobe Bryant.  
  
  
Mi eterno agradecimiento a María por darme alas y no ponerme techo, porque no solo  
me has dejado volar, sino que te has elevado conmigo y no has permitido que me caiga.  
  
«Pies, ¿para qué los quiero si tengo alas para volar?» – Frida Kahlo.  
  
  
Gracias a toda mi familia, la que está cerca y la que está lejos, porque sé que seguís cada  
paso que doy y no me dejáis nunca de acompañar, aunque sea en la distancia. Gracias a  
  
Los Gilitos, porque compartís a millones tanto el orgullo de mis logros en el mundo  
académico como todos esos vídeos y risas en el grupo de WhatsApp que nos salva de no  
  
poder habernos visto más. Por muchos más mensajes reenviados en ese grupo que nos  
  
mantiene unidos. Gracias a los Bravo, que llevan la palabra «valiente» por naturaleza en  
el apellido y me servís como inspiración, sois mis referentes. Gracias a mi familia  
  
madrileña y vitoriana, por acogernos siempre con cariño y hospitalidad y brindarnos  
vuestro amor desde la distancia, sé que no me dejáis nunca de acompañar. A mi familia  
  
de Cáceres, gracias por estar tan cerca, dándome todo el apoyo que siento con fuerza.  
Todo es mucho más fácil cuando recibes el sustento de tantas y tantas personas.  
  
«Cuando cae la nieve y sopla el viento blanco, el lobo solitario muere, pero la manada  
sobrevive» – Juego de tronos.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 16

Página 17:  
AGR | Agradecimientos  
  
Mi más sincero reconocimiento en especial a Gema por ser mi confidente, por estar  
  
conmigo cuando más lo necesito. Gracias toda tu familia y en especial a Marta,  
  
«miniyo», tu personalidad te hará convertirte en una mujer fuerte y sin barreras. «No  
importa lo grande que sea la casa, sino lo feliz que sea el hogar» – Anónimo.  
  
  
Gracias a mis padrinos Choni y Luis, por todo el amor que me transmiten como si fuese  
  
una hija más y gracias a Luisito, un amigo muy especial que me enseñó desde pequeña  
que los sentimientos no pueden comprarse. Muchas gracias por contagiarme tu  
  
sentimiento de alegría y a ti y a mis padrinos por estar siempre a mi lado y compartir  
mis momentos más felices. «Las palabras amables pueden ser cortas y fáciles de decir,  
  
pero sus ecos son infinitos» – Madre Teresa de Calcuta.  
  
  
Gracias a los Moreno Lobato, la familia con la que no compartimos sangre, pero  
  
decidimos compartir nuestra vida. Gracias a Ana y a Bea por entenderme, por  
acompañarnos en los momentos difíciles y hacernos partícipes de los momentos felices,  
  
por darle un sentido especial a la palabra «vecinas», que ahora significa «mucho más  
que amigas», porque denota cercanía. «Te llevo en mi corazón y cerca me tendrás» -  
  
Coco.  
  
  
Gracias a mis perritas, por darme su amor sin pedir nada a cambio. A Hydra, que dio a  
amor a mis padres cuando nosotras todavía no habíamos llegado y nos protegió como  
  
si fuésemos sus cachorras. A Cora, que llegó a nuestra vida para cambiarnos los  
  
esquemas y tiene su forma especial de querernos desde entonces. A Trufa, que ha  
puesto mi vida patitas arriba y me ha despertado los fines de semana temprano para  
  
ponerme pronto a escribir. «Si hay una cosa que nadie ha podido comprar con dinero,  
esa es el movimiento de la cola de un perro» – La dama y el vagabundo.  
  
  
Gracias a mis padres Pedro y Montaña, cuyo legado nos ha dado la mayor lección de  
  
vida. Durante muchos años luchasteis por el sueño de convertiros en padres y 30 años  
después estoy aquí gracias a vosotros, porque nunca os rendisteis. Gracias a vosotros  
  
ahora sé que puedo conseguir todo lo que me proponga y no pienso rendirme nunca  
  
hasta conseguirlo. Gracias, mamá, por tu ejemplo de fortaleza ante las adversidades,  
  
  
 17 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 18:  
 AGR | Agradecimientos  
  
por contagiarnos tus ganas, tu risa y tus lágrimas de felicidad. Gracias, papá, por  
  
ayudarme cuando se puede y apoyarme cuando no, por protegerme y por demostrarnos  
  
a todos que juntos siempre seremos más fuertes. Os quiero con todo mi corazón.  
«Vuestro mérito no es haberme dado la vida, sino haberme enseñado a vivir» – Elvira  
  
Sastre.  
  
  
Gracias a mi hermana Carmen, que es la persona más importante de mi vida, mi gran  
ejemplo a seguir, aunque sea biológicamente la pequeña. Hicieron falta 18 meses de mi  
  
vida para entender que solo hay una persona en el mundo a la que se puede querer más  
que a uno mismo. Gracias por confiar incondicionalmente en mí desde el primer día  
  
hasta el último, por alentarme en los fracasos y alegrarte por mis logros como si fuesen  
tuyos, y es que en parte lo son. Por eso te dedico a ti de forma especial esta tesis  
  
doctoral, porque nada de esto habría sido posible sin el ejemplo de fortaleza y resiliencia  
  
que transmites día a día, eres mi heroína: una superviviente. «Aunque nos quedan  
muchas batallas por librar, tenemos algo que Voldemort no tiene: algo por lo que merece  
  
la pena luchar» – Harry Potter.  
  
  
  
 María Bravo Santillana  
  
 Cáceres, 2 de agosto de 2021  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 18

Página 24:  
A todas las niñas que sueñan con ser científicas  
  
  
 A todas las mujeres que luchan por llegar lejos  
  
  
 A mi hermana, Carmen, para que nunca te  
 falte un motivo por el que seguir adelante

Página 26:  
 ÍND| General  
  
  
  
  
  
MARÍA BRAVO SANTILLANA 26

Página 27:  
IND| General  
  
  
  
  
  
 27 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 29:  
IND| General  
  
  
  
  
  
 29 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 30:  
 ÍND| General  
  
ÍNDICE GENERAL  
  
  
  
  
  
RESUMEN / Abstract 44  
  
 RESUMEN 46  
 ABSTRACT 50  
  
REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO 54  
  
 Importancia de la microbiota en los hospedadores 58  
 La microbiota de la fauna silvestre 63  
 Las bacterias ácido-lácticas 65  
  
 Compuestos bioactivos en alimentos y piensos: los posbióticos 68  
  
INTRODUCCIÓN A LA TESIS DOCTORAL Y OBJETIVOS 74  
  
 Introducción a la tesis doctoral 76  
 Estructura de la tesis doctoral 78  
  
 Objetivos de la tesis doctoral 80  
  
BLOQUE I: Experimentos de laboratorio in vitro 85  
  
 Capítulo I: Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes  
  
 que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para  
 antagonizar las micobacterias 89  
 INTRODUCCIÓN 91  
 MÉTODO 97  
  
 FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO 105  
 RESULTADOS 106  
 DISCUSIÓN 124  
  
 CAPÍTULO II: Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios de seguridad,  
 determinación in vitro de la acción antimicrobiana frente a patógenos y valoración de su capacidad  
 inmunomoduladora 133  
  
 INTRODUCCIÓN 135  
 MÉTODO 145  
 FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO 153  
 RESULTADOS 154  
  
 DISCUSIÓN 170  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 30

Página 31:  
IND| General  
  
 CAPÍTULO III: Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la  
 actividad y estudios de sinergia con antibióticos 181  
 INTRODUCCIÓN 183  
 MÉTODO 187  
  
 FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO 193  
 RESULTADOS 194  
 DISCUSIÓN 200  
  
Bloque II: Experimentación ANIMAL in vivo 207  
  
 CAPÍTULO IV: Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una  
 neumonía experimental en modelo ratón 211  
  
 INTRODUCCIÓN 213  
 MÉTODO 218  
 FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO 225  
 RESULTADOS 226  
  
 DISCUSIÓN 230  
  
 CAPÍTULO V: Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los  
 parámetros productivos en ganadería 235  
  
 INTRODUCCIÓN 237  
 MÉTODO 243  
 FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO 253  
 RESULTADOS 254  
  
 DISCUSIÓN 263  
  
 CAPÍTULO VI: Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre 271  
 INTRODUCCIÓN 273  
  
 MÉTODO 280  
 FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO 285  
 RESULTADOS 286  
  
 DISCUSIÓN 291  
  
BLOQUE III: Transferencia de tecnología y conocimiento científico 297  
  
 CAPÍTULO VII: Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica  
 301  
  
 INTRODUCCIÓN 303  
  
CONCLUSIONES 321  
  
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 335  
  
  
  
 31 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 32:  
 ÍND| General  
  
APÉNDICES 388  
  
 APÉNDICE I 390  
  
 APÉNDICE II 395  
  
 APÉNDICE III 396  
  
 APÉNDICE IV 405  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 32

Página 34:  
 ÍND| Tablas  
  
ÍNDICE DE TABLAS  
  
  
  
  
  
REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO 54  
  
 Tabla A. Definiciones de productos bioactivos utilizados en alimentación humana y animal  
  
 aceptados por la comunidad científica en la actualidad 69  
  
BLOQUE I: Experimentos de laboratorio in vitro 85  
  
 Capítulo I: Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes  
 que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para  
  
 antagonizar las micobacterias 89  
 Tabla 1.1. Información general sobre las fincas incluidas en el estudio 97  
 Tabla 1.2. Identificación mediante secuenciación del gen 16S de ARNr de las 30 cepas de 4  
  
 poblaciones de jabalíes 107  
 Tabla 1.3. Selección final de aislados 109  
  
 CAPÍTULO III: Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la  
 actividad y estudios de sinergia con antibióticos 181  
  
 Tabla 3.1. Resultado de la concentración bacteriana y actividades antimicrobianas para los  
 aislados de BAL seleccionados 194  
 Figura 3.3. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana encontrada para las diferentes  
  
 fracciones por pesos moleculares de L. salivarius C12. Las fracciones más pequeñas (3 -10 KDa y <  
 3 KDa) conservan buena parte de la actividad basal del sobrenadante completo (control). 197  
  
Bloque 2: Experimentación ANIMAL in vivo 207  
  
 CAPÍTULO IV: Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una  
 neumonía experimental en modelo ratón 211  
 Tabla 4.1. Elaboración de los grupos de la fase previa del estudio experimental 221  
 Tabla 4.2. Elaboración de los grupos de la primera fase del estudio experimental 222  
  
 Tabla 4.3. Elaboración de los grupos de la segunda fase del estudio experimental 223  
  
 CAPÍTULO V: Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los  
 parámetros productivos en ganadería 235  
  
 Figura 5.2. Distribución provincial del censo de ovino en España (datos del año 2019). 239  
 Fuente: S.G. Análisis, Coordinación y Estadística (MAPA). 239  
 Tabla 5.2. Resultados de los parámetros productivos por grupos de estudio 258  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 34

Página 35:  
IND| Tablas  
  
  
 Tabla 5.3. Hemogramas completos de cada grupo al inicio de la experiencia, valores de referencia  
  
 y sus unidades 261  
 Tabla 5.4. Hemogramas completos al final de la experiencia de cada grupo de estudio, valores de  
 referencia y sus unidades 261  
  
 Tabla 5.5. Perfiles bioquímicos completos de cada grupo antes del estudio, valores de referencia y  
 sus unidades 262  
 Tabla 5.6. Perfiles bioquímicos completos de cada grupo al finalizar el estudio, valores de  
 referencia y sus unidades 262  
  
 CAPÍTULO VI: Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre 271  
 Figura 6.1. Mapa epidemiológico de la tuberculosis bovina en España, prevalencia por comarcas,  
 año 2019. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España. 274  
  
 Tabla 6.1. Resultados de la evaluación patológica y del estudio serológico de los dos grupos de  
 estudio en las temporadas previa y posterior a la suplementación 288  
 Tabla 6.2. Resultados por grupos de edad de la evaluación patológica y el estudio serológico del  
  
 grupo suplementado antes y después de la suplementación con el posbiótico 290  
  
BLOQUE III: Transferencia de tecnología y conocimiento científico 297  
  
 CAPÍTULO VII: Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica  
 301  
  
 Figura 7.2. Ejemplo de productos de la gama INGUBAL en las instalaciones de INGULADOS. 312  
  
  
  
  
  
 35 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 36:  
 ÍND | Figuras  
  
ÍNDICE DE FIGURAS  
  
  
  
  
  
REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO 54  
  
 Figura A. Funciones de la microbiota intestinal. Fuente: adaptado de Biocodex-Microbiota  
  
 Institute 60  
 Figura B. Árbol filogenético de la familia Lactobacillaceae. En el centro, los nuevos grupos  
 filogenéticos descritos se muestran con sus ramas del mismo color. Los anillos externos  
 proporcionan información sobre las características genómicas y el origen de las especies, incluido  
  
 el gradiente de color en rojo (contenido Guanina-Citosina) y los círculos representan el tamaño del  
 genoma. Fuente: Zheng et al., 2020. 66  
  
BLOQUE I: Experimentos de laboratorio in vitro 85  
  
 Capítulo I: Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes  
 que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para  
 antagonizar las micobacterias 89  
 Figura 1.1. Cribado de actividad antimicrobiana. La placa madre o placa primaria muestra las BAL  
  
 aisladas (A) y el ensayo de actividad frente a M. smegmatis muestra algunos aislados con actividad  
 antimicrobiana (halos de inhibición, B). 106  
 Figura 1.2. Localización geográfica de las 4 fincas de estudio (puntos), la prevalencia de lesiones  
  
 compatibles con TB se muestra al lado de cada punto y el perfil de BAL encontrado se indica  
 mediante una imagen de las bacterias predominantes. Las regiones coloreadas en el mapa  
 muestran la clasificación del riesgo de TB en fauna silvestre en las comarcas de España (Ministerio  
  
 de Agricultura, Pesca y Alimentación, datos de 2020). Todas las fincas muestreadas se encuentran  
 en zonas con alto riesgo de TB para la fauna silvestre, siendo el perfil predominante de  
 lactobacilos en los jabalíes que habitan en fincas con estado libre de la enfermedad. 108  
 Figura 1.3. Tinción de Gram y observación al microscopio de inmersión de las especies L.  
  
 plantarum (A), L. paracasei (B), P. acidilactici (C) y E. faecalis (D). 109  
 Figura 1.4. Las BAL aisladas de jabalíes libres de TB muestran una fuerte actividad  
 antimicobacteriana y sus genomas contienen genes que codifican bacteriocinas y una gran  
  
 variedad de metabolitos antimicrobianos secundarios. (A) Reducción en las unidades de  
 fluorescencia (FU) emitidas por M. bovis BCG en cocultivos con las BAL tras 48 h de incubación. La  
 reducción de la FU se calculó utilizando al menos 2 réplicas biológicas y fue normalizada con la FU  
 de M. bovis BCG en monocultivo. (B) Reducción en el recuento de colonias de M. bovis BCG en  
  
 monocultivo (izquierda) con respecto al cocultivo (derecha) con un aislado de lactobacilo. (C)  
 Clústeres de bacteriocinas de clase II identificadas en el genoma de los lactobacilos. La  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 36

Página 37:  
IND| Figuras  
  
  
 nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et al.,  
  
 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de  
 modificación postraduccional (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras  
 proteínas hipotéticas (gris). (D) Genes asociados con la producción y acumulación de H2O2 (verde y  
  
 naranja) y otros metabolitos secundarios como lactato, acetato, etanol y CO2 (azul) en los aislados.  
 Se muestra la proporción en la barra y el número de genes encontrados en blanco. 112  
 Figura 1.5. Recuentos bacterianos de los aislados de L. plantarum (A) y de L. salivarius y L.  
 paracasei (B) como monocultivos (barras negras) y cocultivos con BCG (barras grises) tras una  
  
 incubación de 0, 24 y 48 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). Los  
 recuentos bacterianos se expresan como log10 (CFU / mL) 114  
 Figura 1.6. Tasa de supervivencia de M. bovis BCG después de 48 horas (h) de incubación en  
  
 sobrenadantes ácidos (pH 4,5) libres de células obtenidos a partir de de monocultivos de  
 lactobacilos (izquierda) o cocultivos de M. bovis BCG con lactobacilos (derecha) en caldo MH con  
 OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia de M. bovis BCG para  
  
 ambas condiciones se calculó a partir de la expresión de GFP (FU, barras grises) y se comparó con  
 sus correspondientes controles (barras negras). Los controles se cultivaron con BCG en  
 sobrenadantes libres de células obtenidos de un caldo MH incubado durante 24 h con OADC  
 (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (lado izquierdo) y monocultivos de BCG de 24 h en caldo  
  
 MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (lado derecho), ambos a pH 4,5. Los datos  
 son media±DE con análisis estadístico (prueba t de Student, \*\*p <0,01, \*\*\*p<0.005, \*\*\*\*p<0.001)  
 y son representativos de 3 réplicas biológicas cada uno. 114  
  
 Figura 1.7. Tasa de supervivencia de M. bovis BCG después de 48 h de incubación en  
 sobrenadantes libres de células neutralizados (pH 7) obtenidos a partir de monocultivos de 24h de  
 L. plantarum C1, EML1 y SA3 (izquierda) o de co-cultivos de M. bovis BCG con las cepas de L.  
 plantarum (derecha) en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de  
  
 supervivencia de M. bovis BCG para ambas condiciones se monitorizó mediante la expresión de  
 GFP (FU, barras grises) y se comparó con sus controles correspondientes (barras negras), con o sin  
 suplementación de nutrientes. Los controles de M. bovis BCG se incubaron en sobrenadantes  
  
 libres de células obtenidos de caldo MH incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween 80 (0,1%)  
 y glicerol (0,2%) (izquierda) y monocultivos de M. bovis BCG incubados durante 24 h en caldo MH  
 con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (derecha), ambos a pH 7. Los datos se expresan  
  
 como media ± DE con análisis estadístico (prueba t de Student, \* p<0,05, \*\* p <0,01) y representan  
 3 réplicas biológicas cada uno. 116  
 (A) Tasa de supervivencia de M. bovis BCG tras 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de  
 monocultivos de L. plantarum C1, EML1, SA3 (izquierda) y cocultivos de M. bovis BCG con las  
  
 cepas de L. plantarum (derecha). (B) Tasa de supervivencia de M. bovis BCG después de 0, 24 y 48  
 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de L. plantarum (izquierda) y cocultivos de M.  
 bovis BCG con las cepas de L. plantarum (derecha) suplementados con caldo MH con OADC (10%),  
  
  
  
 37 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 38:  
 ÍND | Figuras  
  
  
Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una proporción de 1: 1. Los sobrenadantes de los controles  
  
también se suplementaron con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en la  
misma proporción. 116  
Figura 1.8. Tasa de supervivencia de M. bovis BCG después de 48 h de incubación en  
  
sobrenadantes libres de células neutralizados (pH 7) y obtenidos a partir de monocultivos de 24 h  
de L. salivarius C2, y C12 y L. paracasei SA5 (izquierda) o de cocultivos de M. bovis BCG con las  
cepas de L. salivarius C2, y C12 y L. paracasei SA5 en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y  
glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia de M. bovis BCG para ambas condiciones se monitorizó  
  
mediante la expresión de GFP (FU, barras grises claro para L. salivarius y gris oscuro para L.  
paracasei) y se comparó con sus controles correspondientes (barras negras), con o sin  
suplementación de nutrientes. Los controles de M. bovis BCG se incubaron en sobrenadantes  
  
libres de células obtenidos de caldo MH incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween 80 (0,1%)  
y glicerol (0,2%) (izquierda) y monocultivos de M. bovis BCG incubados durante 24 h en caldo MH  
con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (derecha), ambos a pH 7. Los datos se expresan  
  
como media±DE con análisis estadístico (prueba t de Student, \* p<0,05, \*\* p <0,01) y representan  
3 réplicas biológicas cada uno. 117  
(A) Tasa de supervivencia de M. bovis BCG tras 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de  
monocultivos de L. salivarius y L. paracasei (izquierda) y cocultivos de M. bovis BCG con las cepas  
  
de L. salivarius y L. paracasei (derecha). (B) Tasa de supervivencia de M. bovis BCG después de 0,  
24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de monocultivos de L. salivarius y L. paracasei  
(izquierda) y cocultivos de M. bovis BCG con las cepas de L. salivarius y L. paracasei (derecha)  
  
suplementados con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una  
proporción de 1: 1. Los sobrenadantes de los controles también se suplementaron con caldo MH  
con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en la misma proporción. 118  
Figura 1.9. Recuentos bacterianos de cultivos de cepas de L. plantarum C1, EML1 y SA3 y L.  
  
paracasei SA5 tras una incubación de 0 y 24 h en: (i) sobrenadantes obtenidos a partir de un  
cultivo de M. bovis BCG (barras negras); (ii) sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo de M.  
bovis BCG suplementado con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una  
  
proporción de 1: 1 (barras de color gris oscuro); y (iii) caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%)  
y glicerol (0,2%) (barras de color gris claro). Los recuentos bacterianos están expresados como  
log10 (CFU / mL). 119  
  
Figura 1.10. Clústeres de genes de bacteriocinas de clase II identificados en el genoma de las cepas  
de lactobacilos y nivel de expresión de genes que codifican los precursores de bacteriocinas en  
cultivos de lactobacilos expuestos a diferentes concentraciones crecientes de células M. bovis  
BCG. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et  
  
al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de  
modificación postraduccional (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras  
proteínas hipotéticas (gris). 121  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 38

Página 39:  
IND| Figuras  
  
  
 C1. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de L. plantarum C1 (en representación de todas las  
  
 cepas de L. plantarum) y el nivel de expresión de sus genes de la bacteriocina precursora  
 correspondiente plnE y plnF en cultivos expuestos a células de M. bovis BCG a 106 UFC / ml (barras  
 de color gris claro) y 107 UFC / mL (barras grises oscuro). 121  
  
 SA5. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de L. paracasei SA5 y el nivel de expresión de los  
 de la bacteriocina precursora correspondiente A y B en cultivos expuestos a células de M. bovis  
 BCG a 106 UFC / ml (barras de color gris claro) y 107 UFC / mL (barras grises oscuro). 121  
 C2. Clúster de la bacteriocina de péptido único de L. salivarius C2 y el nivel de expresión de los  
 genes de la bacteriocina precursora correspondiente Tay Tben cultivos expuestos a células de M.  
 bovis BCG a 106 UFC / ml (barras de color gris claro) y 107 UFC / mL (barras grises oscuro). 121  
  
 Figura 1.11. Los lactobacilos interactúan con las células sanguíneas porcinas, interfiriendo con la  
 fagocitosis de M. bovis BCG de una manera diferente según la especie. 123  
 (A) El gráfico SSC/FSC representa las áreas correspondientes a las células sanguíneas porcinas y el  
  
 gráfico SSC/GFP muestra sus áreas correspondientes en condiciones normales (mock) y cuando se  
 exponen a M. bovis BCG, L. salivarius C12, L. plantarum C1 y L. paracasei SA5. Las células  
 sanguíneas se indican en verde (linfocitos), naranja (monocitos) y rojo (polimorfonucleares). (B) El  
 gráfico SSC/GFP muestra la respuesta de las células sanguíneas porcinas a BCG-GFP solo (-) o en  
  
 combinación con L. salivarius C12, L. plantarum C1 y L. paracasei SA5. Las áreas SSC/FSC para cada  
 una de las condiciones se incluyen arriba y la intensidad GFP emitida por los fagocitos se indica en  
 el control de BCG-GFP: negativa (-), positiva (+) y muy positiva (++). (C) Porcentaje de fagocitos  
  
 que se unen a M. bovis BCG solos (barra negra) o en combinación con L. salivarius C12, L.  
 plantarum C1 y L. paracasei SA5 (barras grises). Los datos se expresan como media±DE con el  
 análisis estadístico de la prueba t de Student (\*\*\* p <0,001). (D) Porcentaje de fagocitos que  
 fagocitan M. bovis BCG solos (barra negra) o en combinación con L. salivarius C12, L. plantarum C1  
  
 y L. paracasei SA5 (barras grises). Los datos se expresan como media±DE con el análisis estadístico  
 de la prueba t de Student (\*\*\* p <0,001). 123  
  
 CAPÍTULO II: Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios de seguridad,  
  
 determinación in vitro de la acción antimicrobiana frente a patógenos y valoración de su capacidad  
 inmunomoduladora 133  
 Figura 2.1. Mecanismos de acción de las bacteriocinas de clase I, II, III. Fuente: (Tulini, 2014) 140  
  
 Figura 2.2. Interacción de las BAL con los macrófagos para la regulación de las rutas inmunitarias  
 de señalización NF-kB y IFN-I vía TLR. Adaptado de: (J. B. Li et al., 2013). 143  
 Figura 2.3. Mapa de calor que muestra la susceptibilidad de los aislados a los antibióticos que se  
 utilizan con frecuencia en medicina veterinaria y humana. La susceptibilidad se cuantificó  
  
 utilizando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI, µg/mL) y se representan como gradientes  
 de color. Las cepas que son reconocidas como resistentes por los estándares FEEDAP se indican  
 con una «R». La R redondeada indica concordancia entre la resistencia genotípica y fenotípica, con  
  
 los marcadores de genes de resistencia mostrados en cursiva. No se requiere la evaluación de  
  
  
 39 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 40:  
 ÍND | Figuras  
  
  
vancomicina (n.r.) para los lactobacilos y estreptomicina para L. plantarum, debido a su resistencia  
  
natural innata a estos antibióticos. 155  
Figura 2.4. Genes de resistencia antimicrobiana y marcadores genéticos de virulencia. Los aislados  
de lactobacilos y pediococos carecen de genes de resistencia y virulencia, a excepción de L.  
  
salivarius C2 que presenta genes para la resistencia a tetraciclinas; y los aislados de enterococos  
presentan numerosos marcadores genéticos de resistencias antimicrobianas y virulencia, en  
especial las dos cepas de E. faecalis. 156  
Figura 2.5. Árbol filogenético de los aislados de L. plantarum 158  
  
Figura 2.6. Árbol filogenético de los aislados de L. salivarius 159  
Figura 2.7. Árbol filogenético de los aislados de L. paracasei 160  
Figura 2.8. Árbol filogenético de los aislados de Pediococcus acidilactici 161  
  
  
Figura 2.9. Árbol filogenético de los aislados de E. faecalis 162  
Figura 2.10. Árbol filogenético de los aislados de E. casseliflavus 163  
  
Figura 2.11. E. faecalis inhibe E. coli y produce potencialmente bacteriocinas modificadas  
postraduccionalmente. (A) Reducción logarítmica de las ufc/ml de E. coli cuando se cocultiva con  
las BAL tras 24 h de incubación. La reducción logarítmica se calculó utilizando al menos 3 réplicas  
biológicas con respecto al monocultivo de E. coli. (B) Agar selectivo para enterobacterias (VRBG)  
  
que contiene el monocultivo de E. coli y un cocultivo con E. faecalis A1. (C) Clústeres de genes  
implicados en la biosíntesis de sactipéptidos y lantipéptidos, dos bacteriocinas modificadas  
postraduccionalmente que se encuentran en los aislados de E. faecalis A1 y R8 y E. casseliflavus  
  
R95. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et  
al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de  
modificación postraduccional (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras  
proteínas hipotéticas (gris). 164  
  
Figura 2.12. L. salivarius muestra actividad extracelular contra Pasteurella multocida y  
potencialmente secreta múltiples bacteriolisinas y bacteriocinas de clase II (A) Unidades  
Arbitrarias por mililitro (UA/mL) de los sobrenadantes obtenidos de los aislados frente a P.  
  
multocida serotipo B después de una incubación durante 24 h a 37 ºC. La UA / mL se define como  
el recíproco de la mayor dilución que muestra una clara inhibición del crecimiento del patógeno.  
(B) P. multocida en un ensayo de microdilución usando caldo Mueller Hinton. Inhibición del  
  
crecimiento después de la exposición con el sobrenadante de un cultivo de L. salivarius C2  
(derecha) con respecto al control (izquierda). 165  
Figura 2.13. P. acidilactici R91 muestra una clara actividad anti-listerial y potencialmente  
bacteriocinas de un solo péptido sin modificar compatible con pediocina. (A) Prueba de la gota o  
  
«spot-on-agar» de los cultivos de las BAL frente a Listeria monocytogenes. Los controles se  
muestran en la fila inferior: L. plantarum WCFS-1 (pH +, acidulante), P. acidilactici PA1.0  
(productor de pediocina, Ped), Lactococcus lactis NZ9700 (productor de nisina, Nis) y Lactococcus  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 40

Página 41:  
IND| Figuras  
  
  
 lactis NZ9800 (control negativo, pH-). (B) Grupo de genes implicados en la síntesis hipotética de  
  
 Pediocin PA-1 en Pediococcus acidilactici R91. La nomenclatura es la misma que la citada  
 anteriormente: las bacteriocinas precursoras (verde) y las proteínas de transporte / inmunidad  
 (rojo). 166  
  
 Figura 2.15. Los lactobacilos activan respuestas inmunitarias innatas protectoras en macrófagos y  
 poseen moléculas asociadas con la activación de TLR. La activación de las rutas NF-kB (A) e IFN-I  
 (B) se cuantificó en macrófagos THP-1 diferenciados con PMA expuestos a las BAL. La activación  
 de NF-κB / IRF se presenta con respecto al control y los datos representan al menos 3 réplicas  
  
 biológicas. (C) Los aislados se distribuyen de manera diferente según su capacidad para activar las  
 vías NF-κB / IFN-I. Las especies L. plantarum y L. paracasei desencadenan respuestas significativas  
 de IRF, mientras que las cepas de L. salivarius inducen la activación de NF-κB. (D) Los aislados  
  
 poseen genes asociados con receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como TLR y NOD,  
 que incluyen fimbria / pili, componentes de la pared celular y agonistas de TLR2. 169  
  
 CAPÍTULO III: Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la  
  
 actividad y estudios de sinergia con antibióticos 181  
 Figura 3.1. Curvas de concentración bacteriana en función del tiempo de fermentación para L.  
 plantarum EML1 (círculos), L. casei SA5 (cuadrados) y L. salivarius C12 (triángulos). Los puntos  
 marcados con estrellas muestran la actividad antimicrobiana máxima, que se detecta al final de la  
  
 fase exponencial para EML1 y en la fase estacionaria para SA5 y C12. 195  
 Figura 3.4. Técnica E-test para el patógeno E. coli multirresistente en combinación con el  
 sobrenadante de la bacteria ácido-láctica L. salivarius C12. (A) Se observa un crecimiento total del  
  
 patógeno pese a la colocación de las tiras con antibióticos (>256 µg/mL) y (B) la aparición de  
 inhibición del cultivo al añadir el sobrenadante de la bacteria C12, con diferentes puntos de corte  
 para los diferentes antibióticos. 199  
 Figura 3.5. Técnica E-test para el patógeno P. multocida resistente a tetraciclinas y el  
  
 antimicrobiano doxiciclina en combinación con el sobrenadante de la bacteria ácido-láctica L.  
 salivarius C12. Se observa una disminución en el punto de corte equivalente a la CMI de 4 µg/mL  
 en el control (A) a 1 µg/mL al añadir el sobrenadante al 10 % (B). 199  
  
Bloque 2: Experimentación ANIMAL in vivo 207  
  
 CAPÍTULO IV: Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una  
 neumonía experimental en modelo ratón 211  
  
 Figura 4.1. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en los diferentes grupos del estudio. (A) En la  
 fase previa se detectaron diferencias estadísticamente significativas (test del logaritmo del rango,  
 P<0,0001) en la supervivencia de los animales infectados (triángulos) con respecto a los animales  
 que no fueron infectados (círculos y cuadrados, superpuestos), incluidos los que recibieron el  
  
 suplemento. (B) En la fase 1 se infectó a los animales con la DL50 y, tanto en el grupo control sin  
 tratamiento (círculos) como en el grupo suplemento (triángulos) no se observaron diferencias en  
  
  
 41 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 42:  
 ÍND | Figuras  
  
  
 la supervivencia de los animales, que fue del 50 %. El grupo antibiótico (cuadrados) tuvo una  
  
 supervivencia del 100 pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (test del  
 logaritmo del rango, P<0,78). (C) En la fase 2 se infectó a los animales con la DL100, que provocó  
 una mortalidad del 100 % en el grupo control (círculos), antibiótico (cuadrados) y suplemento  
  
 (triángulos). Sin embargo, se registró una supervivencia del 33,33 % en el grupo que fue tratado  
 con antibióticos en combinación con el suplemento (test del logaritmo del rango, p<0,05). 228  
 Figura 4.2. Síntomas y signos compatibles con la infección experimental por Pasteurella multocida  
 en modelo ratón. (Ai) Pelos erizados y exudado ocular no hemorrágico, más leve y (Aii)  
  
 hemorrágico, más grave. (B) Hallazgo de adherencias en cavidad torácica durante la necropsia. (Ci)  
 Pulmón con lesiones neumónicas compatibles con la infección y (Cii) pulmón aparentemente sano,  
 sin lesiones macroscópicas. 229  
  
CAPÍTULO V: Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los  
parámetros productivos en ganadería 235  
 Figura 5.1. Resumen del contexto de la necesidad de búsqueda de alternativas 238  
  
 Tabla 5.1. Diseño de los grupos de estudio 246  
 Figura 5.3. Detalle de los grupos de estudio en el cebadero 245  
 Figura 5.4. Báscula de pesaje electrónica en el cebadero 249  
 Figura 5.6. Distintos tipos de lesiones neumónicas encontradas durante el análisis macroscópico  
  
 realizado tras el sacrificio de los animales en el matadero. 256  
 Figura 5.7. Mejora en los indicadores sanitarios en el grupo suplementado con el posbiótico. (A) El  
 grupo control muestra mayor porcentaje de pulmones con lesiones neumónicas y (B) el grupo  
  
 control presenta lesiones más extensas, esto es, de mayor gravedad, que el grupo suplementado.  
 Los resultados se expresan en porcentaje de media y el error estándar de esta. (C) Mayor  
 porcentaje de decomisos en el grupo suplementado. (D) El patógeno Pasteurella spp. fue el  
 aislamiento predominante en los pulmones con lesiones neumónicas del grupo control, a  
  
 diferencia del grupo suplementado. 257  
 Figura 5.8. Mejora en los parámetros productivos del grupo suplementado. Los datos se expresan  
 como media y error estándar de la media. (Ai) El grupo suplementado partía de una media de  
  
 pesos menor antes del inicio de la experiencia (P=0,004) y (Aii) alcanzó el mismo peso final que el  
 grupo control al final del cebo (P=0,996) (B) El ritmo de crecimiento, expresado en Ganancia  
 Media Diaria (GMD, g), fue superior en el grupo suplementado (GMD en el primer periodo  
  
 P=0,0975, GMD total P=0,236). (C) El índice de conversión fue inferior en el grupo suplementado.  
 259  
  
CAPÍTULO VI: Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre 271  
 Figura 6.2. Categorización administrativa de las explotaciones y los terrenos cinegéticos. Fuente:  
  
 Guía de Aplicación para el sector cinegético del Real Decreto 138/2020, por el que se establece la  
 normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como  
 reservorio de la tuberculosis. 276  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 42

Página 43:  
IND| Figuras  
  
  
 Figura 6.3. Localización geográfica de las 20 fincas incluidas en el estudio 281  
  
 Figura 6.4. Animal adulto junto a varios animales jóvenes (rayones) 289  
  
BLOQUE III: Transferencia de tecnología y conocimiento científico 297  
  
 CAPÍTULO VII: Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica  
  
 301  
 Figura 7.1. Diagrama de flujo de los procesos del Departamento de Desarrollo de Productos 311  
  
  
  
  
  
 43 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 44:  
 AGR | Agradecimientos  
  
  
  
  
  
RESUMEN / ABSTRACT  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 44

Página 45:  
RES | ES  
  
  
  
  
  
 45 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 46:  
 RES | ES  
  
RESUMEN  
  
  
La compleja interacción entre la microbiota y su hospedador constituye un modelo de  
  
estudio que puede ser replicado para el desarrollo lo de nuevas herramientas que  
contribuyan al control de determinadas enfermedades. Los animales silvestres tienen  
  
una microbiota que destaca por ser más diversa y funcional y esta es, por tanto, una  
fuente de microorganismos beneficiosos que pueden ser explotados industrialmente  
  
para la obtención de compuestos bioactivos. La microbiota de los animales silvestres  
resistentes de forma natural al desarrollo de ciertas enfermedades podría servir, por  
  
tanto, como alternativa innovadora para el control de esas afecciones en otros animales  
más susceptibles. Las bacterias ácido-lácticas que forman parte de la microbiota  
  
favorecen los mecanismos de defensa del hospedador debido, fundamentalmente, a sus  
  
propiedades para producir moléculas antimicrobianas y a su capacidad de interacción  
con el sistema inmunitario. Gracias a sus aplicaciones tecnológicas, se utilizan desde  
  
hace décadas en formulaciones como los probióticos o los posbióticos, que han  
demostrado aportar numerosos beneficios para la salud de los animales en los que son  
  
utilizadas. Los posbióticos son unos productos innovadores, recientemente definidos y  
aceptados por la comunidad científica, que contienen los subproductos metabólicos  
  
bioactivos, así como los componentes estructurales bacterianos en una preparación  
final obtenida a partir de la fermentación microbiana controlada.  
  
En esta tesis doctoral se describen los procedimientos de aislamiento y caracterización  
  
de bacterias con propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras de la microbiota  
de jabalíes, así como los criterios de selección de candidatas a ser utilizadas para el  
  
diseño de un pienso funcional. Asimismo, la gran novedad de esta tesis de Doctorado  
  
Industrial supone culminar con su investigación aplicada mediante la elaboración de un  
producto posbiótico que incluye diversos estudios de validación en condiciones  
  
experimentales y su ratificación en situaciones reales en sanidad animal, tanto en fauna  
salvaje como en animales destinados a producción.  
  
Se encontró un perfil predominante de lactobacilos en poblaciones de jabalíes libres de  
  
tuberculosis, pese a estar localizadas en zonas catalogadas como de alto riesgo de esta  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 46

Página 47:  
RES | ES  
  
enfermedad, que es una de las más importantes que afectan a la cabaña ganadera y a la  
  
fauna silvestre. Las características antagonistas de las bacterias ácido-lácticas (BAL)  
aisladas en estos animales frente a Mycobacterium bovis, el agente causal de la  
  
tuberculosis, parecen indicar que la microbiota juega un papel fundamental en la  
protección del hospedador frente al desarrollo de la patología. Todas las bacterias  
  
aisladas de este grupo de fincas, con la situación sanitaria excepcional descrita, se  
consideran seguras para su utilización en diferentes fórmulas y muestran proximidad  
  
filogenética con cepas de diverso origen, muchas de ellas utilizadas en productos  
comerciales. Además, poseen moléculas que pueden actuar como inmunomoduladoras  
  
activando rutas inmunitarias como la NF-kB o la ruta del interferón (IFN). Por el  
  
contrario, se encontró un perfil totalmente diferente en las fincas con alta prevalencia  
de tuberculosis, con abundancia de enterococos relacionados filogenéticamente con  
  
cepas patógenas y que además contienen en el genoma varios genes de resistencia  
antimicrobiana y determinantes de virulencia. Estos enterococos no mostraron un perfil  
  
inhibitorio frente M. bovis, pero sí frente a E. coli, y poseen genes que codifican para la  
producción de metabolitos antimicrobianos, incluidos las bacteriocinas, pero no  
  
parecen interaccionar con ninguna de las rutas inmunitarias estudiadas. Los pediococos  
fueron encontrados en ambos grupos de estudio y mostraron un gran potencial  
  
beneficioso, en especial un aislado de P. acidilactici productor de pediocina que muestra  
  
una actividad antimicrobiana muy potente frente a Listeria monocytogenes.  
  
  
Los lactobacilos que mayor potencial beneficioso mostraron se estudiaron en mayor  
profundidad para optimizar la producción de metabolitos antimicrobianos con potencial  
  
inhibitorio frente a varios patógenos de importancia veterinaria. La fracción molecular  
que mayor influencia tiene sobre la actividad detectada fueron de origen proteico,  
  
incluidas las bacteriocinas de diferentes clases que, en ocasiones, actúan de forma  
sinérgica entre ellas y con antimicrobianos de diversas familias. De hecho, el primer  
  
modelo experimental propuesto en esta tesis doctoral consistió en una infección por  
  
Pasteurella multocida en modelo ratón, seguido de la administración de un suplemento  
elaborado a partir de los metabolitos, producidos por una bacteria con actividad frente  
  
a este patógeno, y el antibiótico doxiciclina, que mostraron sinergia funcional en los  
estudios in vitro. El suplemento elaborado mejoró la supervivencia de los ratones  
  
  
 47 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 48:  
 RES | ES  
  
infectados con la dosis letal absoluta cuando se utilizó una terapia combinada con  
  
doxiciclina, en comparación con los ratones que únicamente recibieron el antibiótico o  
el suplemento.  
  
  
A partir de la caracterización microbiana y de la información obtenida de las etapas  
  
anteriores, se llevó a cabo una etapa final que consistió en la elaboración de sendos  
productos posbióticos específicamente diseñados para la mejora de los indicadores  
  
sanitarios y productivos en ganadería y para el control de la tuberculosis en fauna  
salvaje. El primer producto posbiótico mejoró la prevalencia y gravedad de las lesiones  
  
neumónicas y se asoció a un mayor ritmo de crecimiento de los animales, lo que se  
  
tradujo en una mejor eficiencia alimentaria en corderos en cebo cuyo principal problema  
sanitario consiste en la patología producida por Pasteurella multocida. El segundo  
  
producto posbiótico se asoció a una disminución en la incidencia de tuberculosis, así  
como en la presencia de lesiones compatibles con esta enfermedad y en la  
  
seroprevalencia de anticuerpos frente a M. bovis, agente causal de la misma, en  
poblaciones de jabalíes expuestos de forma natural a la infección. Por tanto, la  
  
utilización de posbióticos en ganadería constituye una herramienta innovadora para  
limitar la administración de antimicrobianos a situaciones terapéuticas, satisfaciendo el  
  
incremento en la demanda de productos de origen animal. Por otro lado, la  
  
administración de posbióticos puede ser considerada como una estrategia factible para  
el control de la tuberculosis e introducirse como herramienta complementaria en los  
  
programas de erradicación de la enfermedad a gran escala.  
  
  
El método desarrollado en esta tesis de Doctorado Industrial ha tenido un impacto  
significativo sobre la actividad de la empresa INGULADOS, que ha visto incrementada su  
  
competitividad en el sector, debido a que el lanzamiento de una gama de productos  
posbióticos ha favorecido la creación de una nueva línea de trabajo y un nuevo perfil  
  
laboral. Además de las publicaciones científicas generadas y su difusión, la transferencia  
  
tecnológica se ha materializado en la solicitud de dos patentes de invención. Los  
estudios de esta tesis doctoral han incrementado el conocimiento disponible sobre la  
  
interacción entre el hospedador y su microbiota y arroja grandes prospectivas de futuro  
a la utilización de elementos innovadores en Sanidad y Producción Animal.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 48

Página 50:  
 RES | ENG  
  
  
ABSTRACT  
  
  
The crosstalk between the microbiota and its host represents a study model that can be  
  
replicated for the development of novel tools to control certain diseases. Wild animals  
harbor a microbiota that overhangs for the greater diversity and functionality. Hence, it  
  
is presented as a source of beneficial microorganisms that can be industrially exploited  
  
to obtain bioactive compounds. The microbiota of animals being naturally resistant to  
the development of certain diseases could therefore serve as an innovative alternative  
  
for its control in susceptible animals. The lactic acid bacteria from of the microbiota  
favor the defense mechanisms of the host, mainly due to their properties to produce  
  
antimicrobial molecules and their ability to interact with the immune system. Due to  
their technological applications, they have been used for decades in formulations such  
  
as probiotics or postbiotics, which have demonstrated to provide numerous benefits for  
the health of the animals in which they are used. Postbiotics are innovative products,  
  
recently defined and accepted by the scientific community, which contain bioactive  
  
metabolic by-products, as well as bacterial structural components in a final preparation  
obtained from controlled microbial fermentation.  
  
This doctoral thesis describes the procedures for the isolation and characterization of  
  
bacteria with antimicrobial and immunomodulatory properties from wild boar  
microbiota, as well as the criteria for selecting candidates to be used for the design of a  
  
functional feed. Similarly, the great novelty of this Industrial Doctorate thesis supposes  
concluding with its applied research through the elaboration of a postbiotic product.  
  
The development of the postbiotic includes several validation studies under  
experimental conditions and its ratification in real situations in animal health, both in  
  
wildlife and livestock.  
  
  
A predominant profile of lactobacilli was found in populations of tuberculosis (TB) free  
  
wild boar, despite living in areas classified as high risk for this disease, which is one of  
the most important affecting both livestock and wildlife. The antagonistic characteristics  
  
of lactic acid bacteria (LAB) isolated in these animals against Mycobacterium bovis, the  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 50

Página 51:  
RES | ENG  
  
causative agent of TB, seem to indicate that the microbiota plays an essential role in the  
  
protection against the development of the disease. All bacteria isolated from the group  
with this exceptional health status, are considered safe for its use in different formulas  
  
and show phylogenetic proximity with strains of diverse origin, including strains used in  
commercial products. In addition, the isolates harbor immunomodulatory molecules  
  
activating immune pathways such as NF-kB or the interferon pathway (IFN). On the  
contrary, a totally different profile was found in populations with a high prevalence of  
  
TB, with an abundance of enterococci closely related to pathogenic strains and  
containing several genes for antimicrobial resistance and virulence determinants within  
  
their genomes. These enterococci did not show an inhibitory profile against M. bovis,  
  
but they did against E. coli, and they possess genes encoding for the production of  
antimicrobial metabolites, including bacteriocins. However, these isolates do not seem  
  
to interact with any of the immune pathways studied. Pediococci were found in both  
study groups and showed great beneficial potential, especially a pediocin-producing P.  
  
acidilactici isolate showing a very strong antimicrobial activity against Listeria  
monocytogenes.  
  
  
The lactobacilli that showed the greatest beneficial potential were deeply investigated  
  
to optimize the production of antimicrobial metabolites with inhibitory potential against  
  
various pathogens of veterinary importance. The molecular fraction that has the  
greatest influence on the activity detected were of protein origin, including bacteriocins  
  
of different classes that occasionally act synergistically with each other and with  
antimicrobials. In fact, the first experimental model proposed in this doctoral thesis is  
  
an infection by Pasteurella multocida in a mouse model, followed by the administration  
of a supplement produced from microbial metabolites with in vitro activity against this  
  
pathogen, and the doxycycline. The supplement improved the survival of mice infected  
with the absolute lethal dose when combined with doxycycline, compared to mice that  
  
received only the antibiotic or the supplement.  
  
  
Based on the microbial characterization and the information obtained from the previous  
  
phases, a final stage was carried out with the elaboration of two postbiotics. Both  
products were specifically designed for the improvement of the sanitary and productive

Página 52:  
 RES | ENG  
  
indicators in livestock and for the control of TB in wildlife, respectively. The first  
  
postbiotic product improved the prevalence and severity of pneumonic lesions in  
fattening lambs whose main health problem is the pathology produced by Pasteurella  
  
multocida. The postbiotic supplementation was also associated with a higher growth  
rate of the animals translating to better feed efficiency. The second postbiotic product  
  
was associated with a decrease in the incidence of tuberculosis, along with a reduction  
in the presence of lesions compatible with this disease and in the seroprevalence of  
  
antibodies against M. bovis in naturally exposed wild boar. Therefore, the use of  
postbiotics in livestock is presented as an innovative tool to limit the administration of  
  
antimicrobials to therapeutic situations, satisfying the increased demand for products  
  
of animal origin. On the other hand, the administration of postbiotics can be considered  
as a feasible strategy for the control of TB and can be introduced as a complementary  
  
tool in large-scale eradication programs of the disease.  
  
  
The method developed in this Industrial Doctorate thesis has had a significant impact on  
the activity of INGULADOS. The company has increased its competitiveness within its  
  
sector, since the launch of a range of postbiotic products has favored the creation of a  
new line of work and a new job profile. In addition to the scientific publications  
  
generated and their communication, technology transfer has resulted in the application  
  
for two invention patents. The studies of this doctoral thesis have increased the  
available knowledge on the interaction between the host and its microbiota and show  
  
great future prospects for the use of innovative elements in Animal Health and  
Production.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 52

Página 53:  
RES | ENG

Página 54:  
 RES | ENG  
  
  
  
REVISIÓN DE ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 54

Página 58:  
 REV | Antecedentes y marco teórico  
  
Importancia de la microbiota en los hospedadores  
  
  
La «microbiota» es un complejo ecosistema formado por todos los microorganismos que  
  
residen de forma habitual en un organismo superior, denominado «hospedador». Este  
conjunto de microorganismos coloniza los tejidos sanos de los hospedadores,  
  
especialmente aquellas superficies que están más expuestas al medioambiente como la  
  
piel, las cavidades oral y nasofaríngea, el tracto genitourinario y a lo largo de todo el  
tracto gastrointestinal, que es la microbiota más extensa y también la más estudiada  
  
(Karczewski et al., 2014; Schwiertz y Rusch, 2016). Además, también se ha comprobado  
que existe una población microbiana en el tracto respiratorio, incluidos los pulmones, y  
  
en otras partes del cuerpo que se consideraban hasta hace muy poco estériles, como la  
placenta de los mamíferos (Pelzer et al., 2017; Schwiertz y Rusch, 2016). La microbiota  
  
puede ser autóctona, cuando reside de forma permanente en el hospedador y establece  
con él una relación de simbiosis, contribuyendo de forma esencial al desarrollo de  
  
funciones importantes para el mismo; o alóctona, cuando solo está presente de forma  
  
transitoria en un momento concreto de la vida del animal y puede o no establecer una  
relación de simbiosis con él (Nava y Stappenbeck, 2011). Hablando estrictamente, la  
  
microbiota es el conjunto de los taxones microbiológicos, mientras que al conjunto del  
material genético que alberga se le conoce con el término «microbioma» (Mohajeri et  
  
al., 2018).  
  
  
La microbiota está compuesta principalmente por bacterias y, en una menor proporción,  
por arqueas, virus y por eucariotas como los hongos, las levaduras y los nematodos  
  
(Kapitan et al., 2018; Schwiertz y Rusch, 2016). Es complicado establecer unas líneas  
  
generales en relación a la composición de la microbiota por taxones, puesto que son  
muchos los factores que afectan a la distribución de las poblaciones microbianas en los  
  
animales: la predisposición genética, la edad, la alimentación, el hábitat, los factores  
relacionados con el estrés, el consumo de determinados medicamentos (Bahrndorff et  
  
al., 2016; Correa-Fiz et al., 2019; Qin et al., 2020)… De esta manera, la microbiota difiere  
entre las especies animales debido a las diferencias existentes en los procesos  
  
metabólicos y fisiológicos. Las poblaciones microbianas se encuentran distribuidas en  
nichos altamente especializados para la realización de funciones determinadas dentro  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 58

Página 59:  
REV | Antecedentes y marco teórico  
  
de los órganos y sistemas (Huttenhower et al., 2012; Nava y Stappenbeck, 2011). Así,  
  
podemos encontrar una población microbiana muy diversa en el tracto gastrointestinal,  
que se encuentra distribuida de forma estratégica a lo largo del mismo (Nava y  
  
Stappenbeck, 2011) y que es muy diferente en animales rumiantes y monogástricos  
(O’Donnell et al., 2017); y una microbiota mucho menos diversa en el tracto urogenital,  
  
porque sus funciones son más limitadas, aunque no por ello son menos importantes  
(Huttenhower et al., 2012; Thomas-White et al., 2018). La primera colonización  
  
microbiana en el caso de los mamíferos se produce principalmente a través del canal del  
parto de la madre y de la leche materna pero recientemente se han descrito algunos  
  
estudios que podrían evidenciar que esa primera colonización podría tener lugar  
  
previamente, a través de la placenta, que hasta hace muy poco se consideraba estéril  
(Pelzer et al., 2017; Schwiertz y Rusch, 2016). La microbiota en los animales comienza a  
  
desarrollarse tras el nacimiento, o antes de él, y va evolucionando durante las primeras  
etapas de su vida hasta establecerse en su hospedador (Karczewski et al., 2014).  
  
  
Los factores que pueden influir en el establecimiento de las diferentes poblaciones  
  
microbianas son muchos y muy diversos, algunos todavía desconocidos, e incluyen la  
edad, factores asociados al estrés como factores ambientales, la alimentación, la  
  
localización geográfica… (Bahrndorff et al., 2016; Karczewski et al., 2014). Las diferencias  
  
interindividuales han sido más estudiadas en la especie humana, están relacionadas con  
predisposiciones genéticas y pueden condicionar al padecimiento de determinadas  
  
enfermedades (Ahern y Maloy, 2020; Karczewski et al., 2014).  
  
  
  
Funciones de la microbiota como parte de la relación simbiótica con su hospedador  
  
Las poblaciones de microorganismos que forman parte de la microbiota han  
coevolucionado con sus hospedadores hasta establecerse como parte de los mismos  
  
mediante un largo proceso de selección natural (Moya et al., 2008). El proceso dinámico  
de coevolución ha supuesto un gran impacto en la evolución animal, gracias a que los  
  
microorganismos han establecido con el organismo superior una relación de simbiosis  
  
(Bahrndorff et al., 2016; Moya et al., 2008), participando en el desarrollo de numerosos  
procesos fisiológicos. Este tipo de asociación simbiótica se produce en la naturaleza  
  
  
 59 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 60:  
 REV | Antecedentes y marco teórico  
  
cuando dos organismos o grupos de organismos se benefician el uno del otro, lo que se  
  
conoce como «mutualismo»; o cuando solo uno de ellos recibe el beneficio, sin  
ocasionar ningún perjuicio al otro, que recibe el nombre de «comensalismo». Además,  
  
en función de la localización del microorganismo en el hospedador, se puede distinguir  
entre «ectosimbiosis», cuando están alojados en la superficie de algunos órganos o  
  
mucosas; y «endosimbiosis», cuando residen dentro de células eucariotas especializadas  
y han coevolucionado con el hospedador contribuyendo al mantenimiento de funciones  
  
de una importancia vital para el mismo (Moya et al., 2008).  
  
  
Por todo esto, las funciones que desempeñan las diferentes microbiotas en los  
  
hospedadores son importantes para el correcto funcionamiento de sus aparatos y  
sistemas y son, por tanto, esenciales para garantizar un buen estado de salud. La  
  
microbiota más ampliamente estudiada y que aporta mayores funciones para el  
organismo superior es la microbiota que reside en el aparato digestivo (Figura A) y, en  
  
concreto, las poblaciones bacterianas que forman parte de la microbiota intestinal  
(Ahern y Maloy, 2020; Alam y Neish, 2018; Kim et al., 2017).  
  
  
  
  
  
 Figura A. Funciones de la microbiota intestinal. Fuente: adaptado de Biocodex-Microbiota Institute  
  
  
La microbiota gastrointestinal participa activamente en los procesos metabólicos. Por  
  
un lado, favorece la digestión de los alimentos llevando a cabo procesos de  
fermentación de fibras solubles, como celulosas o pectinas y otros hidratos de carbono  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 60

Página 61:  
REV | Antecedentes y marco teórico  
  
complejos, como los almidones, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC)  
  
como acetato, propionato o butirato, que sirven como fuente de energía para las células  
epiteliales intestinales (Lee y Hase, 2014; Rowland et al., 2018). Este proceso se hace  
  
mucho más patente en rumiantes, puesto que la base de su metabolismo en el rumen  
se fundamenta en la obtención de energía en forma de AGCC a partir de la degradación  
  
de la celulosa de las plantas por parte de la microbiota ruminal (Hooper et al., 2002). La  
función metabólica también incluye la síntesis de vitaminas, especialmente la vitamina  
  
K y algunas vitaminas del grupo B, incluida la biotina, la cobalamina, el folato, la tiamina  
y la riboflavina, entre otras (Hooper et al., 2002; Lee y Hase, 2014; Rowland et al., 2018).  
  
Algunos estudios ponen de manifiesto que la microbiota podría tener un papel  
  
importante en los procesos de degradación de proteínas y en la obtención de péptidos  
y aminoácidos (Hooper et al., 2002; Rowland et al., 2018). En rumiantes es  
  
especialmente importante destacar la síntesis de proteína microbiana que tiene lugar  
en el rumen como parte de un complejo proceso de aprovechamiento del nitrógeno no  
  
proteico (Hooper et al., 2002).  
  
  
La microbiota tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la función de  
barrera intestinal. Por un lado, favoreciendo los procesos de proliferación y  
  
diferenciación de las células epiteliales (Ahern y Maloy, 2020; Alam y Neish, 2018), que  
  
se renuevan continuamente contribuyendo a la homeostasis del epitelio intestinal, y  
también mediante la producción de moco en la capa mucosa que tapiza todo el tracto  
  
gastrointestinal (Alam y Neish, 2018; Schroeder, 2019). Además, la microbiota intestinal  
estabiliza la permeabilidad selectiva del epitelio intestinal, por un lado, contribuyendo a  
  
la absorción de nutrientes como vitaminas y minerales al permitir su paso a través de la  
membrana y, por otro, contribuyendo a su función de barrera que impide el paso de  
  
microorganismos patógenos y sus toxinas así como otras sustancias nocivas (Ahern y  
Maloy, 2020; Alam y Neish, 2018).  
  
  
Por último, la microbiota intestinal tiene una importante función de defensa debido al  
papel de estos microorganismos simbiontes sobre la maduración del sistema  
  
inmunitario, que se produce fundamentalmente de forma local en el intestino (Ahern y  
Maloy, 2020). Además, la microbiota también influye en el desarrollo de los diferentes  
  
  
 61 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 62:  
 REV | Antecedentes y marco teórico  
  
tipos de respuesta inmunitaria, no solo a nivel local, sino también de forma sistémica,  
  
mediante procesos complejos en los que participan otras microbiotas del organismo y  
células inmunitarias (Chen et al., 2018; Unger y Bogaert, 2017). Tanto las células del  
  
sistema inmunitario innato como las del sistema inmunitario adquirido, se ven  
moduladas por la microbiota del tracto intestinal mediante sistemas de comunicación  
  
que se basan en la secreción de microvesículas y AGCC. La microbiota intestinal modula  
la respuesta inmunitaria, contribuyendo a que esta sea más rápida y eficaz y también  
  
mantiene el equilibrio entre señales de inflamación y regulación (Ahern y Maloy, 2020;  
Alam y Neish, 2018).  
  
  
Además, las poblaciones bacterianas residentes en las diferentes superficies, confieren  
resistencia a la colonización por agentes patógenos y oportunistas, puesto que  
  
comparten con ellos los receptores de mucosa, compiten por los nutrientes del nicho  
que ocupan y además algunas especies tienen la capacidad de producir sustancias  
  
antimicrobianas (Buffie y Pamer, 2013; Litvak y Bäumler, 2019; Sorbara y Pamer, 2019).  
Estos mecanismos, que confieren protección frente al desarrollo de diversas  
  
enfermedades infecciosas, han sido estudiados especialmente en la microbiota  
intestinal (Buffie y Pamer, 2013; Ducarmon et al., 2019; Kim et al., 2017) y en la  
  
microbiota de la piel (Chen et al., 2018; Litvak y Bäumler, 2019). Además, estos  
  
mecanismos de defensa ante infecciones, junto a la proliferación de células inmunitarias  
y maduración del tejido linfoide asociado a los bronquios, parecen ser las funciones  
  
principales de protección que ejerce la microbiota respiratoria (Unger y Bogaert, 2017;  
Yatera et al., 2018).  
  
  
  
  
La asociación simbiótica entre los microorganismos, fundamentalmente bacterianos, y  
el hospedador, es muy importante para el desarrollo correcto de todas las funciones de  
  
los aparatos y sistemas de los animales, para lo cual se considera primordial el  
  
mantenimiento de una microbiota sana y equilibrada en los organismos superiores.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 62

Página 63:  
REV | Antecedentes y marco teórico  
  
La microbiota de la fauna silvestre  
  
  
Una vez descritas las funciones principales de la microbiota en los procesos fisiológicos  
  
animales, el papel que desempeñan las poblaciones microbianas en la fauna silvestre  
merece especial atención. En los animales que viven en libertad, la asociación entre la  
  
microbiota intestinal y su hospedador tiene una gran importancia biológica para la  
  
supervivencia y conservación de las especies, ya que influye en la capacidad de  
adaptación de los animales al ecosistema en el que habitan (Bahrndorff et al., 2016; Gao  
  
et al., 2020; Qin et al., 2020). La microbiota y sus genes asociados, el microbioma,  
confieren adaptabilidad a determinadas variaciones en la alimentación y el  
  
metabolismo, incluso a lo largo de las diferentes estaciones del año (Gao et al., 2020;  
Qin et al., 2020; Sun et al., 2016); favorecen la tolerancia a perturbaciones  
  
medioambientales (Bahrndorff et al., 2016) y también confieren resistencia a  
determinadas enfermedades (Correa-Fiz et al., 2019; Gazzaniga y Kasper, 2018).  
  
  
Se ha demostrado mediante diversos estudios que los animales silvestres muestran una  
microbiota intestinal diferente, más diversa y abundante, que la de las mismas especies  
  
criadas en cautividad y la de sus homólogos domésticos (Correa-Fiz et al., 2019; Gao et  
al., 2020; Gibson et al., 2019; Prabhu et al., 2020; Qin et al., 2020; Ushida et al., 2016).  
  
Algunos estudios han puesto de manifiesto que la microbiota de los animales silvestres  
destaca por la mayor funcionalidad de sus poblaciones bacterianas, especialmente  
  
relacionadas con la activación de rutas metabólicas y del sistema inmunitario (Gao et  
al., 2020; Gibson et al., 2019; Prabhu et al., 2020). Los factores que contribuyen a la  
  
heterogeneidad de la microbiota intestinal en los animales salvajes son  
  
fundamentalmente las diferencias en la alimentación (Correa-Fiz et al., 2019; Prabhu et  
al., 2020; Qin et al., 2020; Ushida et al., 2016), las condiciones ambientales (Gao et al.,  
  
2020; Prabhu et al., 2020), el genotipo del hospedador salvaje (Qin et al., 2020; Ushida  
et al., 2016), los diferentes requerimientos metabólicos (Gao et al., 2020; Gibson et al.,  
  
2019; Qin et al., 2020; Sun et al., 2016) y los factores asociados a la domesticación, que  
ha tenido un gran impacto negativo sobre la microbiota de algunas especies (Prabhu et  
  
al., 2020; Ushida et al., 2016).  
  
  
  
 63 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 64:  
 REV | Antecedentes y marco teórico  
  
La mayor diversidad y abundancia de la microbiota en la fauna silvestre puede tener  
  
importantes implicaciones para el manejo de los animales, tanto salvajes como  
domésticos. Es importante tener en cuenta estas diferencias en los programas de  
  
reintroducción de animales criados en cautividad, como especies en peligro de  
extinción, en la que una microbiota menos diversa podría dificultar su adaptación a las  
  
condiciones de vida libre y disminuir la probabilidad de supervivencia (Bahrndorff et al.,  
2016; Gibson et al., 2019; Qin et al., 2020). Debido a que se han descrito grupos  
  
bacterianos que podrían ser los responsables de la resistencia de algunos animales  
silvestres a determinadas enfermedades que afectan al ganado doméstico, la fauna  
  
salvaje podría ser una fuente de microorganismos potencialmente beneficiosos para  
  
modular la microbiota de los animales más susceptibles a esas enfermedades  
(Bahrndorff et al., 2016; Correa-Fiz et al., 2019).  
  
  
En este sentido, se considera que los suidos pueden ser un buen modelo de estudios  
  
comparativos de la microbiota, debido a que el jabalí (Sus scrofa), ancestro del cerdo  
doméstico (Sus scrofa domesticus), y otros suidos próximos a él filogenéticamente,  
  
como el facóquero común (Phacochoerus africanus) o potamoquero rojo  
(Potamochoerus porcus), viven en la actualidad en condiciones de vida salvaje (Correa-  
  
Fiz et al., 2019; Ushida et al., 2016). El jabalí podría ser el modelo ideal para estos  
  
estudios, ya que es una especie omnívora con un espectro trófico muy amplio, que  
presenta una gran capacidad de adaptación a hábitats muy diferentes, explotando  
  
eficientemente los recursos disponibles, tanto de origen natural como fuentes de  
alimentación de origen humano, como los cultivos (Fernández-Llario, 2006). Se han  
  
descrito diferencias en la microbiota del jabalí y otros suidos salvajes con respecto al  
cerdo doméstico (Correa-Fiz et al., 2019; Ushida et al., 2016), que evidencian que los  
  
suidos salvajes tienen una microbiota más abundante y diversa que puede contribuir a  
esa gran capacidad de adaptación. Además, la mayor diversidad en la microbiota ha sido  
  
relacionada previamente con un mejor estado de salud de los hospedadores y la  
  
resistencia a algunas enfermedades que comparten con el cerdo doméstico (Correa-Fiz  
et al., 2019). No obstante, los estudios de caracterización de las poblaciones bacterianas  
  
para el control de enfermedades en el cerdo doméstico y otras especies son aún muy  
limitados, siendo este un campo muy interesante que se encuentra en desarrollo.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 64

Página 65:  
REV | Antecedentes y marco teórico  
  
Las bacterias ácido-lácticas  
  
  
Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un conjunto de bacterias que residen de forma  
  
habitual en las diferentes microbiotas de los organismos superiores, además de en otros  
muchos nichos ecológicos como plantas o alimentos (Duar et al., 2017).  
  
  
Las BAL pertenecen al orden Lactobacillales, que a su vez agrupa varias familias y  
géneros muy diversos en cuanto a su morfología, metabolismo y fisiología (Mekadim et  
  
al., 2019). La familia más representativa de este grupo es Lactobacillaceae, que incluía  
hasta el año 2020 únicamente los géneros Lactobacillus y Pediococcus, a los que se ha  
  
sumado Leuconostoc y 23 nuevos géneros derivados de Lactobacillus, como se muestra  
en la Figura B (Zheng et al., 2020). Otras familias representativas de este grupo son  
  
Enterococcaceae (género Enterococcus), Streptococcaceae (géneros Streptococcus y  
Lactococcus) y Leuconostocaceae (género Leuconostoc) (Pessione, 2012). De forma  
  
general, las BAL son Gram positivas (Gram +), catalasa negativas, anaerobias facultativas  
  
o microaerófilas, de morfología esférica o bacilar y tienen como característica principal  
la producción de ácido láctico como metabolito final de la fermentación de  
  
carbohidratos (Mekadim et al., 2019; Pessione, 2012). Aunque la mayoría de las especies  
han obtenido el estado de «Presunción Cualificada de Seguridad» (QPS, Qualified  
  
Presumption of Safety) y son reconocidas como seguras, algunas especies y cepas,  
especialmente de los géneros Streptococcus y Enterococcus, pueden ser patógenas  
  
(Pessione, 2012).  
  
  
Las BAL destacan por tener diversas aplicaciones tecnológicas en el ámbito de la  
  
alimentación humana y animal, debido a las características de su metabolismo  
fermentativo (Mekadim et al., 2019). Así, son generalmente utilizadas como cultivos  
  
iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, cárnicos, frutas y  
vegetales y pueden mejorar las características organolépticas y las propiedades  
  
nutricionales de los alimentos (Mekadim et al., 2019). Asimismo, las BAL han  
demostrado tener numerosos beneficios para la salud de los hospedadores y, por ello,  
  
constituyen uno de los principales grupos de microorganismos que se utilizan desde  
  
  
  
 65 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 66:  
 REV | Antecedentes y marco teórico  
  
hace décadas en formulaciones con compuestos bioactivos, como los probióticos y sus  
  
productos derivados (Piqué et al., 2019), que se definirán más adelante.  
  
  
  
  
  
Figura B. Árbol filogenético de la familia Lactobacillaceae. En el centro, los nuevos grupos filogenéticos  
descritos se muestran con sus ramas del mismo color. Los anillos externos proporcionan información  
sobre las características genómicas y el origen de las especies, incluido el gradiente de color en rojo  
(contenido Guanina-Citosina) y los círculos representan el tamaño del genoma. Fuente: Zheng et al., 2020.  
  
  
En relación con sus propiedades fermentativas, las BAL facilitan la digestión y el  
aprovechamiento de los nutrientes de la dieta y también participan en la síntesis de  
  
algunos micronutrientes, como las vitaminas del grupo B (LeBlanc et al., 2011; Pessione,  
2012). De forma general, se ha documentado ampliamente la capacidad de las BAL para  
  
inhibir patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas, muchas de  
  
ellas derivadas de su metabolismo como los ácidos orgánicos (ácidos láctico, acético o  
propiónico) y metabolitos de bajo peso molecular (como peróxido de hidrógeno, dióxido  
  
de carbono, ácidos grasos…); y también proteínas y péptidos antimicrobianos como las  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 66

Página 67:  
REV | Antecedentes y marco teórico  
  
bacteriocinas (nisina, pediocina…) (Amado et al., 2016; Mathur et al., 2020). Estas  
  
propiedades antimicrobianas, unidas al principio de exclusión competitiva ya  
mencionado, le confieren capacidad para establecerse en su nicho ecológico del  
  
hospedador y modular la microbiota comensal hacia grupos de bacterias beneficiosos,  
en detrimento de grupos potencialmente patógenos (Mekadim et al., 2019; Pessione,  
  
2012; Piqué et al., 2019).  
  
  
Por otro lado, se ha descrito la capacidad de las BAL para interaccionar con el sistema  
inmunitario de los organismos superiores. Las BAL, y otros grupos minoritarios de  
  
microorganismos que forman parte de la microbiota del hospedador, poseen una gran  
  
variedad de moléculas que se conocen con el nombre de «Patrones Moleculares  
Asociados a Microorganismos» (MAMP, Microbe-Associated Molecular Patterns).  
  
Gracias a los MAMPs, estos microorganismos pueden ser reconocidos por el sistema  
inmunitario del hospedador para diferenciarlos de los patógenos, mediante Receptores  
  
de Reconocimiento de Patrones (PRR, Pattern Recognition Receptors),  
fundamentalmente receptores tipo Toll en la superficie celular (TLR, Toll-like receptors)  
  
o tipo NOD, en el citoplasma (NLR, NOD-like receptors) (Dolasia et al., 2018). Los MAMPs  
pueden ser componentes estructurales, fundamentalmente de la pared bacteriana  
  
como el peptidoglicano o los exopolisacáridos; o moléculas secretadas, como los AGCC:  
  
acetato, propionato, butirato… (Hevia et al., 2015). Todas estas moléculas interaccionan  
con el sistema inmunitario del hospedador, participando en varios procesos fisiológicos  
  
animales, como ya se describió anteriormente en el apartado sobre la función defensiva  
de la microbiota.  
  
  
  
  
Muchas especies de BAL que forman parte de las superficies y mucosas humanas y  
animales, establecen con sus hospedadores una relación de simbiosis mediante la cual  
  
pueden aportar numerosos beneficios para la salud de los mismos (LeBlanc et al., 2011;  
  
Mekadim et al., 2019). Estas propiedades beneficiosas pueden ser explotadas para la  
producción de compuestos funcionales como los prebióticos, los probióticos o los  
  
posbióticos.  
  
  
  
  
 67 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 68:  
 REV | Antecedentes y marco teórico  
  
Compuestos bioactivos en alimentos y piensos: los  
posbióticos  
  
  
Los alimentos o piensos funcionales son aquellos que incorporan ingredientes o aditivos  
bioactivos con numerosas propiedades beneficiosas para los animales que los consumen  
  
y siempre bajo determinadas circunstancias. En este sentido, entendemos como aditivos  
funcionales a todos aquellos ingredientes que, incorporados en la dieta de los animales,  
  
pueden mejorar su bienestar y productividad más allá de lo que cabría esperar o explicar  
por su simple potencial nutricional (Velasco et al., 2006).  
  
  
Dentro de los compuestos funcionales, aquellos de la familia de los «-bióticos» incluyen  
productos como los prebióticos, los probióticos, los simbióticos y los posbióticos cuyas  
  
definiciones se muestran en la tabla A. No obstante, existen otros conceptos menos  
utilizados y que han quedado obsoletos con el nuevo consenso de la Asociación  
  
Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) publicado recientemente  
(Salminen et al., 2021), que no se incluyen en este documento. Tanto los «prebióticos»,  
  
ingredientes no digestibles; como los «probióticos», microorganismos vivos; y los  
«simbióticos», la combinación de ambos, son productos muy habituales en el mercado  
  
y su utilización está muy extendida en el campo de la nutrición animal. No obstante, los  
  
posbióticos, el miembro más novedoso de la familia de los compuestos bioactivos, aún  
no es muy conocido.  
  
  
Los «posbióticos» son productos o subproductos metabólicos bioactivos, secretados por  
  
bacterias vivas o liberados a partir de la lisis de la membrana celular bacteriana, que  
pueden ser utilizados para mejorar la salud del hospedador (Aguilar-Toalá et al., 2018;  
  
Wegh et al., 2019). Este concepto, por definición, es bastante amplio y hasta hace poco  
tiempo se encontraba en revisión por solapar su definición con otros productos que  
  
actualmente se encuentran obsoletos, como los «paraprobióticos» o los «probióticos  
  
fantasma», que constituían solo las células microbianas inactivadas (Collado et al., 2019;  
Wegh et al., 2019). No obstante, a mediados del año 2021 se publicó un consenso  
  
científico internacional de la ISAPP que considera como posbiótico toda aquella  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 68

Página 69:  
REV | Antecedentes y marco teórico  
  
preparación que incluya tanto los microorganismos inanimados como sus componentes  
  
siempre que aporten un beneficio sobre la salud del hospedador (Salminen et al., 2021).  
La utilización de la palabra «inanimadas» en lugar de «inactivadas» haciendo referencia  
  
a las células microbianas, radica en que la utilización de microorganismos que no estén  
vivos no implica que estos hayan perdido su funcionalidad. Los posbióticos son factores  
  
solubles liberados durante la fermentación o la lisis bacteriana y pueden incluir  
metabolitos como enzimas, péptidos, proteínas, exopolisacáridos, ácidos orgánicos y  
  
lípidos (AGCC); y componentes estructurales, fundamentalmente de la pared celular  
bacteriana, como ácidos teicoico y lipoteicoico, peptidoglicano, proteínas de la capa  
  
superficial bacteriana y otros polisacáridos (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al.,  
  
2019). En los estudios científicos publicados hasta la fecha se consideran  
fundamentalmente los posbióticos de origen bacteriano, especialmente del grupo de las  
  
BAL mencionadas anteriormente, y más concretamente los producidos por especies que  
pertenecían tradicionalmente al género Lactobacillus. No obstante, existen otras  
  
especies bacterianas y de levaduras con capacidad para producir metabolitos bioactivos  
(Aguilar-Toalá et al., 2018).  
  
  
 Tabla A. Definiciones de productos bioactivos utilizados en alimentación humana y animal aceptados  
  
 por la comunidad científica en la actualidad  
 Concepto Definición Referencia  
  
 Prebiótico ingredientes no digestibles de los alimentos que (FAO/OMS, 2001; ISAPP,  
  
 son utilizados como sustrato por los 2021)  
 microorganismos del hospedador para aportar  
 beneficios sobre su salud  
  
  
 Probiótico microorganismos vivos que, administrados en (FAO/OMS, 2001; ISAPP,  
 cantidades adecuadas, confieren beneficios para 2021)  
  
 la salud del hospedador  
  
  
 Simbiótico mezcla sinérgica de microorganismos vivos y su (FAO/OMS, 2001; ISAPP,  
 sustrato que mejoran la salud del hospedador 2021)  
  
  
 Posbiótico factores solubles generados del metabolismo de (ISAPP, 2021; Aguilar-Toalá  
 los probióticos, así como las células microbianas et al., 2018)  
  
 inanimadas que mejoran la salud del hospedador  
  
  
 69 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 70:  
 REV | Antecedentes y marco teórico  
  
Proceso de producción y ventajas de los posbióticos  
  
El proceso de elaboración de un posbiótico consiste en la generación de los compuestos  
bioactivos en una matriz durante la fermentación microbiana bajo una serie de  
  
condiciones controladas que son específicas para cada microorganismo (Wegh et al.,  
2019). Tras este proceso se obtiene un producto final elaborado a partir de ingredientes  
  
bioactivos que puede denominarse fórmula o pienso funcional (Cicenia et al., 2014).  
Estos ingredientes funcionales consiguen mimetizar y optimizar los efectos de los  
  
probióticos sin la necesidad de administrar las bacterias vivas, lo que le confiere  
numerosas ventajas.  
  
  
En el caso de los probióticos, para que el producto sea efectivo es necesario que los  
microorganismos vivos colonicen el intestino, lo que supone un gran reto tecnológico.  
  
Se han descrito una serie de factores que podrían dificultar este proceso y que son  
difíciles de controlar, como las características propias de la microbiota del hospedador,  
  
el consumo de antibióticos u otros medicamentos y las diferencias interindividuales  
relacionadas con la genética de cada sujeto (Marco y Tachon, 2013). Por otro lado, es  
  
muy complicado conocer si, una vez alcanzan su sitio de acción, se dan las condiciones  
necesarias para que los microorganismos probióticos produzcan las sustancias  
  
beneficiosas en la cantidad deseada. El gran avance que suponen los posbióticos es que  
  
los metabolitos bioactivos se producen en condiciones óptimas y se vehiculan  
directamente en dosis controladas a su sitio de acción sin necesidad de colonización  
  
microbiana (Cicenia et al., 2014).  
  
  
Otra de las grandes ventajas tecnológicas es que la vida útil de los posbióticos es mayor  
y además se simplifican las condiciones de almacenamiento y transporte del producto  
  
final (Aguilar-Toalá et al., 2018; Cicenia et al., 2014; Wegh et al., 2019). Esto es  
especialmente importante cuando no se dan las condiciones ideales para la  
  
conservación de probióticos, como podría ocurrir en condiciones de campo.  
  
  
Por último, la administración de posbióticos disminuye la probabilidad de presentar  
  
efectos adversos como transferencia de genes de resistencia y bacteriemia, que se dan  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 70

Página 71:  
REV | Antecedentes y marco teórico  
  
esporádicamente tras la administración de probióticos, aunque en muy raras ocasiones  
  
se observan complicaciones graves (Aguilar-Toalá et al., 2018).  
  
  
  
Modo de acción de los posbióticos  
  
Los posbióticos tienen, de forma general, efectos locales: modulador de la microbiota,  
antimicrobiano e inmunomodulador; y otros efectos sistémicos derivados que  
  
favorecen los procesos fisiológicos animales y confieren un enorme beneficio para la  
salud del hospedador (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019).  
  
  
La modulación de la microbiota se lleva a cabo mediante moléculas señalizadoras que  
  
inducen complejos sistemas de comunicación celular (Xavier, 2018). Por ejemplo, las  
  
vesículas extracelulares (VEs) contienen gran diversidad de sustancias como proteínas,  
ácidos nucleicos, fosfolípidos, glucolípidos y polisacáridos, que interaccionan con la  
  
microbiota del hospedador transfiriendo material genético y proteínas y participando  
en los procesos de señalización (Wegh et al., 2019). De esta manera se consigue  
  
modificar la composición de las poblaciones microbianas, creando un equilibrio  
favorable entre especies beneficiosas y potencialmente nocivas.  
  
  
La actividad antimicrobiana de los posbióticos se debe a la presencia de compuestos que  
  
inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, especialmente bacterias Gram +  
  
y Gram -. Estos compuestos son fundamentalmente proteínas y péptidos pequeños,  
como las bacteriocinas; y ácidos orgánicos, como el lactato o el acetato (Aguilar-Toalá  
  
et al., 2018; Wegh et al., 2019). También se han descrito enzimas y otras moléculas de  
bajo peso molecular con actividad antimicrobiana (Aguilar-Toalá et al., 2018).  
  
  
La interacción de los metabolitos bioactivos producidos por microorganismos con el  
  
sistema inmunitario del hospedador está generando cada vez más interés en la  
comunidad científica actual. El efecto inmunomodulador de los posbióticos está  
  
relacionado con su capacidad de inducción o supresión del sistema inmunitario y la  
  
regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Aguilar-  
Toalá et al., 2018; Cicenia et al., 2014; Wegh et al., 2019). Algunos metabolitos que  
  
  
 71 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 72:  
 REV | Antecedentes y marco teórico  
  
participan en este proceso son los AGCC, como el acetato o el propionato, que potencian  
  
la función de barrera intestinal, favoreciendo la inmunidad de las mucosas y tiene un  
efecto sobre la diferenciación de los macrófagos y las células dendríticas (Wegh et al.,  
  
2019). También se han descrito varias proteínas y polisacáridos, como el  
lipopolisacárido, con diversos efectos sobre rutas inmunológicas y la producción de  
  
citoquinas (Aguilar-Toalá et al., 2018; Cicenia et al., 2014).  
  
  
  
Beneficios de los posbióticos para la sanidad animal  
  
Los posbióticos consiguen mejorar los indicadores de salud y aumentar el rendimiento  
productivo y la rentabilidad de los animales, disminuyendo los procesos que cursan con  
  
una gran mortalidad y morbilidad, especialmente durante las fases críticas de la  
  
producción. Varios estudios realizados en corderos, cerdos y pollos de engorde han  
demostrado que la administración de posbióticos mejora los indicadores productivos de  
  
los animales (Bajagai et al., 2016; Humam et al., 2019; Izuddin, Loh, Samsudin, et al.,  
2019) y un estudio realizados en gallinas de puesta encontró una mejora en la  
  
producción y calidad de los huevos (Loh et al., 2014). El empleo de estos suplementos  
durante las fases de mayores requerimientos nutricionales, facilita la digestibilidad y el  
  
aprovechamiento de los nutrientes, favoreciendo la producción y absorción de  
sustancias que son esenciales para aumentar el ritmo de crecimiento de los animales y  
  
la eficacia en la transformación de los alimentos (Aguilar-Toalá et al., 2018; Bajagai et  
  
al., 2016). Además, la modulación de la microbiota intestinal aumenta las poblaciones  
beneficiosas de bacterias como Lactobacillus y Bifidobacterium en detrimento de  
  
coliformes y otras enterobacterias potencialmente patógenas, entre los que se  
encuentran E. coli y Clostridium spp. (Aguilar-Toalá et al., 2018).  
  
  
Sin duda, una gran potencialidad de los posbióticos para la sanidad global está en la  
  
reducción de la utilización de antimicrobianos. Esto se consigue, por un lado, porque  
gracias a la capacidad de las BAL para producir sustancias inhibitorias del crecimiento de  
  
patógenos, se postulan como una novedosa alternativa para la limitación del uso de  
  
antibióticos en animales de producción. La creciente preocupación por la propagación  
de bacterias resistentes a los antibióticos ocasionó la prohibición de la utilización de  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 72

Página 73:  
REV | Antecedentes y marco teórico  
  
estos como promotores del crecimiento en el año 2006 y a partir de ahí se han  
  
desarrollado distintas estrategias recogidas en el PRAN (Plan Nacional frente a la  
Resistencia a los Antibióticos, 2014-2018; 2019-2021). Además, algunas de estas  
  
sustancias inhibitorias se han utilizado en combinación con la terapia antibiótica,  
contribuyendo al tratamiento de la infección potenciando su efecto antimicrobiano y  
  
previniendo el desarrollo de resistencias antimicrobianas si se consigue el mismo efecto  
terapéutico con menos dosis de antibiótico (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021;  
  
Mathur et al., 2017; Ng et al., 2020).  
  
  
Por otro lado, debido a su capacidad para potenciar el sistema inmunitario, se consigue  
  
que los organismos animales puedan hacer frente a determinadas enfermedades de  
forma más efectiva, disminuyendo la cantidad de antibióticos a administrar y, en  
  
algunos casos, evitando su utilización. Este efecto antimicrobiano e inmunomodulador  
puede ser un factor muy relevante en la mejora en la salud de los animales y en los  
  
indicadores productivos, optimizando la rentabilidad de las explotaciones ganaderas.  
Pese a que existen algunos estudios preliminares en este sentido, se necesitan más  
  
investigaciones en profundidad en animales de producción, especialmente en  
condiciones reales, pero que cumplan los criterios básicos de cualquier ensayo  
  
experimental.  
  
  
  
  
  
 73 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 74:  
INTRODUCCIÓN A LA TESIS DOCTORAL Y OBJETIVOS

Página 75:  
 INT | Introducción  
  
  
  
  
  
75 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 76:  
 INT | Introducción  
  
Introducción a la tesis doctoral  
  
  
Los microorganismos que residen de forma habitual en un hospedador forman parte de  
  
un complejo ecosistema, conocido con el nombre de «microbiota», que participa en el  
desarrollo de multitud de procesos fisiológicos. La microbiota de la fauna silvestre es  
  
más diversa y abundante que la de los animales domésticos y destaca por la mayor  
funcionalidad de sus poblaciones bacterianas (Gao et al., 2020; Qin et al., 2020).  
  
Asimismo, tiene una gran relevancia biológica para la supervivencia y conservación de  
las especies, ya que influye en la capacidad de adaptación de los animales al ecosistema  
  
en el que habitan. De hecho, se han descrito grupos bacterianos que podrían ser los  
responsables de la resistencia de algunos animales silvestres a determinadas  
  
enfermedades que afectan al ganado doméstico. Por todo esto, la fauna salvaje podría  
  
ser una fuente de microorganismos potencialmente beneficiosos para modular la  
microbiota de los animales más susceptibles a esas enfermedades (Bahrndorff et al.,  
  
2016; Correa-Fiz et al., 2019).  
  
  
Las bacterias ácido-lácticas (BAL) conforman un grupo de microorganismos muy  
estudiado por sus numerosas aplicaciones tecnológicas y por sus propiedades  
  
beneficiosas para la salud humana y animal. Este tipo de bacterias han demostrado  
aportar beneficios muy variados, por un lado, favoreciendo los procesos de digestión,  
  
absorción y síntesis de nutrientes, debido a las características de su metabolismo  
  
fermentativo; y, por otro lado, potenciando los sistemas innatos para la lucha frente a  
patógenos, debido principalmente a sus propiedades para producir metabolitos  
  
antimicrobianos y a su capacidad para interaccionar con el sistema inmunitario del  
hospedador (Mekadim et al., 2019; Pessione, 2012). Por todo esto, se utilizan de forma  
  
habitual en formulaciones con compuestos bioactivos, como los probióticos y otros  
productos derivados, como los posbióticos (Piqué et al., 2019).  
  
  
En este sentido, los piensos funcionales son aquellos que incorporan compuestos  
  
bioactivos que pueden mejorar la salud y la productividad de los animales más allá de lo  
  
que cabría esperar únicamente por su potencial nutricional (Velasco et al., 2006). Los  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 76

Página 77:  
INT | Introducción  
  
posbióticos son productos o subproductos metabólicos bioactivos y componentes  
  
estructurales bacterianos que son generados en una matriz durante un proceso de  
fermentación microbiana controlada. Los posbióticos constituyen un producto  
  
innovador que se produce a partir de bacterias probióticas que se encuentran  
inanimadas, conservando su actividad funcional, en la preparación final y que incluye los  
  
metabolitos de fermentación generados de forma espontánea con un rendimiento  
optimizado (Salminen et al., 2021). Estos productos se encuentran en auge y se postulan  
  
como una nueva alternativa para el manejo de ciertas patologías que afectan a la  
sanidad y a la productividad de los animales.  
  
  
La necesidad de la incorporación de nuevas herramientas preventivas o terapéuticas  
para el control de enfermedades infecciosas viene determinada por la emergencia de  
  
patógenos bacterianos resistentes a los antimicrobianos de uso común, lo que condujo  
a la prohibición de la utilización de estos como aditivos en alimentación animal en las  
  
últimas décadas y a promover su limitación a condiciones terapéuticas (Bajagai et al.,  
2016). Estas nuevas alternativas necesitan ser investigadas en profundidad mediante  
  
una caracterización completa en condiciones de laboratorio que aseguren, por una  
parte, su inocuidad y, por otra parte, su efectividad (Soltani et al., 2021). Para esto, se  
  
deben complementar los procedimientos de laboratorio mediante la extrapolación de  
  
los estudios en animales de experimentación, en una primera fase, y en las condiciones  
más reales de campo, en una segunda fase.  
  
  
Por todo esto, la elaboración de un producto innovador que pueda ser comercializado  
  
para el control de determinados procesos de importancia en sanidad animal, requiere  
del diseño de una batería de procedimientos que incluyan un extenso trabajo de  
  
investigación y el cumplimiento de una serie de requisitos que aseguren su calidad.  
  
  
Esta tesis doctoral presenta la particularidad de pertenecer a un proyecto de  
  
investigación industrial, desarrollado en el seno de la empresa INGULADOS SL, que  
pretende generar conocimiento científico y tecnológico que pueda ser aplicado por la  
  
propia empresa, para aumentar su competitividad en el sector; y transferido a la  
sociedad en general, para solventar el problema de salud pública planteado.  
  
  
 77 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 78:  
 INT | Introducción  
  
Estructura de la tesis doctoral  
  
  
Este documento se estructura en tres bloques claramente diferenciados, que se  
  
complementan entre sí. El BLOQUE I aglutina una serie de experimentos de laboratorio  
in vitro, divididos en tres capítulos, que describen los procedimientos para la selección  
  
y la caracterización de las propiedades de las BAL aisladas de animales silvestres con  
  
situaciones epidemiológicas particulares. El capítulo I, denominado «Aislamiento y  
selección de BAL de la microbiota digestiva de jabalíes que habitan en áreas con  
  
diferente prevalencia de tuberculosis (TB) y estudio de sus capacidades para antagonizar  
las micobacterias», describe los procedimientos para el aislamiento de BAL simbiontes  
  
de la microbiota de jabalíes y pretende descifrar el papel de estas en relación con la TB,  
una importante enfermedad que afecta tanto a la fauna silvestre como a la ganadería  
  
doméstica, generando importantes pérdidas económicas en todo el mundo. En el  
segundo capítulo titulado «Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios  
  
de seguridad, determinación in vitro de la acción antimicrobiana frente a patógenos y  
  
valoración de su capacidad inmunomoduladora» se realiza una valoración de las  
propiedades beneficiosas de las BAL aisladas en relación con tres aspectos  
  
fundamentales: su seguridad para los hospedadores, su capacidad para interaccionar  
con las células inmunitarias de los hospedadores y sus propiedades para producir  
  
sustancias antimicrobianas frente a patógenos animales. En el tercer y último capítulo  
de este bloque, llamado «Optimización funcional del efecto antimicrobiano,  
  
determinación de la naturaleza de la actividad y estudio de sinergia con antibióticos» se  
describen los procedimientos para dilucidar el origen de los componentes que ejercen  
  
fundamentalmente la actividad antimicrobiana, se optimiza su efecto y se evalúan en  
  
sinergia con antibióticos de uso común en medicina veterinaria.  
  
  
Por otro lado, el BLOQUE II describe tres modelos experimentales de investigación  
aplicada in vivo para tratar de buscar aplicaciones a las propiedades potencialmente  
  
beneficiosas detectadas. En cada uno de los estudios se elaboró un producto diferente  
a partir de una selección de BAL aisladas de la microbiota de jabalíes con una situación  
  
sanitaria excepcional. Este bloque está estructurado en tres capítulos de investigación  
aplicada en sanidad animal con tres modelos que van desde lo más experimental,  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 78

Página 79:  
INT | Introducción  
  
comenzando con un estudio en animales destinados a fines científicos, cuyas  
  
condiciones están totalmente controladas en todo momento; pasando por un modelo  
doméstico que presenta las condiciones habituales de estabulación de los animales  
  
durante un periodo determinado de tiempo, con una intervención moderada; hasta  
finalizar con el tercer modelo, que es el silvestre, que refleja las condiciones más reales  
  
posibles en animales que viven en libertad, pero cumpliendo determinados requisitos  
para ser considerado un modelo experimental. De este modo, capítulo IV se denomina  
  
«Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una  
neumonía experimental en modelo ratón» y describe la investigación in vivo de una de  
  
las sinergias funcionales detectadas en el capítulo III, para el tratamiento de la infección  
  
experimental producida por Pasteurella multocida mediante la administración  
combinada de un antibiótico y un suplemento elaborado con metabolitos de las BAL. El  
  
capítulo V «Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y  
los parámetros productivos en ganadería» describe el efecto de un producto posbiótico  
  
añadido al pienso en un cebadero ovino durante el periodo de engorde de los animales  
de producción. El capítulo VI «Administración de posbióticos para el control de TB en  
  
fauna silvestre» cierra el bloque de experimentación animal con un estudio en jabalíes  
que pretende controlar la TB, la enfermedad en relación con la cual se seleccionaron las  
  
BAL beneficiosas, mediante la administración de un producto posbiótico con  
  
propiedades antagónicas para Mycobacterium bovis, el agente causal de la TB.  
  
  
Por último, el BLOQUE III presenta un capítulo único, que es el capítulo VII de la tesis  
doctoral, denominado «Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la  
  
transferencia tecnológica» que describe la transferencia de tecnología y conocimiento  
que se ha derivado de la presente tesis de doctorado industrial, materializando el  
  
impacto que ha tenido el desarrollo de procesos sobre la empresa INGULADOS y  
describiendo tanto las actividades de difusión y divulgación que se han realizado, así  
  
como la protección de determinadas invenciones mediante la solicitud de dos patentes.  
  
  
  
  
  
 79 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 80:  
 INT | Introducción  
  
Objetivos de la tesis doctoral  
  
  
En base a todo lo anterior y a los antecedentes previamente desarrollados, esta tesis  
  
doctoral plantea los siguientes objetivos generales:  
  
BLOQUE I: experimentos de laboratorio in vitro  
  
  
Capítulo I à objetivo I  
  
  
Dilucidar si la microbiota de las poblaciones de jabalíes contribuye a mantener un estado  
libre de tuberculosis en fincas localizadas en zonas de alto riesgo de la enfermedad  
  
mediante el estudio de las propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras de su  
perfil de bacterias ácido-lácticas con capacidad para antagonizar Mycobacterium bovis,  
  
el agente causal de la tuberculosis.  
  
  
Capítulo II à objetivo II  
  
  
Estudiar las propiedades potencialmente beneficiosas de las bacterias ácido-lácticas  
  
aisladas de la microbiota de jabalíes mediante un análisis genotípico y fenotípico  
completo del perfil de seguridad de los aislados, de su actividad antimicrobiana frente a  
  
patógenos del jabalí y de sus propiedades inmunomoduladoras.  
  
  
Capítulo III à objetivo III  
  
  
Determinar la naturaleza de la fracción antimicrobiana y estudiar la sinergia de los  
  
metabolitos producidos al sobrenadante de forma óptima con una selección de  
antibióticos frente a patógenos importantes en medicina veterinaria.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 80

Página 81:  
INT | Introducción  
  
  
BLOQUE II: experimentación animal in vivo  
  
  
Capítulo IV à objetivo IV  
  
  
Estudiar el efecto de la administración por vía oral de un suplemento elaborado a partir  
  
de los metabolitos producidos por las bacterias ácido-lácticas en combinación con la  
terapia antibiótica para el control de una neumonía experimental en modelo ratón.  
  
  
  
Capítulo V à objetivo V  
  
  
Analizar el efecto de la administración de un producto posbiótico elaborado a partir de  
  
una selección de aislados sobre los indicadores sanitarios y los parámetros productivos  
en un cebadero de corderos.  
  
  
Capítulo VI à objetivo VI  
  
  
Evaluar el efecto de un producto posbiótico administrado durante la época de  
suplementación llevada a cabo en poblaciones de jabalíes sobre la situación  
  
epidemiológica de la tuberculosis.  
  
  
BLOQUE III: transferencia de tecnología y conocimiento científico  
  
  
Capítulo VII à objetivo VII  
  
  
Transferir la tecnología y el conocimiento científico derivado del desarrollo de la  
  
presente tesis doctoral mediante la solicitud de patentes de invención, la aplicación de  
los conocimientos al desarrollo de procesos en la empresa y la difusión de los resultados  
  
mediante la asistencia a congresos y la publicación en revistas científicas y divulgativas.  
  
  
  
  
 81 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 82:  
 INT | Introducción  
  
  
  
  
  
MARÍA BRAVO SANTILLANA 82

Página 84:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
  
 84 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 85:  
 LAB | Capítulo I  
  
  
BLOQUE I: EXPERIMENTOS DE LABORATORIO IN VITRO  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 85

Página 86:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
  
 86 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 87:  
 LAB | Capítulo I  
  
ÍNDICE BLOQUE I  
  
  
  
  
  
Capítulo I: Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas de la microbiota digestiva de jabalíes  
que habitan en áreas con diferentes prevalencias de tuberculosis y estudio de sus capacidades para  
  
antagonizar las micobacterias 89  
  
 INTRODUCCIÓN 91  
  
 MÉTODO 97  
  
 Figura resumen del método 105  
  
 RESULTADOS 106  
  
 DISCUSIÓN 124  
  
CAPÍTULO II: Evaluación del potencial beneficioso de los aislados: estudios de seguridad,  
  
determinación in vitro de la acción antimicrobiana frente a patógenos y valoración de su capacidad  
inmunomoduladora 133  
  
 INTRODUCCIÓN 135  
  
 MÉTODO 145  
  
 Figura resumen del método 153  
  
 RESULTADOS 154  
  
 DISCUSIÓN 170  
  
CAPÍTULO III: Optimización funcional del efecto antimicrobiano, determinación de la naturaleza de la  
actividad y estudios de sinergia con antibióticos 181  
  
 INTRODUCCIÓN 183  
  
 MÉTODO 187  
  
 Figura resumen del método 193  
  
 RESULTADOS 194  
  
 DISCUSIÓN 200  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 87

Página 88:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
  
 88 MARÍA BRAVO SANTILLANA

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

Página 90:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
  
 90 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 91:  
 LAB | Capítulo I  
  
INTRODUCCIÓN  
  
  
  
La importancia de la tuberculosis en reservorios silvestres como el jabalí  
  
La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica causada por varias especies de  
micobacterias perteneciente al complejo Mycobacterium tuberculosis (CMT), que afecta  
  
al sector ganadero y cinegético y genera importantes pérdidas económicas en todo el  
  
mundo (Ayele et al., 2004; Naranjo et al., 2008). A pesar de las estrictas medidas llevadas  
a cabo durante las campañas de erradicación en los últimos años, esta enfermedad sigue  
  
siendo muy prevalente en algunos países europeos, incluida España, donde las especies  
ganaderas cohabitan con reservorios silvestres de micobacterias, especialmente M.  
  
bovis (Corner, 2006; Naranjo et al., 2008). Los ungulados salvajes como el jabalí europeo  
(Sus scrofa) muestran una alta prevalencia TB en algunas zonas de España (Risco et al.,  
  
2019), complicando una completa eliminación de la enfermedad en estas áreas. Aunque  
estas cuestiones se tratarán en mayor profundidad en el capítulo IV, la evidencia  
  
científica sugiere que, junto con los estudios epidemiológicos y ecológicos, es necesario  
  
un mejor conocimiento de la patología y transmisión de la infección por M. bovis para  
determinar el papel significativo de estos animales silvestres en el mantenimiento de la  
  
TB.  
  
  
Al igual que otras especies del CMT, las células de M. bovis son inicialmente fagocitadas  
por macrófagos en el hospedador, donde pueden sobrevivir, replicarse y diseminarse a  
  
diferentes partes anatómicas del cuerpo (Cosma et al., 2003). Cuando los macrófagos  
transportan las bacterias a tejidos más profundos, se produce la acumulación de otras  
  
células inmunitarias alrededor de los focos infectados para formar granulomas, que son  
  
complejos inmunitarios organizados formados por macrófagos, linfocitos y neutrófilos  
diferenciados, aunque los neutrófilos también están presentes en las primeras etapas  
  
de la infección. Pese a la formación de los granulomas en el hospedador como respuesta  
a la infección, la bacteria persiste de forma indefinida existiendo la posibilidad de una  
  
reinfección, pero sin síntomas específicos, que es la paradoja central de la inmunidad  
frente a M. bovis (Cosma et al., 2003). Algunos estudios han confirmado que un elevado  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 91

Página 92:  
LAB | Capítulo I  
  
número de individuos dentro de un grupo de animales infectados no muestran signos  
  
clínicos, pero presentan lesiones generalizadas en la inspección post mortem (Menin et  
al., 2013). En el caso de los jabalíes, a menudo se encuentran patrones generalizados de  
  
la infección con lesiones torácicas y abdominales, generalmente en los nódulos linfáticos  
traqueo-bronquiales y mesentéricos (Martín-Hernando et al., 2007; Matos et al., 2016).  
  
  
Los jabalíes asintomáticos con lesiones generalizadas excretan una gran cantidad de  
  
bacilos de M. bovis al medio ambiente (Risco et al., 2019; Santos et al., 2015). La vía de  
contagio de M. bovis es a través de la mucosa oronasal mediante los alimentos, el agua  
  
o el aire y la bacteria se disemina desde los nódulos linfáticos submandibulares o  
  
mesentéricos al resto del organismo (Martín-Hernando et al., 2007; Matos et al., 2016;  
Menin et al., 2013). Sin embargo, la distribución variable de las lesiones sugiere que;  
  
primero, no es posible dilucidar si la vía respiratoria o la digestiva es más relevante en  
estos animales; y, en segundo lugar, la respuesta inmunitaria de cada individuo puede  
  
influir en el resultado de la enfermedad. Las razones de esta variabilidad en la  
distribución de las lesiones no ha sido completamente explicada y podría deberse a la  
  
variabilidad genética del jabalí (Acevedo-Whitehouse et al., 2005).  
  
  
En jabalíes se ha comprobado cómo la presencia de otros microorganismos puede influir  
  
en el desarrollo de la TB. Así, los jabalíes portadores de circovirus porcino tipo 2 (PCV2)  
y de parásitos del género Metastrongylus, ambos patógenos en esta especie, tienen más  
  
probabilidad de desarrollar lesiones generalizadas de TB (Risco et al., 2014). Por otro  
lado, durante los últimos años, se ha propuesto en medicina humana la posibilidad de  
  
que la microbiota del hospedador pueda contribuir a la resistencia a esta enfermedad  
en determinados individuos, como se abordará en este capítulo.  
  
  
  
Contribución de la microbiota comensal en la lucha frente a la tuberculosis  
  
Como se ha visto en la introducción, los microorganismos simbiontes de un organismo  
  
participan en muchos procesos fisiológicos y contribuyen a mantener un buen estado  
  
de salud en los animales. De hecho, la ausencia de alteraciones en los microorganismos  
que forman parte de la microbiota, es decir, una microbiota sana, conocida con el  
  
  
 92 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 93:  
 LAB | Capítulo I  
  
nombre de «eubiosis», puede ser considerada como un importante indicador de salud  
  
en las poblaciones animales.  
  
  
Las micobacterias patógenas, como M. tuberculosis o M. bovis, son microorganismos  
adaptados a su hospedador que han coevolucionado con el mismo y han desarrollado  
  
estrategias para evadir los mecanismos de defensa. De hecho, una de las primeras  
barreras que deben eludir es la microbiota comensal, que reside en las mucosas de los  
  
hospedadores, y que tiene como función primordial dificultar este proceso y evitar la  
infección de los macrófagos, su nicho replicativo (Cambier et al., 2014).  
  
  
Son muchos los estudios recientes que han puesto de manifiesto que una microbiota  
alterada en uno o varios aparatos o sistemas del organismo, conocida con el nombre de  
  
«disbiosis», puede condicionar al padecimiento de un gran número de enfermedades  
de todo tipo (du Teil Espina et al., 2019; Nicholson et al., 2012; Peters et al., 2019).  
  
Diversos estudios en la especie humana y en modelos animales han demostrado el papel  
protector que tiene la microbiota digestiva frente a la colonización y el desarrollo de la  
  
TB pulmonar (Dumas et al., 2018; Y. Hu et al., 2019). De hecho, se han descrito  
alteraciones en la composición de la microbiota intestinal en pacientes con tuberculosis  
  
(Luo et al., 2017; Winglee et al., 2014).  
  
  
Esta asociación entre la microbiota digestiva y una enfermedad eminentemente  
  
respiratoria en humanos, forma parte del complejo eje intestino-pulmón y no ha sido  
estudiada en animales hasta la fecha. En el caso de especies como el jabalí, la asociación  
  
entre la microbiota digestiva y la TB podría ser incluso más relevante, dado que la  
presencia de lesiones generalizadas con afectación digestiva son hallazgos  
  
relativamente frecuentes durante la inspección post mortem (Vicente et al., 2006). Esto  
puede deberse a que en esta especie es importante la vía de contagio oral mediante  
  
ingestión de agua o alimentos contaminados, o incluso de carroña.  
  
  
Por otro lado, algunas especies de bacterias que forman parte de la microbiota comensal  
  
producen sustancias que tienen propiedades antimicobacterianas e  
inmunomoduladoras, es decir, con potencial para antagonizar el desarrollo de bacterias  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 93

Página 94:  
LAB | Capítulo I  
  
del MTC (Dumas et al., 2018; Hong et al., 2016; Wood et al., 2017). Estas propiedades  
  
podrían realzar el papel de la microbiota comensal para frenar el desarrollo de la  
enfermedad cuando se produce el contagio.  
  
  
  
Papel relevante del grupo de las bacterias ácido-lácticas en la microbiota comensal  
  
Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un conjunto de bacterias que residen de forma  
  
habitual en la microbiota digestiva de los mamíferos (Duar et al., 2017). Uno de los  
géneros más representativos de este grupo, que se conocía hasta el año 2020 como  
  
Lactobacillus, en la actualidad se encuentra dividido en 23 nuevos géneros, como se ha  
comentado en la introducción. No obstante, las bacterias que formaban parte de él se  
  
pueden seguir nombrando con el término general «lactobacilos», puesto que se  
  
considera de utilidad al tratarse de géneros de especies con características comunes  
(Zheng et al., 2020). Otros géneros de importancia en este grupo son los pediococos  
  
(Pediococcus spp.) y enterococos (Enterococcus spp.) que, si bien muestran algunas  
diferencias con respecto los géneros anteriores, comparten un número elevado de  
  
propiedades (Pessione, 2012). No obstante, es importante destacar que varias especies  
del género Enterococcus se han relacionado con procesos patológicos (Braïek y Smaoui,  
  
2019; Pessione, 2012).  
  
  
Se han descrito varias especies de BAL con capacidad para modular la respuesta  
  
inmunitaria de los hospedadores ya que interactúan con las células epiteliales y las  
células presentadoras de antígenos como los macrófagos y han sido estudiadas con  
  
mayor profundidad en los lactobacilos (Mohamadzadeh et al., 2005; Rocha-Ramírez et  
al., 2017). Aunque los mecanismos específicos todavía no se conocen del todo, se ha  
  
demostrado que los componentes de la pared celular y la membrana de estas bacterias,  
como los pili (fimbrias), los peptidoglicanos, los ácidos lipoteicoicos (LTA, WTA) o los  
  
exopolisacáridos (EPS), desempeñan un papel importante en la activación de las células  
fagocíticas de la respuesta inmunitaria innata (Hevia et al., 2015).  
  
  
La participación de los lactobacilos en determinados procesos fisiológicos del  
hospedador es fundamental para mantener una adecuada homeostasis de la  
  
  
 94 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 95:  
 LAB | Capítulo I  
  
microbiota, evitando las disbiosis, particularmente en el intestino (Diep et al., 2009;  
  
Gueimonde et al., 2013; Liu et al., 2014). El mantenimiento de un equilibrio microbiano  
beneficioso en el hospedador previene la colonización de patógenos oportunistas  
  
(Martin et al., 2013). Las BAL producen metabolitos antimicrobianos como ácidos  
orgánicos, peróxido de hidrógeno, etanol y bacteriocinas para competir con otros  
  
microorganismos y establecerse en su nicho ecológico (Pessione, 2012). Algunos de  
estos compuestos, principalmente las bacteriocinas, han demostrado tener actividad  
  
frente a M. bovis y M. tuberculosis (Stedman et al., 2018; Todorov et al., 2008, 2014).  
Aunque se describirán con más detalle en el capítulo siguiente, de forma general, las  
  
bacteriocinas son péptidos antimicrobianos que pueden clasificarse en tres clases  
  
diferentes dependiendo de su estructura química y tamaño: la clase I incluye péptidos  
menores de 10 kDa termoestables y modificados postraduccionalmente (ej., nisina), la  
  
clase II engloba también a los péptidos pequeños y termoestables pero no modificados  
(ej., pediocina) y dentro de esta clase se encuentra la IIa, con una secuencia consenso;  
  
la IIb, bacteriocinas de dos péptidos; la IIb, péptidos pequeños termoestables y la IId, las  
bacteriocinas de péptido único; así como otras subclases menos estudiadas. Por último,  
  
las bacteriocinas de clase III se corresponden con péptidos no modificados, termolábiles  
y mayores de 10 kDa con un mecanismo de acción bacteriolítico (bacteriolisinas) o no  
  
lítico (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Además, las bacteriocinas también pueden contribuir  
  
a los efectos inmunomoduladores sobre las células mononucleares de sangre periférica  
y las células dendríticas (Hegarty et al., 2016).  
  
  
Debido a que la bacteria patógena M. bovis penetra en el organismo a través de las  
  
mucosas de los tractos respiratorio o digestivo, donde residen los lactobacilos y otras  
BAL de la microbiota del hospedador, antes de interaccionar con los macrófagos, que  
  
son el nicho óptimo para su replicación y supervivencia; y al hecho de que la microbiota  
puede interaccionar con los macrófagos y desarrollar actividad antimicobacteriana,  
  
estas bacterias beneficiosas podrían ejercer un efecto protector y evitar la diseminación  
  
de la micobacteria por el resto del organismo.  
  
  
A raíz de todo lo anteriormente expuesto se propuso como objetivo general dilucidar si  
la microbiota de las poblaciones de jabalíes contribuye a mantener un estado libre de  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 95

Página 96:  
LAB | Capítulo I  
  
TB en fincas localizadas en zonas de alto riesgo de la enfermedad, debido a sus  
  
propiedades para antagonizar la bacteria causante de la enfermedad M. bovis. Para ello,  
en este capítulo I se propusieron los siguientes objetivos específicos:  
  
  
 - Realizar el aislamiento de BAL de la microbiota digestiva de jabalíes en fincas con  
  
 diferente situación epidemiológica con relación a la TB.  
  
  
 - Descifrar el papel de las BAL que forman parte de la microbiota comensal en el  
 desarrollo de la TB, analizando la capacidad para antagonizar al agente causal de la  
  
 misma, M. bovis: por un lado, estudiando los efectos antimicrobianos de las BAL  
  
 para inhibir el crecimiento de M. bovis y el origen de las actividades inhibitorias  
 encontradas y, por otro, analizando sus propiedades para modular la capacidad  
  
 fagocítica de los macrófagos.  
  
  
  
  
  
 96 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 97:  
 LAB | Capítulo I  
  
 MÉTODO  
  
  
  
1. Selección de fincas de estudio y toma de muestras fecales de jabalíes  
  
 Se seleccionaron cuatro fincas situadas en el centro y oeste de España con diferentes  
 localizaciones geográficas, todas ellas situadas en zonas calificadas como especial riesgo  
  
 (alto) de TB en fauna silvestre. Las fincas 1, 2 y 3 tienen nula prevalencia de TB en jabalíes  
  
 pese a estar rodeada de fincas con altas prevalencias de la enfermedad. La finca 4, por  
 el contrario, tiene una prevalencia del 20% de TB en la población de jabalíes (Tabla 1.1).  
  
 Todas las prevalencias se estimaron a partir de datos recogidos en las historias clínicas  
 de las fincas durante los últimos años y están calculadas a partir de lesiones compatibles  
  
 con tuberculosis de un porcentaje de animales abatidos en las acciones cinegéticas de  
 las mismas (datos no incluidos en este documento).  
  
  
 La toma de muestras se realizó mediante hisopo rectal con medio AMIES (DELTALAB) de  
  
 37 animales jóvenes menores de un año, incluyendo animales vivos capturados  
  
 mediante capturaderos y animales muertos abatidos en monterías. Los hisopos rectales  
 fueron transportados al laboratorio y conservados a 4 ºC durante un máximo de dos días  
  
 hasta su procesamiento. Tras la toma de muestras, los animales vivos fueron liberados  
 inmediatamente a su hábitat natural.  
  
  
  
 Tabla 1.1. Información general sobre las fincas incluidas en el estudio  
  
  
 Fincas del estudio  
  
 1 2 3 4  
  
 Localización Cuenca Badajoz Ciudad Real Cáceres  
  
 (40° 7’ 53.77’’N (38° 58’ 44.6’’N / (39° 2’ 8.35’’N/ (39º 48’ 28.84’’ N/  
 / 2° 31’ 2.9’’O) 5°8’ 53.37’’O) 4° 10’ 27.89’’O) 5°55’ 59,88’’ O)  
  
 Área (Ha) 800 500 2500 4900  
  
 Vallado perimetral Cerramiento Cerramiento Cerramiento Abierta  
 cinegético cinegético cinegético  
  
 Densidad (jabalíes 45 75 35 15  
 / Km2)  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 97

Página 98:  
 LAB | Capítulo I  
  
  
 Fincas del estudio  
  
 1 2 3 4  
  
 Alimentación Recursos Recursos naturales Recursos Recursos naturales  
 naturales y y suplementación naturales y  
 suplementación con maíz y pienso suplementación  
  
 con pienso especial para jabalí con suero  
 especial para lácteo, pienso  
 jabalí y cereal especial para  
  
 en siembras jabalí y cereal  
  
 Ración de la Ad libitum 0.7 kg / animal Ad libitum Sin  
 suplementación suplementación  
  
 Cohábitat con Corzo Ciervo común Ciervo común Ciervo común  
 otros ungulados (Capreolus (Cervus elaphus) y (Cervus (Cervus elaphus)  
 capreolus) muflón europeo elaphus),  
  
 (Ovis musimon) muflón europeo  
 (Ovis musimon)  
 y corzo  
 (Capreolus  
  
 capreolus)  
  
 Prevalencia de 0 0 0 20  
 lesiones de TB (%)  
  
 Otras No se detecta Chlamydia Salmonella Sin información  
 enfermedades Mal rojo cholerasuis,  
 (Erysipelothrix Escherichia coli,  
  
 rhusiopathiae) Pasteurella  
 multocida B  
  
  
  
2. Aislamiento y selección de bacterias ácido-lácticas con potencial antimicrobiano  
  
 En el laboratorio de microbiología, se introdujeron los hisopos en 10 mililitros (mL) de  
 agua de peptona (Oxoid) y se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en  
  
 medio MRS agar (de Man, Rogosa and Sharpe, Oxoid), selectivo para el aislamiento de  
  
 BAL. Tras la incubación de las placas en microaerofilia a 37 ºC durante 48-60 horas (h)  
 se seleccionaron las placas que tuvieran un número aproximado de 20 a 100 colonias.  
  
 De estas placas se inocularon 70 colonias diferentes morfológicamente en una  
  
  
  
  
 98 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 99:  
 LAB | Capítulo I  
  
 microplaca de 96 pocillos (Thermo Scientific™ Nunc™ MicroWell™) con caldo MRS y se  
  
 incubaron a 37ºC durante 48 h en microaerofilia.  
  
  
 Se utilizaron dos bacterias indicadoras de actividad antimicrobiana para realizar una  
 primera selección de BAL con potencial inhibitorio. Por un lado, se usó Mycobacterium  
 smegmatis mc2155, que es una micobacteria no patógena de rápido crecimiento que ha  
 sido utilizada previamente para un cribado rápido de actividad antimicobacteriana  
  
 (Stedman et al., 2018) y, por otro, se utilizó Micrococcus luteus ATCC4698, una bacteria  
 altamente sensible a la actividad antimicrobiana del pH, de las bacteriocinas y otros  
  
 compuestos secretados (Stedman et al., 2020). M. smegmatis se cultivó en caldo TSB  
  
 (Oxoid) suplementado con 0,05 % de Tween 80 (Sigma) durante 37 ºC durante 48 h a  
 200 rpm en un agitador orbital y M. luteus se cultivó en las mismas condiciones, pero en  
  
 TSB sin suplementar. Los aislados crecidos en MRS fueron inoculados mediante un  
 replicador (Scienceware® 96-well replicator, Sigma-Aldrich) en el medio agar Triptona  
  
 Soja (TSA, Oxoid) con la bacteria indicadora previamente sembrada de forma masiva.  
 Las placas se incubaron 37 ºC durante 48 h y las colonias que mostraron actividad  
  
 antimicrobiana, detectada mediante la presencia de halos de inhibición, se identificaron  
 mediante tinción de Gram, pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa y secuenciación  
  
 del gen 16S de ARN ribosómico (ARNr, LGC Genomics). Se realizó una primera selección  
  
 diferentes especies de bacterias con distinta morfología y características tintoriales de  
 los animales pertenecientes a las diferentes fincas. Las BAL seleccionadas se  
  
 conservaron con glicerol al 15 % a -80ºC.  
  
  
  
3. Cocultivos de bacterias ácido-lácticas con M. bovis BCG y determinación de la tasa de  
  
 supervivencia  
  
 Para la confirmación de la actividad antimicrobiana frente a micobacterias, se realizaron  
  
 cocultivos de las BAL seleccionadas y dos cepas de M. bovis BCG: BCG Pasteur y BCG  
 ΔleuD pASOriMXF (Brosch et al., 2000; Stedman, 2017). Ambas cepas se cultivaron en  
  
 caldo Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con 10 % Ácido Oleico-Albúmina-Dextrosa  
  
 (OADC, Sigma-Aldrich), 0,05 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich), 0,2 % glicerol y 40 µg/mL  
 kanamicina a 37 ºC en agitador orbital a 225 rpm durante 5-7 días. BCG ΔleuD pASOriMXF  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 99

Página 100:  
 LAB | Capítulo I  
  
 expresa la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP) de manera que  
  
 su crecimiento puede monitorizarse mediante la medición de la fluorescencia (Borsuk  
 et al., 2007).  
  
  
 Las BAL de forma individual y las cepas de BCG se cocultivaron en medio Mueller Hinton  
  
 (MH) suplementado con 10 % Ácido Oleico-Albúmina-Dextrosa (OADC, Sigma-Aldrich),  
 0,05 % de Tween 80 (Sigma-Aldrich) y 0,2 % de glicerol, a una concentración inicial de 5  
 · 108 unidades formadoras de colonias (ufc)/ mL y 5 · 106 ufc/mL, respectivamente. Estas  
 condiciones son óptimas para el crecimiento de ambos tipos de bacterias, sin perjudicar  
  
 a ninguna de ellas (Stedman et al., 2018). Los cocultivos y sus correspondientes  
  
 controles (monocultivos) se incubaron a 37 ºC durante 48 h y se tomaron muestras a  
 tiempo 0, 24 y 48 h para determinar la tasa de supervivencia de M. bovis.  
  
  
 La tasa de supervivencia de M. bovis BCG en los cocultivos se determinó de forma  
  
 directa, mediante recuento de bacterias en medio selectivo, y de forma indirecta,  
 mediante medición de la expresión de GFP. El medio selectivo utilizado fue Middlebrook  
  
 7H10 (Difco) suplementado con 5 % OADC y 0,2 % de glicerol, que permite el crecimiento  
 de micobacterias e inhibe el crecimiento de BAL. También se realizaron recuentos de  
  
 BAL para monitorear su crecimiento en medio MRS. Los resultados se expresaron como  
  
 log10 de las ufc/mL. La expresión de fluorescencia en los cocultivos se midió a 485/535  
 nanómetros (nm) en el lector DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter) y la  
  
 expresión de GFP se indicó mediante unidades de fluorescencia (Fluorescence Units,  
 FU).  
  
  
  
4. Evaluación del efecto de determinados parámetros sobre la actividad encontrada  
 frente a M. bovis BCG  
  
 Se midió el pH de los cocultivos mediante un pH-metro (Hanna) a tiempo inicial (0 h) y  
 final (48 h) para determinar el efecto del pH en la tasa de supervivencia de M. bovis.  
  
 Además, con este mismo objetivo, se monitorizó la tasa de supervivencia del  
  
 monocultivo de M. bovis BCG en el mismo medio MH-OADC-TW80-Gly a pH7 y pH4,5.  
  
  
  
 100 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 101:  
 LAB | Capítulo I  
  
 Para determinar el efecto de los metabolitos producidos por las BAL que mostraron  
 actividad, la cepa BCG ΔleuD pASOriMXF se cultivó a una concentración de 5 · 108 ufc/mL  
 en los sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos de dichas BAL, libres de células  
  
 microbianas, que fueron propagadas en el medio MH-OADC-TW80-Gly. Esta misma cepa  
 fue también cultivada en los sobrenadantes del cocultivo entre las BAL que mostraron  
  
 actividad y M. bovis BCG, para comprobar si la presencia del patógeno puede potenciar  
 la producción de componentes antimicrobianos por parte de las BAL. El sobrenadante  
  
 se utilizó a dos concentraciones: directamente obtenido del cocultivo sin diluir y  
 también diluido en proporción 1:1 en el mismo medio indicado. Por último, para  
  
 detectar un posible efecto inductor de los metabolitos de M. bovis BCG sobre la  
  
 producción de metabolitos con capacidad antimicobacteriana, se cultivó M. bovis BCG  
 en sobrenadantes obtenidos del cultivo de las BAL que mostraron actividad en  
  
 sobrenadantes del monocultivo de BCG en el mismo medio indicado, sin diluir y diluido  
 1:1 y bajo las condiciones descritas anteriormente.  
  
  
 Todos estos experimentos fueron realizados con ajuste de pH a 7 y 4.5 para determinar  
  
 un posible efecto sinérgico entre el pH y los metabolitos antimicrobianos. Todos los  
 sobrenadantes se obtuvieron mediante centrifugación a 5000 rpm. La tasa de  
  
 supervivencia se calculó de la misma manera indicada anteriormente, mediante la  
  
 emisión de fluorescencia (GFP) y se expresó en FU.  
  
  
  
5. Secuenciación completa del genoma y confirmación de las especies  
  
 Las BAL con actividad antimicrobiana potencial en el procedimiento de cribado frente a  
 M. smegmatis y frente a M. luteus que fueron seleccionadas de ambos grupos de  
  
 estudio, fueron enviadas a MicrobesNG, de la Universidad de Birmingham (Reino Unido)  
 para la secuenciación completa del genoma mediante la plataforma Illumina MiSeq, tras  
  
 la extracción del ADN con el kit EZNA® (Omega Bio-Tek, USA). El ADN de cada aislado fue  
 secuenciado utilizando lecturas de de 2 x 250 pares de bases (bp) (paired-end, desde  
  
 ambos extremos). La calidad de las lecturas generadas se evaluó mediante la  
  
 herramienta Trimmomatic. Los genomas fueron ensamblados a partir de las lecturas  
 utilizando Shovill versión 1.0.4 con SPAdes 3.13.0 (Bankevich et al., 2012). La calidad del  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 101

Página 102:  
 LAB | Capítulo I  
  
 ensamblaje se evaluó mediante N50 y L50 utilizando Quast versión 4.5 (Gurevich et al.,  
  
 2013) y las anotaciones se generaron mediante Prokka versión 1.13 (Seemann, 2014).  
 La confirmación de la identificación de las especies bacterianas se realizó mediante las  
  
 herramientas online StrainSeeker y ANItools (Han et al., 2016; Roosaare et al., 2017),  
 que permite una identificación rápida y fiable que especies mediante comparación de  
  
 los genomas con cepas bacterianas relacionadas.  
  
  
  
6. Identificación de genes que codifican para la producción de metabolitos  
  
 antimicrobianos y moléculas inmunomoduladoras  
  
 La identificación de clústeres de genes asociados a la producción de bacteriocinas se  
  
 realizó mediante el software online BAGEL4 (van Heel et al., 2018). Este software  
  
 permite una identificación rápida y fiable de todo tipo de clústeres de bacteriocinas, que  
 frecuentemente están compuestos por genes que codifican para un precursor (pre-  
  
 bacteriocina), proteínas encargadas del transporte y procesamiento de la pre-  
 bacteriocina a bacteriocina activa, enzimas encargadas de modificaciones  
  
 postraduccionales y proteínas inmunitarias. Además, la anotación de los genomas se  
 utilizó para detectar la presencia o ausencia fructosa-6-fosfato aldolasa y fosfocetolasa,  
  
 dos enzimas que participan en las dos rutas metabólicas glucolíticas principales: la ruta  
 Embden-Meyerhof (EMP) y la ruta de la fosfocetolasa (PKP) (Papagianni, 2012). Las BAL  
  
 homofermentativas convierten los azúcares en ácido láctico mediante la ruta EMP,  
  
 mientras que las heterofermentativas producen ácido láctico, ácido acético, etanol y  
 dióxido de carbono (CO2) mediante la ruta PKP. Las anotaciones se utilizaron también  
  
 para identificar genes asociados con la producción de peróxido de hidrógeno (H2O2),  
 incluyendo genes que codifican para la piruvato oxidasa (Pox), lactato oxidasa (Lox) y  
  
 NADH oxidasas, y también genes que codifican para NADH peroxidasas.  
  
  
 Las anotaciones de los genomas también permitieron la búsqueda de componentes  
 microbianos de la pared bacteriana y la membrana celular previamente relacionados  
  
 con la activación de macrófagos mediante TLR y/o receptores fagocíticos como  
  
 exopolisacáridos (EPS), precursores fimbriales, ácido teicoico y lipoteicoico (WTA, LTA)  
 y adhesinas (Hevia et al., 2015; Sengupta et al., 2013; Van Tassell y Miller, 2011).  
  
  
 102 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 103:  
 LAB | Capítulo I  
  
7. Nivel de expresión de genes relacionados con precursores de bacteriocinas  
  
 Se determinó el nivel de expresión de genes que codifican para precursores de  
 bacteriocinas en los aislados que mostraron actividad antimicrobiana frente a M. bovis  
  
 BCG. El ARN total se extrajo de los aislados de BAL en monocultivo y en cocultivo con  
 BCG a diferentes concentraciones (106 y 107 ufc/mL) utilizando el kit High Pure RNA  
  
 Isolation (Roche Diagnostics Limited). Las muestras se tomaron durante la fase de  
 crecimiento exponencial a una densidad óptica medida a 600 nm (OD600nm) de 0,6. El  
  
 ARN se trató con TURBO DNasa (Ambion) para eliminar posibles contaminaciones de  
 ADN genómico y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa  
  
 inversa (RT-PCR) mediante el SuperScript® III First-Strand Synthesis System de  
  
 Invitrogen. Los análisis se llevaron a cabo en el sistema QuantStudio 7 Flex Real-Time  
 PCR (Applied Biosystems) utilizando la SYBR Master Mix (Applied Biosystems) y los  
  
 cebadores específicos que se muestran en el apéndice IA.  
  
  
 Los transcritos de ARN se amplificaron en placa de 96 pocillos utilizando tres réplicas  
 técnicas obtenidas de al menos dos réplicas biológicas. Se utilizó el método ΔΔCT para  
  
 el cálculo de la cuantificación relativa de la expresión de ARN mensajero (ARNm) en los  
 monocultivos de BAL y en los cocultivos a diferentes concentraciones de M. bovis BCG.  
  
 El nivel de expresión génica se normalizó utilizando los transcritos constitutivos gyrA y  
  
 dnaG, como ha sido recomendado previamente (Rocha et al., 2015). Los resultados se  
 expresaron en log2.  
  
  
  
8. Ensayo de fagocitosis con células sanguíneas porcinas  
  
 Se realizó la toma de muestras de sangre completa en tubos heparinizados de cerdos  
  
 sanos del Pirbright Institute (Reino Unido), que tiene licencia para la realización de este  
 tipo de procedimiento animal (UK Home Office, Animal Scientific Procedures Act1986).  
 100 µL de sangre con una cantidad estimada de 106 leucocitos se diluyeron en  
 proporción 1:1 con 10 mM de EDTA (EDTA-PBS) y fueron expuestos a M. bovis BCG ΔleuD  
 pASOriMXF en combinación con cada una de las BAL. La multiplicidad de la infección (MOI)  
  
 fue de 10 bacterias por cada célula sanguínea. Se utilizaron monocultivos de todas las  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 103

Página 104:  
 LAB | Capítulo I  
  
 bacterias como controles. El cocultivo de células sanguíneas y las bacterias se incubó en  
  
 un agitador orbital a 37ºC durante 30 minutos y después de esta incubación se lisaron  
 las células mediante la solución de lisis RBC (Biologend) 1 x seguida de incubación a  
  
 temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con EDTA-  
 PBS, fueron resuspendidas en PBS y procesadas por el citómetro de flujo BD FACS  
  
 Celesta. Se midieron diferentes parámetros: la dispersión frontal (FSC) y la dispersión  
 lateral (SSC) fueron utilizados para distinguir las principales poblaciones sanguíneas en  
  
 función de su tamaño y granularidad (por ejemplo, linfocitos vs. fagocitos), mientras que  
 el canal FITC permite medir diferentes intensidades de fluorescencia emitida (GFP) en  
  
 las células sanguíneas que se unen (ej. linfocitos) y/o fagocitan (ej. fagocitos como  
  
 monocitos y polimorfonucleares tales como neutrófilos) a la micobacteria. El diagrama  
 resultante SCC/GFP se utilizó para evaluar la influencia de las BAL en la fagocitosis.  
  
  
  
9. Estudio estadístico  
  
 El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 8.00 para Windows  
  
 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Los datos se  
 muestran con la media ± DE (desviación estándar) y representan tres réplicas biológicas.  
  
 Las diferencias entre aislados se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba LSD  
 (Least Significant Difference) de Fisher.  
  
  
  
  
  
 104 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 105:  
 LAB | Capítulo I  
  
Figura resumen del método  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 105

Página 106:  
LAB | Capítulo I  
  
RESULTADOS  
  
  
  
Jabalíes con diferente situación epidemiológica con relación a la TB muestran  
  
diferentes perfiles de BAL comensales y actividad antimicobacteriana  
  
Se obtuvieron un total de 30 BAL aisladas de hisopos rectales de jabalíes con capacidad  
para inhibir el crecimiento de M. smegmatis mc2155 y/o M. luteus (Figura 1.1, Tabla 1.2).  
  
La identificación de los aislados mediante 16S ARNr arrojó 7 especies diferentes:  
Lactiplantibacillus plantarum, Ligilactobacillus salivarius, Lacticaseibacillus paracasei,  
  
Pediococcus acidilactici, Enterococcus faecalis, Pediococcus lolii y Escherichia coli. Se  
encontraron dos perfiles muy diferenciados, que fueron divididos en grupo 1 y grupo 2.  
  
El grupo 1 se corresponde con un perfil predominante de lactobacilos (bacterias que  
anteriormente pertenecían al género Lactobacillus, recientemente reclasificado), e  
  
incluye a las fincas 1, 2 y 3, que están libres de TB. Por el contrario, en el grupo 2 se ha  
encontrado un perfil predominante de enterococos, que se corresponde con la finca 4,  
  
con una alta prevalencia de TB. Los pediococos se encontraron en ambos grupos. Los  
  
resultados se muestran resumidos de forma gráfica en la figura 1.2.  
 A B  
  
  
  
  
  
Figura 1.1. Cribado de actividad antimicrobiana. La placa madre o placa primaria muestra las BAL aisladas  
(A) y el ensayo de actividad frente a M. smegmatis muestra algunos aislados con actividad antimicrobiana  
(halos de inhibición, B).  
  
  
  
  
 106 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 107:  
 LAB | Capítulo I  
  
  
Tabla 1.2. Identificación mediante secuenciación del gen 16S de ARNr de las 30 cepas de 4 poblaciones  
 de jabalíes  
  
 Población de jabalíes Cepa  
  
 Finca 1 Lactiplantibacillus plantarum strain TMW 1.1623  
  
 Finca 1 Ligilactobacillus salivarius strain JCM1046  
  
 Finca 1 Lacticaseibacillus paracasei strain IIA  
  
 Finca 1 Pediococcus acidilactici strain BCC1  
  
 Finca 1 Pediococcus acidilactici strain ZPA017  
  
 Finca 1 Lactiplantibacillus plantarum strain TMW  
  
 Finca 1 Ligilactobacillus salivarius strain CICC 23174  
  
 Finca 1 Ligilactobacillus salivarius strain CICC 23174  
  
 Finca 1 Ligilactobacillus salivarius strain 32  
  
 Finca 1 Ligilactobacillus salivarius strain 32  
  
 Finca 1 Ligilactobacillus salivarius strain CICC 23174  
  
 Finca 1 Pediococcus acidilactici strain BCC1  
  
 Finca 1 Ligilactobacillus salivarius strain CICC 23174  
  
 Finca 1 Ligilactobacillus salivarius strain CICC 23174  
  
 Finca 1 Pediococcus acidilactici strain BCC1  
  
 Finca 1 Ligilactobacillus salivarius strain CICC 23174  
  
 Finca 2 Lactiplantibacillus plantarum strain TMW  
  
 Finca 2 Lactiplantibacillus plantarum strain TMW 1.1623  
  
 Finca 3 Lactiplantibacillus plantarum strain TMW 1.1623  
  
 Finca 3 Lacticaseibacillus paracasei strain IIA  
  
 Finca 4 Enterococcus faecalis strain sorialis  
  
 Finca 4 Enterococcus faecalis strain NCIM5025  
  
 Finca 4 Enterococcus faecalis strain Cp5 16S  
  
 Finca 4 Enterococcus faecalis strain NCIM5025  
  
 Finca 4 Enterococcus faecalis strain NCIM5025  
  
 Finca 4 Pediococcus lolii strain CJ66  
  
 Finca 4 Escherichia coli isolate RAD07 16S  
  
 Finca 4 Enterococcus spp. strain Y-52  
  
 Finca 4 Enterococcus faecalis strain NRIC 0111  
  
 Finca 4 Enterococcus faecalis strain NCIM5025  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 107

Página 108:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
  
Figura 1.2. Localización geográfica de las 4 fincas de estudio (puntos), la prevalencia de lesiones  
compatibles con TB se muestra al lado de cada punto y el perfil de BAL encontrado se indica mediante  
una imagen de las bacterias predominantes. Las regiones coloreadas en el mapa muestran la clasificación  
del riesgo de TB en fauna silvestre en las comarcas de España (Ministerio de Agricultura, Pesca y  
Alimentación, datos de 2020). Todas las fincas muestreadas se encuentran en zonas con alto riesgo de TB  
para la fauna silvestre, siendo el perfil predominante de lactobacilos en los jabalíes que habitan en fincas  
con estado libre de la enfermedad.  
  
  
Tras la primera selección de las especies de bacterias con actividad antimicrobiana  
potencial en el estudio de cribado con distinta morfología y características tintoriales  
  
(Figura 1.3, Tabla 1.3), se seleccionó una representación de las diferentes especies  
  
identificadas mediante secuenciación parcial del gen 16S que incluyese aislados que  
proviniesen de diferentes animales y fincas para el estudio de las propiedades  
  
antimicobacterianas y la secuenciación completa del genoma. La mayoría de las especies  
se confirmaron mediante secuenciación complete del genoma, a excepción de R91 que  
  
fue finalmente P. acidilactici y R95 que fue E. casseliflavus. La selección final de cepas se  
encuentra en la tabla 1.3.  
  
  
  
  
  
 108 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 109:  
 LAB | Capítulo I  
  
  
 Tabla 1.3. Selección final de aislados  
  
 Grupo Finca Identificación Especie  
  
 Fincas libres de TB 1 C1 Lactiplantibacillus plantarum  
  
 1 C2 Ligilactobacillus salivarius  
  
 1 C12 Ligilactobacillus salivarius  
  
 1 C5 Pediococcus acidilactici  
  
 2 EML1 Lactiplantibacillus plantarum  
  
 3 SA3 Lactiplantibacillus plantarum  
  
 3 SA5 Lacticaseibacillus paracasei  
  
 Finca con alta 4 A1 Enterococcus faecalis  
 prevalencia de TB 4 R8 Enterococcus faecalis  
  
 4 R91 Pediococcus acidilactici  
  
 4 R95 Enterococcus casseliflavus  
  
  
 A B  
  
  
  
  
  
 C D  
  
  
  
  
  
Figura 1.3. Tinción de Gram y observación al microscopio de inmersión de las especies L. plantarum (A),  
 L. paracasei (B), P. acidilactici (C) y E. faecalis (D).  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 109

Página 110:  
LAB | Capítulo I  
  
Las bacterias ácido-lácticas de los jabalíes que habitan en fincas libres de TB inhiben  
  
M. bovis y poseen genes que codifican la producción de metabolitos antimicrobianos,  
incluidas bacteriocinas  
  
Las 11 cepas seleccionadas se cocultivaron con M. bovis BCG Pasteur y la cepa ΔleuD  
pASOriMXF que expresa la proteína fluorescente GFP. Los lactobacilos del grupo 1, fincas  
  
libres de TB, redujeron significativamente la emisión de GFP (Figuras 1.4A y 1.4B) y esta  
reducción se correlacionó positivamente con los recuentos de la micobacteria (Apéndice  
  
IB). Por el contrario, los enterococos del grupo 2, finca con alta prevalencia de TB,  
mostraron un efecto antimicobacteriano mucho más limitado, con una reducción hasta  
  
dos veces menor a que la observada por los lactobacilos. Es muy interesante que esta  
  
diferencia antimicrobiana por grupos también se diese en el caso de los pediococos, que  
fueron encontrados en ambos. El aislado P. acidilactici C5 proveniente del grupo de  
  
fincas libres de TB mostró una gran capacidad inhibitoria frente a la micobacteria,  
mientras que la misma especie bacteriana aislada de la finca con alta prevalencia de TB  
  
mostró una inhibición significativamente menor (p<0.0001).  
  
  
Para tratar de correlacionar el efecto antimicobacteriano de los aislados con su  
genotipo, se realizó una búsqueda de compuestos antibacterianos en los genomas  
  
(Figura 1.4C y 1.4D). Las anotaciones del genoma nos permitieron identificar los genes  
  
que codifican para las enzimas fructosa-6-fosfato aldolasa y fosfocetolasa en todos los  
aislados de lactobacilos, demostrando su papel como heterofermentadores facultativos.  
  
Nuestros aislados son capaces de convertir carbohidratos en lactato utilizando la ruta  
EMP y / o producir lactato en combinación con etanol, acetato y dióxido de carbono  
  
como metabolitos antimicrobianos a través de la ruta PKP. Además, todos los aislados  
albergan genes asociados con la producción de H2O2: Pox, Lox y / o NADH oxidasas, así  
  
como NADH peroxidasa. El número de marcadores de H2O2 disminuye progresivamente  
en los pediococos y enterococos. Los aislados de Pediococcus y E. casseliflavus también  
  
son heterofermentadores facultativos, pero sus genomas solo albergan un gen PKP. Por  
  
el contrario, los dos E. faecalis actúan como homofermentadores obligados ya que sus  
genomas solo poseen el gen de la fructosa-6-fosfato aldolasa, que convierte los azúcares  
  
en lactato a través de EMP.  
  
  
  
 110 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 111:  
 LAB | Capítulo I  
  
El análisis del genoma de BAGEL4 identificó grupos de genes implicados en la síntesis de  
  
bacteriocinas de clase II y III, incluidas bacteriocinas de un solo péptido en L. salivarius  
C12 (Apéndice IC); bacteriocinas de dos péptidos en todas las cepas de L. plantarum y L.  
  
paracasei SA5 (Apéndice ID), y bacteriolisinas en todos los aislados de lactobacilos  
(Apéndice IE). Los dos precursores de bacteriocina de un solo péptido identificados en  
el genoma de L. salivarius (Ta, Tb) muestran una homología muy alta con dos  
  
bacteriocinas de clase II de L. salivarius BGH01 (Busarcevic y Dalgalarrondo, 2012),  
  
mientras que los dos precursores los genomas de los aislados de L. plantarum (plnE,  
plnF) son idénticos a los genes precursores de plantaricina plnE y plnF de L. plantarum  
  
C11 (Anderssen et al., 1998). Los precursores de bacteriocina de dos péptidos que se  
encuentran en el genoma de L. paracasei SA5 (A, B) también fueron idénticos a dos  
  
bacteriocinas hipotéticas de clase II de L. paracasei DPC6800 (Stefanovic et al., 2016) y  
L. paracasei UCD174 (Broadbent et al., 2012). Por otro lado, los genes de las  
  
bacteriolisinas que identificamos en todos los genomas de los lactobacilos codifican  
  
enzimas que hidrolizan los peptidoglicanos de la pared celular entre ácido N-  
acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamida, o entre N-acetilmuramoílo y residuos L-aa.  
  
Estas enzimas normalmente tienen un sitio de reconocimiento de diana y un dominio  
catalítico que muestra homología con endopeptidasas, muramidasas o amidasas (Cotter  
  
et al., 2005). Además, a diferencia de los grupos de bacteriocina de clase II, las  
bacteriolisinas no tienen genes de inmunidad específicos que acompañen a los genes  
  
precursores de bacteriocina, ya que dependen de modificaciones de la pared celular  
productora para inferir resistencia. Las bacteriolisinas identificadas fueron muy  
  
abundantes en L. salivarius C2, seguidas de L. salivarius C12 y L. paracasei SA5 (Apéndice  
  
IE). Las cepas de L. plantarum solo comparten dos de ellas con el resto de los aislados.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 111

Página 112:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
  
Figura 1.4. Las BAL aisladas de jabalíes libres de TB muestran una fuerte actividad antimicobacteriana y  
sus genomas contienen genes que codifican bacteriocinas y una gran variedad de metabolitos  
antimicrobianos secundarios. (A) Reducción en las unidades de fluorescencia (FU) emitidas por M. bovis  
BCG en cocultivos con las BAL tras 48 h de incubación. La reducción de la FU se calculó utilizando al menos  
2 réplicas biológicas y fue normalizada con la FU de M. bovis BCG en monocultivo. (B) Reducción en el  
recuento de colonias de M. bovis BCG en monocultivo (izquierda) con respecto al cocultivo (derecha) con  
un aislado de lactobacilo. (C) Clústeres de bacteriocinas de clase II identificadas en el genoma de los  
lactobacilos. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep  
et al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de  
modificación postraduccional (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas  
hipotéticas (gris). (D) Genes asociados con la producción y acumulación de H2O2 (verde y naranja) y otros  
metabolitos secundarios como lactato, acetato, etanol y CO2 (azul) en los aislados. Se muestra la  
proporción en la barra y el número de genes encontrados en blanco.  
  
  
  
  
  
 112 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 113:  
 LAB | Capítulo I  
  
  
  
Los metabolitos producidos por los lactobacilos reducen la tasa de supervivencia de  
  
BCG a pH ácido  
  
Se monitorizó el pH de los cocultivos y se observó que los lactobacilos disminuían el pH  
  
hasta 4,5, más que los enterococos. Debido a esto y a que el pH de los monocultivos  
apenas descendió de 7 a 6,8 se realizaron los diferentes experimentos para demostrar  
  
si el pH ácido de este grupo de bacterias podría tener una influencia sobre la actividad  
encontrada. Sin embargo, la viabilidad de BCG no se alteró al ser cultivada a pH 4,5, es  
  
decir, no se observó una reducción en los recuentos bacterianos ni en la emisión de GFP.  
  
Estos experimentos confirman que el pH ácido es insuficiente para explicar el efecto  
negativo sobre la supervivencia de BCG.  
  
  
Para comprobar si el efecto antimicrobiano encontrado en los lactobacilos se debe a la  
  
acumulación de metabolitos tóxicos, se monitorizó la tasa de supervivencia de M. bovis  
BCG en sobrenadantes obtenidos a partir de monocultivos de lactobacilos y de cocultivo  
  
entre lactobacilos y BCG, tras 24 h de incubación. Para estos experimentos, la tasa de  
supervivencia se registró únicamente como emisión de GFP, ya se observó una  
  
correlación positiva muy significativa entre los recuentos bacterianos totales y la  
emisión de GFP (Apéndice IB). Se recogieron sobrenadantes libres de células tanto de  
  
monocultivos de lactobacilos como de cocultivos de lactobacilos y M. bovis BCG para  
  
determinar si la presencia de M. bovis puede actuar como un inductor de la producción  
de compuestos antimicrobianos por parte de los lactobacilos. Se realizó la toma de  
  
muestras de sobrenadante a las 24 h, ya que los lactobacilos experimentaron un  
aumento logarítmico significativo en los recuentos bacterianos durante este tiempo  
  
(Figura 1.5). No se encontraron diferencias significativas en los recuentos bacterianos ni  
en los pH de los cultivos de lactobacilos, tanto monocultivos como cocultivos. Como se  
  
ilustra en la Figura 1.6, se observaron reducciones muy significativas con todos los  
sobrenadantes de cultivo, ya sea de monocultivos o cocultivos con BCG, especialmente  
  
después de 48 h. Esto demostró que la actividad antimicobacteriana de los lactobacilos  
  
en cocultivos podría deberse al efecto combinado del pH ácido y la acumulación de  
metabolitos antimicrobianos derivados de los lactobacilos.  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 113

Página 114:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
  
Figura 1.5. Recuentos bacterianos de los aislados de L. plantarum (A) y de L. salivarius y L. paracasei (B)  
como monocultivos (barras negras) y cocultivos con BCG (barras grises) tras una incubación de 0, 24 y 48  
h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). Los recuentos bacterianos se expresan  
como log10 (CFU / mL)  
  
  
  
  
  
Figura 1.6. Tasa de supervivencia de M. bovis BCG después de 48 horas (h) de incubación en  
sobrenadantes ácidos (pH 4,5) libres de células obtenidos a partir de de monocultivos de lactobacilos  
(izquierda) o cocultivos de M. bovis BCG con lactobacilos (derecha) en caldo MH con OADC (10%), Tween  
80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia de M. bovis BCG para ambas condiciones se calculó a  
partir de la expresión de GFP (FU, barras grises) y se comparó con sus correspondientes controles (barras  
  
 114 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 115:  
 LAB | Capítulo I  
  
negras). Los controles se cultivaron con BCG en sobrenadantes libres de células obtenidos de un caldo MH  
incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (lado izquierdo) y monocultivos  
de BCG de 24 h en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (lado derecho), ambos a  
pH 4,5. Los datos son media±DE con análisis estadístico (prueba t de Student, \*\*p <0,01, \*\*\*p<0.005,  
\*\*\*\*p<0.001) y son representativos de 3 réplicas biológicas cada uno.  
  
(A) Tasa de supervivencia de M. bovis BCG tras 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de  
monocultivos de L. plantarum C1, EML1, SA3 (izquierda) o cocultivos de M. bovis BCG con las cepas de L.  
plantarum (derecha). (B) Tasa de supervivencia de M. bovis BCG después de 0, 24 y 48 h de incubación en  
sobrenadantes de monocultivos de L. salivarius C2 y C12 y L. paracasei SA5 (izquierda) o cocultivos de M.  
bovis BCG con las cepas de L. salivarius y L. paracasei (derecha).  
  
  
Los metabolitos de los cocultivos de L. plantarum con M. bovis BCG reducen la tasa de  
supervivencia de M. bovis independientemente del pH y la suplementación de  
  
nutrientes  
  
Para confirmar el efecto antimicobacteriano de los metabolitos producidos por los  
  
lactobacilos, realizamos los mismos experimentos descritos anteriormente con los  
sobrenadantes, tanto en monocultivos como en cocultivos con M. bovis BCG, pero a pH  
  
7, para excluir el efecto antimicrobiano del pH ácido. También incluimos una tercera  
condición experimental al diluir los sobrenadantes en medios de cocultivo frescos para  
  
determinar la influencia de la alteración de nutrientes causada por el metabolismo de  
los lactobacilos. En el caso de los aislados de L. plantarum, no se observaron reducciones  
  
significativas en la supervivencia de M. bovis BCG usando los sobrenadantes obtenidos  
  
a partir de sus monocultivos (Figura 1.7). Sin embargo, la reducción fue muy significativa  
cuando utilizamos los sobrenadantes obtenidos a partir de los cocultivos de las 3 cepas  
  
de L. plantarum con BCG. Estos resultados sugieren que nuestras cepas de L. plantarum  
producen ciertos metabolitos antimicobacterianos en mayor cantidad en presencia de  
  
M. bovis BCG, que actuaría como inductor. Además, esta actividad antimicrobiana  
inducida parece ser estable a diferentes rangos de pH y con distinta composición de  
  
nutrientes.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 115

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

Página 117:  
 LAB | Capítulo I  
  
El efecto antimicobacteriano de los metabolitos de L. salivarius y L. paracasei depende  
del pH y, en el caso de L. paracasei, de la presencia del inductor  
  
Igual que en el caso anterior, no se encontraron reducciones significativas en la  
supervivencia de M. bovis BCG utilizando los sobrenadantes obtenidos de monocultivos  
  
de L. salivarius y L. paracasei a pH 7, con o sin suplementación de nutrientes (Figura 1.8).  
De hecho, la supervivencia de BCG aumentó en los sobrenadantes que provenían de los  
  
monocultivos de L. salivarius sin suplementación y los sobrenadantes recogidos de los  
cocultivos de L. salivarius y BCG, lo que confirma que el efecto antimicobacteriano de  
  
las cepas de L. salivarius es dependiente del pH. Por el contrario, la tasa de supervivencia  
de BCG disminuyó ligeramente en los sobrenadantes derivados de cocultivos de L.  
  
paracasei y BCG, lo que sugiere un papel de BCG como inductor de la producción de  
compuestos antimicrobianos en L. paracasei. No obstante, esta inducción parece tener  
  
un efecto significativamente menor que la observada con L. plantarum.  
  
  
  
  
  
Figura 1.8. Tasa de supervivencia de M. bovis BCG después de 48 h de incubación en sobrenadantes libres  
de células neutralizados (pH 7) y obtenidos a partir de monocultivos de 24 h de L. salivarius C2, y C12 y L.  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 117

Página 118:  
LAB | Capítulo I  
  
paracasei SA5 (izquierda) o de cocultivos de M. bovis BCG con las cepas de L. salivarius C2, y C12 y L.  
paracasei SA5 en caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%). La tasa de supervivencia  
de M. bovis BCG para ambas condiciones se monitorizó mediante la expresión de GFP (FU, barras grises  
claro para L. salivarius y gris oscuro para L. paracasei) y se comparó con sus controles correspondientes  
(barras negras), con o sin suplementación de nutrientes. Los controles de M. bovis BCG se incubaron en  
sobrenadantes libres de células obtenidos de caldo MH incubado durante 24 h con OADC (10%), Tween  
80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (izquierda) y monocultivos de M. bovis BCG incubados durante 24 h en caldo  
MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (derecha), ambos a pH 7. Los datos se expresan  
como media±DE con análisis estadístico (prueba t de Student, \* p<0,05, \*\* p <0,01) y representan 3  
réplicas biológicas cada uno.  
  
(A) Tasa de supervivencia de M. bovis BCG tras 0, 24 y 48 h de incubación en sobrenadantes de  
monocultivos de L. salivarius y L. paracasei (izquierda) y cocultivos de M. bovis BCG con las cepas de L.  
salivarius y L. paracasei (derecha). (B) Tasa de supervivencia de M. bovis BCG después de 0, 24 y 48 h de  
incubación en sobrenadantes de monocultivos de L. salivarius y L. paracasei (izquierda) y cocultivos de M.  
bovis BCG con las cepas de L. salivarius y L. paracasei (derecha) suplementados con caldo MH con OADC  
(10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una proporción de 1: 1. Los sobrenadantes de los controles  
también se suplementaron con caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en la misma  
proporción.  
  
  
  
Los metabolitos de BCG no influyen en la actividad antimicrobiana de L. plantarum y  
L. paracasei  
  
Para probar si el efecto inductor comentado anteriormente, dependía de la producción  
de metabolitos por parte de M. bovis BCG, en lugar de depender simplemente de las  
  
células microbianas, monitorizamos la tasa de supervivencia de M. bovis en  
  
sobrenadantes sin células derivados de cultivos de L. plantarum y L. paracasei que se  
propagaron durante 24 h en sobrenadantes M. bovis BCG. También incluimos dos  
  
condiciones experimentales adicionales al complementar los sobrenadantes con medios  
de cocultivo frescos, pero también al hacer crecer los lactobacilos en caldo de cocultivo  
  
fresco completo para considerar la posible influencia negativa de la alteración de  
nutrientes en el crecimiento de los lactobacilos. No se registraron diferencias  
  
significativas en los recuentos bacterianos registrados para los 3 tipos diferentes de  
cultivos de lactobacilos (Figura 1.9). El pH de los sobrenadantes de los cultivos de  
  
lactobacilos propagados en los sobrenadantes de M. bovis BCG fue ligeramente superior  
a 4,5 pero no se observaron diferencias significativas en comparación con los otros  
  
cultivos de lactobacilos. Como se ilustra en la Fig. S4, no se observaron reducciones  
  
significativas en la supervivencia de M. bovis usando los sobrenadantes obtenidos de los  
cultivos de L. plantarum desarrollados en sobrenadantes de cultivos de M. bovis BCG,  
  
 118 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 119:  
 LAB | Capítulo I  
  
con o sin suplementación de nutrientes. Estos datos sugieren que los metabolitos de M.  
  
bovis BCG no tienen ningún efecto inductor sobre la actividad antimicobacteriana de L.  
  
plantarum y L. paracasei, este efecto se debe a la presencia de las propias células  
microbianas de la micobacteria.  
  
  
  
  
 1 0 C 1 1 0 E M L 1  
  
  
  
 )L 8 )L 8  
 /m /m  
 U U  
 F F  
 0(C1 0(C1  
 g g  
 o L 6 oL 6  
  
  
  
  
 4 4  
 0 2 4 0 2 4  
  
 H o u rs H o u rs  
  
  
  
  
 1 0 S A 3 1 0 S A 5  
  
  
  
 )L 8 )L 8  
 /m /m  
 U U  
 F F  
 0(C1 0(C1  
 g g  
 o L 6 oL 6  
  
  
  
  
 4 4  
 0 2 4 0 2 4  
  
 H o u rs H o u rs  
  
  
  
Figura 1.9. Recuentos bacterianos de cultivos de cepas de L. plantarum C1, EML1 y SA3 y L. paracasei SA5  
tras una incubación de 0 y 24 h en: (i) sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo de M. bovis BCG  
(barras negras); (ii) sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo de M. bovis BCG suplementado con  
caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) en una proporción de 1: 1 (barras de color  
gris oscuro); y (iii) caldo MH con OADC (10%), Tween 80 (0,1%) y glicerol (0,2%) (barras de color gris claro).  
Los recuentos bacterianos están expresados como log10 (CFU / mL).  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 119

Página 120:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
Los genes que codifican las bacteriocinas de dos péptidos de L. plantarum y L.  
  
paracasei se sobreexpresan en presencia de células de M. bovis.  
  
Para determinar si la presencia de células de M. bovis puede regular el nivel de expresión  
de las bacteriocinas de clase II identificadas, realizamos una RT-PCR para cuantificar la  
  
cantidad de transcripciones derivadas de los genes precursores de bacteriocinas en L.  
plantarum C1, EML1 y SA3, L. salivarius C2 y L. paracasei SA5 (indicadas en verde en la  
  
parte superior de la figura 1.10). El ARN se obtuvo de cultivos de lactobacilos expuestos  
a concentraciones crecientes de células de M. bovis BCG durante la fase de crecimiento  
  
exponencial. Como se ilustra en la figura 1.11, el nivel de expresión de los genes plnE y  
plnF depende de la cantidad de células de M. bovis, puesto que se observa un aumento  
  
muy significativo de la expresión en comparación con los monocultivos de L. plantarum.  
Observamos resultados similares con los genes A / B de L. paracasei SA5 aunque el  
  
aumento en la expresión génica fue mucho menor. Por el contrario, la expresión de los  
genes Ta/ Tben L. salivarius C2 no se vio afectada por la presencia de células de M.  
  
bovis (Figura 1.10). Estos datos confirman, no solo el efecto inductor de las células de  
M. bovis BCG sobre la actividad antimicrobiana mostrada por L. plantarum y L.  
  
paracasei, sino también el posible papel de las bacteriocinas de dos péptidos en dicha  
  
actividad antimicobacteriana.  
  
  
  
  
  
 120 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 121:  
 LAB | Capítulo I  
  
  
 C1 SA5 C2  
  
 W V U T S H G E F A B C AT D E F G T2 T3T4TaTIM1TbTIM2TIP TK TR orf1 orf2 orf3 orf4 orf5 orf6  
  
 2,000 bp 2,000 bp 2,000 bp  
 3 3 3  
  
  
  
  
  
 l l l  
 e e e  
 v  
 le 2 vle 2 vle 2  
  
 n n n  
 io io io  
 s s s  
 s s s  
 e r 1 er 1 er 1  
 p p p  
 x x x  
 e e e  
  
 e e e  
 n n n  
 e 0 e 0 e 0  
 G G G  
  
  
 -1 -1 -1  
 plnE plnF A B Talpha Tbeta  
  
  
  
Figura 1.10. Clústeres de genes de bacteriocinas de clase II identificados en el genoma de las cepas de lactobacilos y nivel de expresión de genes que codifican los precursores  
de bacteriocinas en cultivos de lactobacilos expuestos a diferentes concentraciones crecientes de células M. bovis BCG. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue  
recomendaciones específicas (Diep et al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de modificación postraduccional (azul),  
las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas hipotéticas (gris).  
  
C1. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de L. plantarum C1 (en representación de todas las cepas de L. plantarum) y el nivel de expresión de sus genes de la bacteriocina  
precursora correspondiente plnE y plnF en cultivos expuestos a células de M. bovis BCG a 106 UFC / ml (barras de color gris claro) y 107 UFC / mL (barras grises oscuro).  
  
SA5. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de L. paracasei SA5 y el nivel de expresión de los de la bacteriocina precursora correspondiente A y B en cultivos expuestos a  
células de M. bovis BCG a 106 UFC / ml (barras de color gris claro) y 107 UFC / mL (barras grises oscuro).  
  
C2. Clúster de la bacteriocina de péptido único de L. salivarius C2 y el nivel de expresión de los genes de la bacteriocina precursora correspondiente Tay Tben cultivos  
expuestos a células de M. bovis BCG a 106 UFC / ml (barras de color gris claro) y 107 UFC / mL (barras grises oscuro).  
  
  
  
 121

Página 122:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
Las especies de lactobacilos influyen de forma diferente en la fagocitosis de M. bovis  
  
BCG  
  
En la figura 1.11A se ilustra el gráfico FSC-SSC que indica la presencia de linfocitos,  
  
monocitos y PMN (neutrófilos) en sangre porcina. A diferencia de lo que ocurre con las  
cepas M. bovis BCG y L. salivarius, la presencia de L. plantarum y L. paracasei altera  
  
significativamente el perfil de dispersión sanguínea, lo que complicó la identificación de  
monocitos y neutrófilos. Sin embargo, la distribución de linfocitos y fagocitos que  
  
observamos en los gráficos de SCC-GFP, nos permite distinguir entre las células  
  
sanguíneas que se han unido a la micobacteria o que la han fagocitado, en función de la  
intensidad de emisión de fluorescencia (GFP) (Figura 1.11B). Se encontraron tanto  
  
linfocitos como fagocitos positivos para GFP, pero la mayor intensidad fluorescencia se  
observó en las células fagocíticas. L. salivarius no tuvo un efecto significativo sobre la  
  
unión de M. bovis BCG (Figura 1.11C) ni sobre la respuesta fagocítica (Figura 1.11D) sin  
embargo, estos parámetros sí se alteraron significativamente en presencia de L.  
  
plantarum y L. paracasei. Aunque ambos lactobacilos aumentaron la unión entre M.  
bovis BCG y los fagocitos (Figura 1.11C) su efecto sobre la respuesta fagocítica fue  
  
completamente diferente (Figura 1.11D): L. plantarum disminuyó la fagocitosis de la  
micobacteria, mientras que L. paracasei la aumentó. Los datos fueron consistentes entre  
  
las diferentes especies, pero en los gráficos solo se muestra una representación de cada  
  
especie para facilitar su interpretación.  
  
  
  
  
  
 122 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 123:  
 LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
  
Figura 1.11. Los lactobacilos interactúan con las células sanguíneas porcinas, interfiriendo con la  
fagocitosis de M. bovis BCG de una manera diferente según la especie.  
  
(A) El gráfico SSC/FSC representa las áreas correspondientes a las células sanguíneas porcinas y el gráfico  
SSC/GFP muestra sus áreas correspondientes en condiciones normales (mock) y cuando se exponen a M.  
bovis BCG, L. salivarius C12, L. plantarum C1 y L. paracasei SA5. Las células sanguíneas se indican en verde  
(linfocitos), naranja (monocitos) y rojo (polimorfonucleares). (B) El gráfico SSC/GFP muestra la respuesta  
de las células sanguíneas porcinas a BCG-GFP solo (-) o en combinación con L. salivarius C12, L. plantarum  
C1 y L. paracasei SA5. Las áreas SSC/FSC para cada una de las condiciones se incluyen arriba y la intensidad  
GFP emitida por los fagocitos se indica en el control de BCG-GFP: negativa (-), positiva (+) y muy positiva  
(++). (C) Porcentaje de fagocitos que se unen a M. bovis BCG solos (barra negra) o en combinación con L.  
salivarius C12, L. plantarum C1 y L. paracasei SA5 (barras grises). Los datos se expresan como media±DE  
con el análisis estadístico de la prueba t de Student (\*\*\* p <0,001). (D) Porcentaje de fagocitos que  
fagocitan M. bovis BCG solos (barra negra) o en combinación con L. salivarius C12, L. plantarum C1 y L.  
paracasei SA5 (barras grises). Los datos se expresan como media±DE con el análisis estadístico de la  
prueba t de Student (\*\*\* p <0,001).  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 123

Página 124:  
LAB | Capítulo I  
  
DISCUSIÓN  
  
  
En este estudio, se encontraron BAL comensales con importantes propiedades para  
antagonizar a la bacteria M. bovis en jabalíes de tres fincas geográficamente dispersas,  
  
pero que tienen como característica común la prevalencia baja o nula de TB pese a estar  
rodeadas de áreas con un historial clínico significativo de la enfermedad y estar  
  
localizadas en áreas de alto riesgo de TB en fauna salvaje (Real Decreto 138/2020, de 28  
  
de enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones  
sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis  
  
(Complejo Mycobacterium Tuberculosis)., 2020). En este primer grupo de estudio, las  
BAL comensales mostraron un perfil de lactobacilos predominante que redujeron  
  
significativamente la supervivencia de M. bovis, el agente causal de la TB en el jabalí. Por  
el contrario, el segundo grupo de estudio, que está formado por jabalíes que habitan en  
  
una finca con elevadas prevalencias de la enfermedad, mostró un perfil de BAL  
comensales completamente diferente, puesto que albergan enterococos, que no  
  
disponen de esas propiedades antagonizantes, pese a que en un estudio previo los  
autores demostraron el efecto antimicobacteriano de algunos enterococos (Fellag et al.,  
  
2020). Curiosamente, esta tendencia antimicobacteriana por grupos se mantiene en el  
  
caso de los pediococos, que fueron encontrados en ambos grupos. El aislado P.  
acidilactici C5 del grupo libre de TB mostró una gran actividad inhibitoria frente a la  
  
micobacteria, mientras que el P. acidilactici de la finca con alta prevalencia de TB no  
afectó la supervivencia de esta. Es muy probable que estas bacterias comensales con  
  
propiedades antimicobacterianas contribuyan a mantener el buen estado de salud de  
los jabalíes. La composición de la microbiota intestinal se ha correlacionado  
  
previamente con la tuberculosis en humanos (Dumas et al., 2018; Fellag et al., 2020; Hu  
et al., 2019; Luo et al., 2017; Winglee et al., 2014), aunque hasta la fecha no se han  
  
realizado estudios similares en animales. Nuestros resultados refuerzan nuestra  
  
hipótesis del papel beneficioso de las BAL comensales en la protección del huésped  
frente a la TB.  
  
  
  
  
  
 124 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 125:  
 LAB | Capítulo I  
  
En este estudio se describe, por primera vez, lactobacilos aislados de jabalíes con  
  
actividad antimicobacteriana, concretamente L. plantarum, L. salivarius y L. paracasei.  
  
Nuestros resultados son consistentes con estudios previos que encontraron que M.  
bovis BCG y M. bovis son inhibidos por lactobacilos aislados de heces de tejón o  
  
presentes en productos lácteos fermentados (Macuamule et al., 2016; Mariam, 2009;  
Stedman et al., 2018). Otros estudios previos que describen aislados de BAL en jabalíes,  
  
se centran en describir los perfiles de resistencias antimicrobianas en lactobacilos y  
enterococos (Klose et al., 2014; Poeta et al., 2007) y serán tratados en el siguiente  
  
capítulo de esta tesis doctoral.  
  
  
Inicialmente sospechamos que la actividad antimicrobiana que mostraban nuestros  
aislados podía deberse al pH ácido, sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados y  
  
otros estudios (De la Rua-Domenech, 2006; Stedman et al., 2018) la acidificación del pH  
  
resulta insuficiente para disminuir la supervivencia de la micobacteria. De hecho, la  
especie M. bovis muestra cierta resistencia al pH ácido debido a su capacidad natural  
  
para adoptar homeostasis intracelular (Rao et al., 2001). En general, los aislados de  
lactobacilos que hemos obtenido en este estudio parecen producir metabolitos que  
  
muestran una actividad antimicrobiana muy significativa contra M. bovis BCG, pero solo  
a pH ácido, lo que sugiere un efecto sinérgico de estos metabolitos y la acidificación del  
  
pH. Todos nuestros aislados de lactobacilos contienen genes asociados con la síntesis de  
lactato y acetato, que inhiben el transporte activo de otras especies bacterianas al  
  
causar interferencia en el potencial de membrana; así como otros compuestos  
  
antimicrobianos adicionales (etanol, CO2 y H2O2) que pueden prevenir el crecimiento  
bacteriano al crear un ambiente hostil (Pessione, 2012). El número de marcadores de  
  
H2O2 es menor en los pediococos y enterococos. Los aislados de Pediococcus y E.  
casseliflavus también son heterofermentadores facultativos, pero sus genomas solo  
  
albergan un gen PKP. Por el contrario, los dos E. faecalis actúan como  
homofermentadores obligados, produciendo solo lactato (Papagianni, 2012).  
  
  
La actividad antibacteriana mostrada por los lactobacilos es multifactorial y se deriva  
  
tanto de la disminución del pH como de la producción simultánea de ácido láctico y otros  
  
metabolitos (Fayol-Messaoudi et al., 2005). De hecho, estas sustancias antimicrobianas  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 125

Página 126:  
LAB | Capítulo I  
  
actúan forma sinérgica, ya que el ácido láctico permeabiliza la membrana externa de las  
  
bacterias, permitiendo que el resto de metabolitos penetren en las células bacterianas  
  
(Alakomi et al., 2000). Los resultados de nuestro estudio demuestran este efecto  
sinérgico, puesto que la actividad antimicobacteriana de los lactobacilos desapareció al  
  
neutralizar el pH, es decir, los metabolitos producidos por los lactobacilos son activos a  
pH ácido. Una de las razones por las cuales los metabolitos producidos por los  
  
lactobacilos no muestran actividad frente a M. bovis a pH neutro podría deberse que  
algunas bacteriocinas solo son completamente funcionales en condiciones ácidas. El  
  
genoma de todos los aislados de lactobacilos mostró genes relacionados con la  
biosíntesis de bacteriocinas de clase III conocidas como «bacteriolisinas», especialmente  
  
en L. salivarius. Las bacteriolisinas son enzimas adaptadas al ambiente ácido en el  
hospedador, con una actividad bactericida óptima que oscila entre valores de pH de 4 a  
  
6 (Ribelles et al., 2012; Sable y Lortal, 1995). Esto también podría explicar la ausencia de  
  
actividad antimicrobiana encontrada en metabolitos de todos los cocultivos de L.  
salivarius a pH 7. Por el contrario, la actividad antimicobacteriana observada con los  
  
metabolitos derivados de cocultivos de M. bovis BCG con L. plantarum y L. paracasei no  
desapareció a pH neutro. Esto sugiere que, en primer lugar, la actividad  
  
antimicobacteriana depende de las especies de lactobacilos y no siempre está asociada  
a pH bajos; y, segundo, M. bovis BCG puede inducir un efecto bactericida. Curiosamente,  
  
encontramos que las cepas de L. plantarum y L. paracasei portan grupos de genes  
asociados con la producción de bacteriocinas de clase IIb, que están formadas por dos  
  
péptidos diferentes que ejercen una actividad antimicrobiana óptima cuando ambos  
  
están presentes en cantidades iguales y que es muy estable en un rango muy amplio de  
pH (1-11) (Nissen-Meyer et al., 2010). Los genes que codifican los dos péptidos están  
  
uno al lado del otro en el mismo operón donde se encuentran otros genes asociados con  
el procesamiento, el transporte y la inmunidad.  
  
  
Los genes que codifican la bacteriocina de dos péptidos que identificamos en el genoma  
  
de las tres cepas de L. plantarum son idénticos a los dos genes del operón plnEF. Los  
genes plnE y plnF permiten la expresión de dos péptidos, denominados plantaricinas E y  
  
F, que interactúan entre sí para formar una estructura de hélice-hélice que se une a una  
  
proteína de membrana específica de la bacteria diana, presumiblemente un  
 126 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 127:  
 LAB | Capítulo I  
  
transportador de la superfamilia APC, lo que ocasiona la destrucción de la membrana y,  
  
como consecuencia, la muerte celular (Ekblad et al., 2016; Oppegård et al., 2016). El  
  
resto de los genes que detectamos en los genomas de L. plantarum son idénticos al  
operón plnWVUTSHG, que participan en el transporte, procesamiento y autoprotección  
  
(Diep et al., 2009). Los operones plnEF y plnWVUTSHG se encuentran de forma frecuente  
en muchas cepas de L. plantarum junto con otros grupos de bacteriocinas de dos  
  
péptidos como plantaricina JK, aunque en algunos casos se ha detectado de forma  
aislada (Sáenz et al., 2009; Tai et al., 2015). Asimismo, detectamos un clúster de genes  
  
implicados en la síntesis hipotética de una nueva bacteriocina de dos péptidos en L.  
paracasei. El clúster está compuesto por dos genes que codifican para dos bacteriocinas  
  
que muestran cierta similitud con la termofilina A (Ward y Somkuti, 1995) y la carnocina  
CP51 (Herbin et al., 1997), seguidos de un gen de galactósido O-acetiltransferasa y dos  
  
genes adicionales implicados en la inmunidad y el transporte. La carnocina CP51 se  
  
expresa con el péptido complementario carnocina CP52 en Carnobacterium y  
termofilina A glicosilada, como ocurre con algunas plantaricinas (Diep et al., 2009).  
  
  
Un hecho muy interesante que observamos es que los dos operones que codifican las  
  
bacteriocinas de dos péptidos en los aislados de L. plantarum y L. paracasei se  
sobreexpresan en presencia de células de M. bovis BCG en función de la concentración  
  
de estas. Estos resultados podrían explicar la actividad antimicrobiana de los  
metabolitos obtenidos a partir cocultivos de M. bovis BCG con L. plantarum y L.  
  
paracasei. Esta actividad no se detectó cuando se utilizaban los metabolitos del  
  
monocultivo o de estos dos lactobacilos propagados en sobrenadantes libres de células,  
pero con metabolitos liberados al medio por M. bovis. De hecho, la regulación de la  
  
producción de plantaricina en cocultivos de L. plantarum ha sido descrita previamente  
(Maldonado, Ruiz-Barba, et al., 2004; Maldonado-Barragán et al., 2013). De forma  
  
similar a nuestros resultados, un trabajo anterior describe la inducción del operón de la  
plantaricina NC8 en presencia de otras bacterias grampositivas o de células de otras  
  
bacterias inductoras inactivadas por calor (Maldonado, Jiménez-Díaz, et al., 2004). Está  
descrito que las plantaricinas tienen un espectro de inhibición microbiana bastante  
  
estrecho, limitado a inhibir otras especies de lactobacilos y algunas especies Gram +  
  
relacionadas (Diep et al., 2009), por ello, nuestros resultados no son suficientes para  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 127

Página 128:  
LAB | Capítulo I  
  
confirmar que el efecto antimicobacteriano de L. plantarum se deba exclusivamente a  
  
la producción de plantaricina. No obstante, el efecto antimicobacteriano encontrado es  
  
muy prometedor debido a que las plantaricinas contribuyen a la funcionalidad  
probiótica una vez se produce la colonización en el intestino (Maldonado-Barragán et  
  
al., 2013), y a que las bacteriocinas de clase II tienen actividad antimicrobiana contra M.  
tuberculosis (Sosunov et al., 2007).  
  
  
A diferencia de las bacteriocinas de dos péptidos, las dos bacteriocinas de péptido único  
  
identificadas de L. salivarius no mostraron regulación positiva en presencia de células  
de M. bovis BCG, lo que concuerda con el hecho de que los metabolitos de L. salivarius  
  
no afectaron a la supervivencia de M. bovis BCG a pH 7. Las dos bacteriocinas que  
encontramos en el genoma de L. salivarius muestran similitudes con múltiples  
  
bacteriocinas de clase IIb previamente descritas en otras cepas de L. salivarius (O’Shea  
  
et al., 2011) pero también con bacteriocinas blp1α / blp1β de L. salivarius BGHO1  
(Busarcevic y Dalgalarrondo, 2012) y ThmA / ThmB (termofilina 13) de Streptococcus  
  
thermophilus (Marciset et al., 1997). Nuestras dos bacteriocinas de L. salivarius  
contienen la secuencia líder de tipo doble glicina de las bacteriocinas de clase II pero, a  
  
diferencia de las bacteriocinas de dos péptidos (clase IIb), sus operones portan genes de  
inmunidad para cada uno de los precursores. Como estas bacteriocinas también carecen  
  
de la secuencia de consenso YGNGV-C de las bacteriocinas de clase IIa, se clasificaron  
como una bacteriocina de péptido único (clase IId). La evidencia de que las bacteriocinas  
  
blp1α / blp1β se producen en medio de cultivo muy selectivo y que las bacteriocinas  
  
ThmA / ThmB ejercen su función sin un receptor de membrana bacteriano también  
podrían explicar la ausencia de actividad antimicobacteriana observada con los  
  
metabolitos de L. salivarius a pH neutro.  
  
  
Otro aspecto importante es el hecho de que la privación de nutrientes causada por el  
metabolismo de los lactobacilos parece no tener influencia en la supervivencia de M.  
  
bovis BCG. La viabilidad de M. bovis BCG registrada tras la incubación en sobrenadantes  
de monocultivos de lactobacilos ajustados a pH 7 no se vio afectada. Además, los  
  
lactobacilos crecen bien en presencia de metabolitos de BCG, lo que sugiere que las vías  
  
metabólicas de los lactobacilos y M. bovis no tienen interferencia cruzada. Los  
 128 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 129:  
 LAB | Capítulo I  
  
lactobacilos, como muchas otras bacterias ácido-lácticas, tienen un metabolismo  
  
relativamente simple que convierte los azúcares en piruvato a través de la vía glucolítica,  
  
generando energía (Papagianni, 2012), mientras que las micobacterias muestran un  
metabolismo central de carbono muy complejo, pero flexible, que genera energía a  
  
partir de la glucólisis, gluconeogénesis, la vía de la pentosa fosfato y la vía del TCA  
dependiendo de los recursos disponibles (Cumming y Steyn, 2015). Estos hechos  
  
metabólicos, junto con la evidencia de que el pH ácido no tiene efecto  
antimicobacteriano in vitro, refuerzan nuestra hipótesis de que los lactobacilos ejercen  
  
actividad antimicrobiana contra M. bovis BCG a través de mecanismos sinérgicos que  
incluyen combinación la del pH ácido con diferentes metabolitos como ácidos orgánicos,  
  
peróxido de hidrógeno, etanol y bacteriocinas.  
  
  
Finalmente, determinamos la respuesta fagocítica a M. bovis BCG expuestos a  
  
lactobacilos. Los aislados de L. plantarum y L. paracasei tuvieron un efecto  
significativamente opuesto, mientras que L. plantarum disminuyó la fagocitosis de M.  
  
bovis BCG, L. paracasei aumentó la respuesta fagocítica. Por ello, estas dos especies de  
lactobacilos podrían ser reconocidas por diferentes receptores fagocíticos que, en  
  
mayor o menor medida, también podrían estar implicados en el reconocimiento de M.  
bovis BCG. La internalización por los fagocitos es claramente beneficiosa para la  
  
supervivencia de las especies del complejo M. tuberculosis (el ya mencionado CMT), que  
pueden ingresar a los macrófagos a través de diferentes moléculas receptoras, incluidos  
  
los receptores del complemento involucrados en las vías clásicas y alternativas, como  
  
los receptores C1 y receptores de lectina de tipo C (Marakalala et al., 2018; Pieters,  
2008). En este sentido, estudios muy recientes han descrito que los lactobacilos son  
  
capaces de expresar adhesinas que se unen a receptores de lectina de tipo C (Bene et  
al., 2017). Curiosamente, los genomas de nuestros aislados de L. plantarum han  
  
revelado la presencia de cna, un gen que codifica una adhesina de colágeno (cna) y que  
no se ha encontrado en el genoma de L. paracasei. Esta proteína también bloquea la  
  
activación del complemento dependiente de C1 (Kang et al., 2013), por lo que el  
antagonismo de los aislados de L. plantarum frente a la fagocitosis de M. bovis podría  
  
ser causado por la competencia, no solo por los receptores de lectina, sino también por  
  
la vía clásica de activación del complemento.  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 129

Página 130:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
La razón por la que L. paracasei aumenta la fagocitosis de M. bovis BCG podría deberse  
  
a muchos factores diferentes, incluida la expresión de spaD, un gen de proteína fimbrial  
que hemos identificado en su genoma. Las fimbrias de los lactobacilos facilitan la  
  
fagocitosis por los macrófagos a través de la integrina CD11b / CD18 (García et al., 2015),  
también conocida como receptor del complemento 3 (CR3). Además, CR3 puede actuar  
  
como un regulador negativo de los receptores de lectina de tipo C (Q. Zhang et al., 2018)  
y parece no alterar la progresión de la infección por producida M. tuberculosis (Hu et al.,  
  
2000). Por lo tanto, las fimbrias podrían promover la fagocitosis por los macrófagos a  
través los principales receptores fagocíticos de M. bovis, como las lectinas. Por otro lado,  
  
tanto L. plantarum como L. paracasei contienen el gen de adhesina rica en serina sraP,  
por lo que estos receptores para el reconocimiento de ácido siálico podrían no tener una  
  
influencia significativa en la fagocitosis de M. bovis BCG (Kline et al., 2009).  
  
  
Los aislamientos de L. salivarius no tuvieron efectos significativos sobre la unión ni sobre  
  
la fagocitosis de M. bovis BCG, al contrario que L. plantarum y L. paracasei. Estas dos  
especies de lactobacilos también alteraron significativamente el perfil sanguíneo  
  
porcino. Los lactobacilos activan los macrófagos a través de los receptores Toll-like (TLR)  
y nuestras 3 especies de Lactobacillus contienen los genes ltaS1 y ltaS2 involucrados en  
  
la síntesis de ácido lipoteicoico (LTA), un componente principal de la pared celular que  
actúa como estimulador de TLR2 (Sengupta et al., 2013). Sin embargo, L. plantarum y L.  
  
paracasei también albergan genes que codifican otros componentes de la pared celular  
  
y la membrana citoplasmática que no se encontraron en L. salivarius, como la proteína  
fimbrial spaD de L. paracasei y los genes tagBFGH asociados con la biosíntesis de ácidos  
  
teicoicos de la pared celular (WTA) en L. plantarum. Las fimbrias y WTA son capaces de  
activar macrófagos a través de TLR5 y 2, respectivamente (Ganguli et al., 2015; Hevia et  
  
al., 2015; Yu et al., 2015) y, en nuestras condiciones experimentales, su contribución a  
la estimulación de fagocitos podría ser mucho más significativo que LTA. La activación  
  
de TLR podría colaborar con los receptores fagocíticos y así tener importantes  
implicaciones posteriores en el proceso de fagocitosis (Gordon, 2016).  
  
  
  
  
 130 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 131:  
 LAB | Capítulo I  
  
Los resultados de este estudio refuerzan la hipótesis del papel beneficioso de las BAL  
  
comensales en la protección del huésped frente a la TB y resaltan el papel de la  
  
microbiota comensal en la lucha frente a enfermedades infecciosas. Por ello, las  
bacterias aisladas en este capítulo se estudiarán con más detalle en los siguientes  
  
capítulos de esta tesis doctoral para tratar de investigar sobre sus capacidades, tanto  
antimicrobianas frente a otro tipo de patógenos, como inmunomoduladoras; y poder  
  
explotar sus posibles propiedades beneficiosas como probióticos.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 131

Página 132:  
LAB | Capítulo I  
  
  
  
  
  
 132 MARÍA BRAVO SANTILLANA

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

Página 134:  
LAB | Capítulo II  
  
  
  
  
  
 134 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 135:  
 LAB | Capítulo II  
  
INTRODUCCIÓN  
  
  
  
Breve resumen histórico del concepto «probiótico»  
  
La palabra «probiótico» deriva del latín pro «a favor de» y del griego βιοσ «vida»  
  
(Dwivedi et al., 2016) y la definición que se contempla en la actualidad fue la propuesta  
por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2001 como «microorganismos vivos  
  
que, administrados en cantidades adecuadas, reportan un beneficio para la salud del  
  
hospedador» (FAO/WHO, 2001). Aunque las propiedades beneficiosas para la salud y  
para la conservación de alimentos de ciertos productos fermentados se conocen desde  
  
la Antigüedad, no fue hasta siglos más tarde cuando se le empezó a prestar especial  
atención. El concepto probiótico empezó a ganar popularidad en la comunidad científica  
  
cuando, a raíz de las observaciones de Élie Metchnikoff, científico galardonado con el  
premio Nobel en 1908, se pudo comprobar cómo la consumición de forma regular de  
  
BAL en productos lácteos fermentados estaba asociado con una mejoría de la salud y un  
aumento de la longevidad. Años más tarde, primero Werner Kollath en 1953 y después  
  
Lilly y Stillwell en 1965, propusieron el término «probiótico» en diferentes contextos,  
siempre bajo la designación de sustancias o productos de fermentación con propiedades  
  
beneficiosas. En 1989, Füller modificó ligeramente esta definición, especificando que  
  
dichos productos eran microorganismos vivos, más concretamente bacterias y  
levaduras. En 1998 el International Life Science Institute incluyó los términos «salud y  
  
bienestar», sentando las bases para el concepto de lo que actualmente conocemos  
como probióticos (Gasbarrini et al., 2016; López et al., 2007).  
  
  
  
Seguridad de los microorganismos destinados a alimentos y piensos  
  
En la actualidad, existe una normativa relativamente amplia sobre la seguridad de las  
  
cepas de microorganismos que estén destinados a emplearse como aditivos en  
alimentos y piensos. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria se estableció en  
  
2002 bajo la cobertura de la Ley General de Alimentación de la Unión Europea  
  
(Regulation 178/2002) con el objetivo de proporcionar un asesoramiento científico  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 135

Página 136:  
LAB | Capítulo II  
  
independiente sobre los riesgos relacionados con los alimentos. Bajo el amparo de la  
  
EFSA, La Comisión Técnica de Aditivos y Productos o Sustancias utilizados en los Piensos  
  
para Animales (FEEDAP) proporciona asesoramiento científico sobre la seguridad o la  
eficacia de los aditivos y los productos o sustancias que se emplean en la alimentación  
  
animal. La Comisión Técnica evalúa la seguridad y/o la eficacia que estos suponen para  
las especies objetivo, el usuario, los consumidores de los productos de origen animal y  
  
el medio ambiente. Asimismo, analiza la eficacia de los productos/sustancias biológicas  
y químicos que se utilizan deliberadamente en los piensos para animales  
  
(https://www.efsa.europa.eu/es/panels/feedap).  
  
  
En el año 2007 se introdujo el sistema de evaluación basado en el concepto QPS  
«Presunción Cualificada de Seguridad» para acelerar el proceso de evaluación de  
  
microorganismos que se sabe que carecen de riesgo para los consumidores, siempre  
  
como aditivos para alimentos y piensos y no con fines terapéuticos (European Food  
Safety Authority (EFSA), 2007). Ese mismo año se publica una lista de microorganismos  
  
propuestos para la obtención de QPS que se actualizaba anualmente hasta 2014, cuando  
pasó a actualizarse de forma periódica cada tres años. Actualmente los criterios de un  
  
microorganismo para ser incluido en esa lista son los siguientes: deben tener una  
identidad taxonómica bien definida, se debe disponer de un conocimiento científico  
  
suficiente para garantizar su seguridad, debe demostrarse la ausencia de propiedades  
patógenas y debe describirse claramente su uso previsto.  
  
  
En el año 2008 la Comisión Técnica de Factores de Peligro Biológicos (BIOHAZ) publicó  
los criterios actualizados de resistencia a los antimicrobianos, por el que todas las cepas  
  
bacterianas que pretendan utilizarse en la producción de alimentos o piensos deben  
someterse a pruebas para detectar la resistencia a antibióticos utilizados en medicina  
  
humana y veterinaria. En el caso de que se detectaran resistencias, el reglamento exige  
que deba establecerse su base genética y la probabilidad de que se transfiera a otros  
  
microorganismos, por lo que no se contemplan como aditivos para piensos las cepas de  
microorganismos que hayan adquirido resistencia a uno o varios antimicrobianos, salvo  
  
que pueda demostrarse que dicha resistencia es el resultado de una o varias mutaciones  
  
cromosómicas y que es intransferible (REGLAMENTO (CE) No 429/2008 DE LA COMISIÓN  
 136 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 137:  
 LAB | Capítulo II  
  
de 25 de Abril de 2008 Obre Normas de Desarrollo Para La Aplicación Del Reglamento  
  
(CE) No 1831/2003 Del Parlamento Europeo y Del Consejo Por Lo Que Se Refiere a La  
  
Preparación y Presentación de Solicitudes y a La Evaluación y Autorización de Aditivos  
Para Piensos, 2008). En este sentido, en el año 2012, la FEEDAP publicó un documento  
  
de orientación sobre la evaluación de la susceptibilidad de los aislados bacterianos a los  
antimicrobianos de importancia en medicina humana y veterinaria, que incluye los  
  
criterios para categorizar las cepas en sensibles o resistentes y propone la detección de  
la base genética de la resistencia cuando se superen los valores de referencia  
  
establecidos (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed  
(FEEDAP), 2012).  
  
  
  
Efecto antimicrobiano de las bacterias ácido-lácticas  
  
Una de las propiedades más explotadas de las BAL para su uso como probióticos es  
  
debido a su capacidad para producir un efecto antimicrobiano frente a bacterias,  
  
principalmente, aunque también se han descrito frente a hongos (Matevosyan et al.,  
2019). El efecto antimicrobiano primario de las BAL se debe a la competencia por los  
  
nutrientes del sustrato o del nicho ecológico donde estén establecidas, como un  
mecanismo evolutivo de selección natural, para lo cual han desarrollado mecanismos de  
  
competencia que incluyen la producción de sustancias antibacterianas. Muchas de estas  
sustancias se producen fruto del metabolismo fermentativo de estas bacterias y, por  
  
tanto, la capacidad antimicrobiana de una especie o cepa en cuestión, depende de que  
el tipo de fermentación se produzca a través de alguna de las dos vías metabólicas  
  
glucolíticas principales: la ruta Embden-Meyerhof (EMP) y la ruta de la fosfocetolasa  
  
(PKP) (Papagianni, 2012). Las BAL homofermentativas convierten las hexosas en ácido  
láctico mediante la ruta EMP, mientras que las heterofermentativas además de generar  
  
ácido láctico también producen cantidades significantes de ácido acético, etanol y  
dióxido de carbono (CO2) mediante la ruta PKP. La formación de ácidos orgánicos (ácido  
  
láctico y ácido acético, principalmente) tiene como consecuencia un descenso del pH  
que dificulta el desarrollo de un gran número de microorganismos y, por el contrario,  
  
favorece el crecimiento de las BAL, que son tolerantes a pH ácidos. Todas estas  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 137

Página 138:  
LAB | Capítulo II  
  
moléculas, así como otros componentes de bajo peso molecular como los metabolitos  
  
del oxígeno, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, radicales libres y anión superóxido  
  
(Vásquez et al., 2009), pueden ejercer una actividad antimicrobiana en mayor o menor  
medidas.  
  
  
Por otro lado, las bacteriocinas son unas moléculas de naturaleza proteica, sintetizadas  
  
en el ribosoma y que tienen un espectro de inhibición que en ocasiones puede ser muy  
amplio (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Cotter et al., 2005; Meade et al., 2020).  
  
  
  
Clasificación de las bacteriocinas y sus mecanismos de acción  
  
En la actualidad no se dispone de un consenso en la comunidad científica entre las  
  
diferentes clasificaciones de las bacteriocinas producidas por las BAL, la que se describe  
a continuación es la propuesta por Álvarez-Siero et al. (2016), puesto que es la que más  
  
se ajusta a este contexto. Esta clasificación engloba a las diferentes clases de  
  
bacteriocinas en función de su mecanismo de biosíntesis y su actividad biológica, se  
muestra una ilustración en la Figura 2.1 (Alvarez-Sieiro et al., 2016).  
  
  
La clase I incluye péptidos de pequeño tamaño molecular (< 10 KDa), termoestables y  
  
con modificaciones postraduccionales que generan aminoácidos infrecuentes y se  
subdivide en varias clases. La clase Ia se denominan de forma general «lantipéptidoss»  
  
o «lantibióticos» cuando tienen actividad antimicrobiana, porque su aminoácido es  
lantionina o (metil)lantionina y la bacteriocina más estudiada de este grupo es la nisina.  
  
El mecanismo de acción antimicrobiano de los lantibióticos es doble, puesto que se debe  
  
a su unión al lípido II de la membrana bacteriana, interfiriendo, por tanto, en la síntesis  
de la pared celular y formando un poro que ocasiona una despolarización de la  
  
membrana. La clase Ib y Ic son también péptidos formadores de poro, con diferentes  
mecanismos de acción, y se corresponden, respectivamente, con péptidos cíclicos del  
  
tipo «cabeza-cola» y con los denominados «sactipéptidos» o «sactibióticos» cuando  
tienen actividad antimicrobiana. La clase Id se corresponde con péptidos lineales que  
  
contienen anillos heterocíclicos de tiazoles y oxazoles o sus formas reducidas a tiazolina  
  
  
 138 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 139:  
 LAB | Capítulo II  
  
y oxazolina; la clase Ie son las glicocinas, que contiene residuos glicosilados; y la clase If  
  
son los denominados «lasopéptidos», que son microcinas que han sido descritas en  
  
enterobacterias. Aunque se han descrito péptidos antimicrobianos de las clases Id, Ie y  
If, su mecanismo de acción necesita ser estudiado con mayor profundidad.  
  
  
La clase II incluye péptidos de pequeño tamaño molecular (< 10 KDa), también  
  
termoestables, pero sin modificaciones postraduccionales. La clase IIa incluye péptidos  
tipo pediocina que tienen una secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC  
  
fundamental para el reconocimiento de la membrana y la formación del poro. Estas  
bacteriocinas tienen un amplio espectro de inhibición, especialmente frente a Listeria,  
  
y puede subdividirse a su vez en otros 8 subgrupos. La clase IIb se corresponde con  
bacteriocinas de dos péptidos que forman un complejo para la formación de los poros,  
  
como las plantaricinas EF y JK. La clase IIc son péptidos pequeños que son transportados  
  
por péptidos líderes y, por último, la clase IId son bacteriocinas de péptido único  
diferentes del tipo pediocina. Este es el subgrupo más heterogéneo de esta clase, puesto  
  
que tiene diferentes estructuras y mecanismos de acción, que puede incluir tanto la  
formación de poros como la inhibición en la síntesis de la pared celular mediante unión  
  
al lípido II, como en el caso de la nisina.  
  
  
Por último, las bacteriocinas de clase III se corresponden con péptidos no modificados,  
termolábiles y mayores de 10 kDa, cuya estructura está compuesta por diferentes  
  
dominios. Su mecanismo de acción puede ser bacteriolítico, denominadas  
  
«bacteriolisinas», que causan la destrucción de la célula bacteriana mediante la escisión  
de los enlaces del peptidoglicano de la pared; o no lítico, que puede incluir alteración en  
  
el metabolismo de los azúcares o inhibición en la biosíntesis del ADN o las proteínas de  
la bacteria diana.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 139

Página 140:  
LAB | Capítulo II  
  
  
  
  
  
 Figura 2.1. Mecanismos de acción de las bacteriocinas de clase I, II, III. Fuente: (Tulini, 2014)  
  
  
  
Propiedades inmunomoduladoras de las bacterias ácido-lácticas  
  
Otra de las propiedades de las BAL que más interés está causando durante los últimos  
años es su capacidad para interaccionar con el sistema inmunitario de los organismos  
  
superiores en los que habitan, como parte de la microbiota comensal. Está totalmente  
aceptado por la comunidad científica en general que la microbiota comensal juega un  
  
papel esencial en la defensa natural del hospedador frente a agentes patógenos,  
particularmente los agentes infecciosos (Belkaid y Hand, 2014; Hevia et al., 2015). Las  
  
BAL poseen una amplia variedad de moléculas que se conocen con el nombre de  
  
 140 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 141:  
 LAB | Capítulo II  
  
«Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos» (MAMP, Microbe-Associated  
  
Molecular Patterns), a través de la cual el hospedador distingue la microbiota comensal  
  
de los microorganismos patógenos. El reconocimiento de estos ligandos se lleva a cabo  
mediante Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR, Pattern Recognition  
  
Receptors), fundamentalmente receptores tipo Toll en la superficie celular (TLR, Toll-like  
receptors) y receptores lecitina de tipo C (CLR) o de tipo NOD, en el citoplasma (NLR,  
  
NOD-like receptors) (Dolasia et al., 2018; Hevia et al., 2015).  
  
  
Los TLR se localizan en las membranas celulares y se asocian a respuestas  
proinflamatorias. Son los más estudiados y, hasta la fecha, se han podido identificar 10  
  
tipos de TLR, que son activados por diferentes ligandos (Takeuchi y Akira, 2010). Todos  
los TLRs contienen en su dominio ectomembranal repeticiones ricas en leucina y  
  
presentan un receptor Toll/IL1 intracelular (TIR) para la transducción de señales (Yu y  
  
Gao, 2015). Estos receptores se localizan en varios tipos celulares, principalmente en  
células del sistema inmunitario como células dendríticas o macrófagos, pero los  
  
podemos encontrar en otros tipos de células, como en las células epiteliales, y son  
esenciales tanto para la respuesta inmunitaria innata como adaptativa (Hayden et al.,  
  
2006; Pasparakis, 2012). La cascada de señalización que se desencadena cuando se  
produce la unión del ligando con el TLR provoca la dimerización del receptor y el  
  
reclutamiento de moléculas adaptadoras tales como las proteínas MyD88 y TRIF que  
llevan a la activación de rutas de señalización importantes para la respuesta inmunitaria  
  
protectora, como NF-κB o IFN-I, que es inductor de la producción de interferón (IFN) (Yu  
  
y Gao, 2015).  
  
  
La ruta de señalización de NF-κB engloba a factores de transcripción inducibles que  
regulan una extensa cantidad de genes relacionados con distintas funciones y procesos  
  
relacionados con el sistema inmunitario. La activación de NF-κB asociada a TLR se  
produce por dos tipos de señalizaciones, la canónica (o dependiente de MyD88) y la  
  
alternativa (o independiente de MyD88). La proteína MyD88 activa una cascada de  
señalización que induce la producción de citoquinas proinflamatorias como  
  
interleuquina (IL) 1, IL-8, IL-2 o factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) (Moreno y Sanchez-  
  
Ibarrola, 2003). Los TLR3 y TLR4 utilizan una ruta de señalización independiente a MyD88  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 141

Página 142:  
LAB | Capítulo II  
  
que se lleva a cabo a través de la proteína TRIF, crucial para la expresión de los genes de  
  
la ruta IFN (Nagai et al., 2006). La vía de activación de IFN mediada por TLR endosomales  
  
promueve el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz frente a patógenos virales,  
puesto que se sensibilizan todas las células del organismo a la apoptosis, eliminando de  
  
esta forma el nicho del patógeno intracelular (Kawashima et al., 2013; Koyama et al.,  
2008).  
  
  
Los MAMP incluyen una amplia variedad de metabolitos microbianos y componentes  
  
estructurales como exopolisacáridos (EPS), peptidoglicano (en Gram+) o lipopolisacárido  
(en Gram-), lipoproteínas de membrana, ácidos lipoteicoicos y teicoicos (LTA y WTA  
  
respectivamente), pili y fimbrias, entre otros (Hevia et al., 2015; Stedman et al., 2020);  
y también se han descrito metabolitos microbianos secretados al medio como los ácidos  
  
grasos de cadena corta (AGCC) acetato, propionato o butirato y las bacteriocinas,  
  
mencionadas anteriormente (Hegarty et al., 2016; Hevia et al., 2015; Silva et al., 2020;  
Stedman et al., 2020).  
  
  
Estas moléculas tienen la capacidad, por tanto, de actuar como mediadores inmunitarios  
  
(Figura 2.2), bien sean proinflamatorios, cuando desencadenen la respuesta  
inflamatoria; o antiinflamatorios, cuando medien para el desarrollo de una respuesta  
  
reguladora o tolerogénica, pero son necesarios más estudios que ahonden en el tipo de  
mecanismos que se desencadenan (Suez et al., 2019).  
  
  
  
  
  
 142 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 143:  
 LAB | Capítulo II  
  
  
  
  
  
 Figura 2.2. Interacción de las BAL con los macrófagos para la regulación de las rutas inmunitarias de  
 señalización NF-kB y IFN-I vía TLR. Adaptado de: (J. B. Li et al., 2013).  
  
  
 El objetivo general de este capítulo es el de estudiar las propiedades beneficiosas de las  
  
 bacterias ácido-lácticas aisladas de la microbiota del jabalí.  
  
  
 Para ello, se propusieron como objetivos específicos los siguientes:  
  
  
- Estudio de la seguridad de los aislados para su posterior utilización para el control de  
  
 procesos infecciosos mediante: evaluación de sus resistencias antimicrobianas  
 fenotípicas frente a antibióticos de uso común, y genotípicas mediante la búsqueda de  
  
 genes de resistencia; búsqueda de genes de virulencia y el análisis bioinformático de la  
 proximidad filogenética a otras bacterias ácido-lácticas de diferentes orígenes.  
  
  
- Caracterización fenotípica de la actividad antimicrobiana frente a patógenos aislados de  
 casos clínicos de jabalíes: Escherichia coli como marcador de procesos digestivos,  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 143

Página 144:  
 LAB | Capítulo II  
  
 Pasteurella multocida como marcador de procesos respiratorios y Listeria  
  
 monocytogenes como marcador de procesos sistémicos; y su caracterización genotípica:  
  
 genes que codifican para metabolitos antimicrobianos, incluidos clústeres de  
 bacteriocinas.  
  
  
- Determinación de las propiedades de los aislados para modular la respuesta inmunitaria  
  
 mediante estudio de su fenotipo: interacción con los fagocitos del hospedador y  
 capacidad para activar las rutas NF-kB y IFN-I en macrófagos in vitro; y la evaluación  
  
 genotípica de sus marcadores inmunomoduladores.  
  
  
  
  
  
 144 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 145:  
 LAB | Capítulo II  
  
 MÉTODO  
  
  
  
1. Estudios de seguridad de los aislados  
  
 Para evaluar la seguridad de las cepas aisladas y seleccionadas del capítulo anterior, se  
  
 analizaron diferentes parámetros. En primer lugar, se realizaron pruebas de  
 susceptibilidad antimicrobiana a determinados antibióticos y se realizó un estudio  
  
 genotípico de los aislados para detectar genes de resistencia antimicrobiana y  
  
 marcadores de virulencia. Además, se realizó un estudio filogenético para comparar las  
 secuencias de nuestros aislados con otras secuencias conocidas de bacterias ácido-  
  
 lácticas de diferentes orígenes, tanto potencialmente patógenas como beneficiosas.  
  
  
 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fenotípica  
  
  
 La susceptibilidad de los aislados de bacterias ácido-lácticas seleccionados se cuantificó  
 mediante el ensayo de microdilución en caldo. Los antibióticos seleccionados fueron:  
  
 ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina,  
 tetraciclina y cloranfenicol, siguiendo las recomendaciones del Panel sobre Aditivos y  
  
 Productos o Sustancias (FEEDAP) utilizados en Alimentación animal de la EFSA (EFSA  
  
 Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012). Se  
 realizaron diluciones seriadas en caldo MH de cada uno de los antibióticos frente a una  
 concentración bacteriana de 2 x 105 ufc/mL en placas de 96 pocillos Nunc-MicroWell ™  
 (Thermo Scientific), que fueron incubadas durante 18 h a 37 ºC. El crecimiento de las  
  
 cepas se midió mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm con un  
 lector de microplacas (Multimode Detector DTX 880, Beckman Coulter) y se calculó la  
  
 concentración inhibitoria mínima (CMI), que se define como la concentración más baja  
 del antibiótico que inhibe el crecimiento de la bacteria. Las cepas fueron categorizadas  
  
 en sensibles o resistentes para cada antibiótico según los valores de referencia definidos  
  
 por el FEEDAP (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed  
 (FEEDAP), 2012).  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 145

Página 146:  
LAB | Capítulo II  
  
  
  
Detección genotípica de marcadores de resistencia antimicrobiana y factores de  
  
virulencia  
  
  
A partir de la secuencia de los genomas obtenidas y descritas en el capítulo anterior, se  
realizó una exploración con Abricate versión 0.9  
  
(https://github.com/tseemann/abricate) para detectar la presencia de genes de  
resistencia antimicrobiana adquiridos y factores de virulencia putativos. Además, se  
  
identificaron genes de resistencia adicionales utilizando la base de datos de genes de  
referencia de NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA313047) y las dos  
  
bases de datos Resfinder (Zankari et al., 2012) y PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014). La  
base de datos de factores de virulencia VFDB se utilizó de la misma forma para detectar  
  
genes que codifican factores de virulencia como proteinasas, gelatinasas y proteínas  
  
formadoras de biopelículas.  
  
  
Proximidad filogenética a otros aislados de diferentes orígenes  
  
  
Para determinar el origen filogenético de los 11 aislados seleccionados, se realizó un  
estudio de genómica comparada entre estos aislados y otras especies de bacterias ácido-  
  
lácticas aisladas de diferentes orígenes (individuos sanos y enfermos, tanto humanos  
como animales; alimentos y bebidas crudos o fermentados; y medio ambiente,  
  
fundamentalmente). Se descargaron todos los genomas públicos de las especies L.  
  
plantarum, L. salivarius, L. paracasei, Pediococcus spp., E. faecalis y E. casseliflavus, junto  
con sus metadatos, de la base de datos del genoma del NCBI utilizando ncbi-genome-  
  
download versión 0.2. 9 (https://github.com/kblin/ncbi-genome-download). Debido al  
elevado número de genomas disponibles para L. plantarum y E. faecalis, se llevó a cabo  
  
un primer cribado comparativo utilizando perfiles de frecuencia de características de  
purina-pirimidina (FFPry) (Sims et al., 2009) para seleccionar las secuencias del genoma  
  
más cercanas. La comparación del genoma se llevó a cabo utilizando polimorfismos de  
nucleótido único del genoma central, identificados por ParSNP versión 1.2  
  
(Pornsukarom et al., 2018; Treangen et al., 2014). Los árboles filogenéticos se generaron  
  
con el programa Figtree versión 1.4.2 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).  
 146 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 147:  
 LAB | Capítulo II  
  
2. Caracterización antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas  
  
 Se realizó una caracterización antimicrobiana de los 11 aislados seleccionados que  
  
 mostraron potencial antimicrobiano, especialmente frente a micobacterias, en los  
 ensayos anteriores descritos en el capítulo I. Para estos ensayos se seleccionaron tres  
  
 especies diferentes para tratar de abarcar un amplio espectro de bacterias Gram + y  
 Gram – y patógenos que afectan a diferentes aparatos o sistemas: Escherichia coli como  
  
 marcador de procesos digestivos, Pasteurella multocida como marcador de procesos  
 respiratorios y Listeria monocytogenes como marcador de procesos sistémicos. Todas  
  
 las cepas patógenas han sido aisladas de casos clínicos en jabalíes diagnosticados por la  
 empresa INGULADOS S.L. y han sido identificadas mediante pruebas microbiológicas  
  
 básicas y moleculares. Los métodos de elección para evaluar la actividad antibacteriana  
 de los aislados de LAB incluyeron tres tipos de técnicas diferentes que fueron  
  
 optimizadas para cada patógeno: cocultivos, ensayo de microdilución en caldo y  
  
 «prueba de la gota», más conocida por su nombre en inglés «spot-on-agar», como se  
 describió anteriormente (A. Stedman et al., 2020).  
  
  
 Además, se realizó la caracterización genotípica mediante la detección de genes que  
  
 codifican para metabolitos antimicrobianos, incluidos clústeres de bacteriocinas,  
 mediante los procedimientos descritos en el Capítulo I de esta tesis doctoral. En el  
  
 capítulo anterior se describieron los genes de los aislados que mostraron actividad  
 antimicobacteriana y en este se realizó el mismo estudio para el resto de aislados  
  
 seleccionados.  
  
  
 Cocultivos de bacterias ácido-lácticas y un aislado de E. coli patógeno  
  
  
 Las BAL seleccionadas se cultivaron en caldo MRS a 37ºC durante 24-48 h. El E. coli  
  
 seleccionado se trata de una cepa patógena aislada de un caso clínico en jabalíes y se  
 cultivó en caldo TSB (Oxoid) a 37 ºC durante 24 h con aireación. Para evaluar la actividad  
  
 antimicrobiana de las BAL frente a E. coli, se realizaron cocultivos en TSB siguiendo un  
 procedimiento similar al descrito en el capítulo I, con algunas modificaciones. Se  
 inocularon 105 ufc/mL del cultivo en TSB de E. coli y 107 ufc/mL de cada BAL cultivadas  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 147

Página 148:  
LAB | Capítulo II  
  
en medio MRS. Se preparó un control negativo inoculando 105 ufc/mL de E. coli en un  
  
monocultivo y se le añadió el volumen correspondiente de MRS para normalizar las  
  
condiciones. Se incubaron todos los cocultivos a 37 ºC durante 24 h con aireación y se  
sembraron diluciones seriadas en Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG, Oxoid) diseñado  
  
para el recuento de enterobacterias y que inhibe el crecimiento de BAL. Los resultados  
de la actividad inhibitoria del experimento de cocultivo se expresan como reducciones  
  
logarítmicas de las ufc/mL.  
  
  
Ensayo de microdiluciones en caldo frente a una cepa de Pasteurella multocida  
serotipo B  
  
  
El ensayo de microdiluciones en caldo se utilizó para evaluar la actividad antimicrobiana  
  
extracelular de los aislados frente a P. multocida, debido a la dificultad para obtener un  
  
medio diferencial y específico para este patógeno en concreto (Huberman et al., 2015),  
a diferencia del caso anterior. Para este ensayo, se obtuvieron los sobrenadantes libres  
  
de células de las cepas de BAL a partir de cultivos puros en caldo MRS (37 ºC, 48 h)  
mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min y filtración a través de filtros para  
  
jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro (Branchia). La cepa patógena de P. multocida  
serotipo B, aislada de un caso clínico en jabalí (Risco et al., 2013), se cultivó en caldo MH  
  
a 37ºC durante 48 h con aireación. Los sobrenadantes de todos los aislados se diluyeron  
en serie y se testaron frente a una concentración de 107 ufc/mL del cultivo puro de P.  
  
multocida siguiendo un procedimiento similar al descrito para la determinación de las  
  
CMI de los antibióticos. Los resultados se expresaron como Unidades Arbitrarias  
(unidades de actividad) por mililitro (UA/mL) que viene definida como el recíproco de la  
  
mayor dilución que muestra una clara inhibición del crecimiento del patógeno (Casadei  
et al., 2009). Para comprobar esta inhibición, se sembraron 100 µL en MH agar de las  
  
diluciones que muestren inhibición del crecimiento.  
  
  
Prueba de la gota (spot-on-agar) frente a Listeria monocytogenes  
  
  
La prueba de la gota o spot-on-agar permite enfrentar directamente las células  
microbianas de las dos bacterias a testar y aporta mucha información para la evaluación  
 148 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 149:  
 LAB | Capítulo II  
  
de la actividad antimicrobiana de forma rápida y muy visual (Gutierrez et al., 2009). Se  
  
depositaron 5 µl de cada cultivo de los aislados de BAL cultivados en MRS en medio MH  
  
agar previamente inoculado con 1% de un cultivo de L. monocytogenes obtenido en su  
fase exponencial en medio TSB. Las placas se incubaron a 37 ºC durante 24 h para  
  
evaluar las zonas de inhibición del crecimiento. Se incluyeron como controles de  
actividad las siguientes cepas: L. plantarum WCFS-1, un fuerte acidulante (Kleerebezem  
  
et al., 2003); Pediococcus acidilactici PA1.0, productor de la bacteriocina de clase IIa sin  
modificaciones llamada «pediocina» (Gonzalez y Kunka, 1987); Lactococcus lactis  
  
NZ9700, productor de la bacteriocina de clase Ia denominada «nisina», con  
modificaciones postraduccionales; y Lactococcus lactis NZ9800, no productor de nisina  
  
que actúa como control negativo (Kuipers et al., 1993).  
  
  
Caracterización genotípica de la actividad antimicrobiana: identificación de genes que  
  
codifican para la producción de metabolitos antimicrobianos  
  
  
Para la caracterización genotípica de la actividad antimicrobiana se siguió el mismo  
procedimiento descrito en el método del capítulo I para los aislados que mostraron  
  
actividad antimicobacteriana. En este caso, se extendió el procedimiento al resto de  
aislados seleccionados, que se resumirá a continuación.  
  
  
La identificación de clústeres de asociados a la producción de bacteriocinas se realizó  
  
mediante el software online BAGEL4 (van Heel et al., 2018) y la anotación de los  
  
genomas se utilizó para detectar la presencia o ausencia fructosa-6-fosfato aldolasa y  
fosfocetolasa, dos enzimas que participan en las dos rutas metabólicas glucolíticas  
  
principales, mediante las cuales se liberan diferentes metabolitos antimicrobianos  
(ácido láctico, ácido acético, CO2, etanol…). Las anotaciones se utilizaron también para  
  
identificar genes asociados con la producción de Peróxido de Hidrógeno (H2O2),  
incluyendo genes que codifican para la piruvato oxidasa (Pox), lactato oxidasa (Lox) y  
  
NADH oxidasas, y también genes que codifican para NADH peroxidasas.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 149

Página 150:  
 LAB | Capítulo II  
  
3. Estudios de evaluación de la capacidad inmunomoduladora de los aislados de  
  
 bacterias ácido-lácticas  
  
 Para la evaluación de la capacidad inmunomoduladora de los aislados de BAL  
 seleccionados se realizó un estudio fenotípico de sus propiedades in vitro mediante un  
  
 análisis de la capacidad de estos para ser fagocitados y un ensayo para evaluar la  
 activación de dos rutas importantes de la respuesta inmunitaria. Además, se efectuó la  
  
 caracterización genotípica mediante la detección de genes que codifican para varios  
 ligandos, previamente descritos por otros autores, que pueden interaccionar con el  
  
 sistema inmunitario del hospedador.  
  
  
 Ensayo de la influencia sobre la capacidad fagocítica con células sanguíneas porcinas  
  
  
 Se realizó la toma de muestras de sangre porcina mediante el mismo procedimiento  
  
 descrito en el capítulo I. La sangre se incubó a 37 ºC durante 30 min junto con las cepas  
 de BAL previamente marcadas con PKH2, se lisaron con solución de lisis RBC (Biolegend)  
  
 y fueron procesadas por el citómetro de flujo BD FACS Celesta mediante los  
 procedimientos descritos previamente (Stedman et al., 2020). Se midieron la dispersión  
  
 frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC) para distinguir las principales poblaciones  
 sanguíneas en función de su tamaño y granularidad (por ejemplo, linfocitos vs.  
  
 fagocitos), mientras que el canal FITC permite medir diferentes intensidades de  
 fluorescencia emitida (GFP) en las células sanguíneas que se unen (ej. linfocitos) y/o  
  
 fagocitan (ej. fagocitos como monocitos y polimorfonucleares tales como neutrófilos).  
  
 El diagrama resultante SCC/GFP se utilizó para evaluar la fagocitosis de las BAL.  
 Evaluación de la respuesta macrofágica a las bacterias ácido-lácticas  
  
  
 Se utilizaron las líneas celulares de monocitos de THP-1-IFIT-1-GLuc y THP1-Lucia™ NF-  
  
 κB (Invivogen) para monitorear la activación de los factores de transcripción IFN-I y NF-  
 κB, respectivamente, tras la exposición a las BAL seleccionadas, mediante el  
  
 procedimiento descrito anteriormente (Stedman et al., 2020). Las células IFIT1-GLuc y  
 NF-κB-GLuc secretan luciferasa Gaussia (GLuc) bajo el control del promotor IFIT1 y NF-  
  
 κB, respectivamente. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio Roswell Park  
  
 150 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 151:  
 LAB | Capítulo II  
  
Memorial Institute (RPMI, Sigma Aldrich) 1640 con suero fetal bovino al 15 % (FCS,  
  
Seralaf) y penicilina / estreptomicina al 1% (Pen / Strep, Life Technologies) a 37 ºC en  
  
una atmósfera con 5 % de CO2. Las células se trataron con 20 ng/mL de forbol 12-  
miristato 13-acetato (PMA) para su diferenciación a macrófagos que posteriormente  
  
fueron expuestos a las BAL durante 2 h en medio RPMI con 2% de FCS en una proporción  
de 20 bacterias viables por macrófago. Después de la exposición, se sustituyó el medio  
  
de los macrófagos por RPMI con 2% de FCS y 1% de Pen / Strep y se incubaron durante  
20 h. A continuación, se midió la activación de IFIT1 y NF-κB en el lector de placas  
  
Clariostar (BMG Biotech) usando coelenterazina (NanoLigh Technology) a 2 µg/ml. La  
activación de las rutas mencionadas se calculó como un aumento de la actividad  
  
luciferasa en los macrófagos expuestos en comparación con las medidas registradas  
para los macrófagos no expuestos a las BAL.  
  
  
Caracterización genotípica de la capacidad inmunomoduladora: identificación de  
genes que codifican para la producción de moléculas inmunomoduladoras  
  
  
Para identificar los marcadores asociados con las respuestas inmunitarias innatas del  
  
hospedador, se siguió el mismo procedimiento genómico descrito para los marcadores  
de virulencia y genes de resistencia a antibióticos. Se buscaron proteínas involucradas  
  
en los mecanismos de evasión, adhesión y colonización utilizando Abricate y la base de  
datos VFDB. Además, se exploraron las anotaciones del genoma para identificar ligandos  
  
de las BAL interactúan con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como  
  
los TLR o receptores similares a NOD, descritos en la introducción incluidos los  
exopolisacáridos (EPS), precursores fimbriales, ácido teicoico y lipoteicoico (WTA, LTA)  
  
y lipoproteínas de membrana (Hevia et al., 2015; Sengupta et al., 2013; Van Tassell y  
Miller, 2011).  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 151

Página 152:  
 LAB | Capítulo II  
  
4. Estudio estadístico  
  
 El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 8.00 para Windows  
  
 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Los datos se  
 muestran con la media ± DE (desviación estándar) y representan tres réplicas biológicas.  
  
 Las diferencias entre aislados se analizaron mediante ANOVA de una vía y la prueba LSD  
 (Least Significant Difference) de Fisher.  
  
  
  
  
  
 152 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 153:  
 LAB | Capítulo II  
  
Figura resumen del método  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 153

Página 154:  
LAB | Capítulo II  
  
RESULTADOS  
  
  
  
El perfil de seguridad depende de las cepas y las especies de bacterias ácido-lácticas  
  
Para evaluar la seguridad de los aislados, se cuantificó su susceptibilidad a los  
  
antibióticos que se utilizan comúnmente en medicina humana y veterinaria y de forma  
paralela, se buscaron los genes asociados con resistencias a antibióticos para  
  
correlacionar estos marcadores con la tolerancia fenotípica de los aislados (Figura 2.3 y  
  
Figura 2.4). Todos los aislados fueron sensibles a ampicilina, cloranfenicol y eritromicina,  
con la excepción de E. faecalis que fue resistente para el último de ellos. Los genomas  
  
de las cepas de E. faecalis revelaron la presencia de lsa(A), un gen que codifica una  
bomba de eflujo que confiere resistencia expulsando los macrólidos fuera de la célula  
  
(Dina et al., 2003), lo que explicaría la resistencia detectada. Curiosamente, casi todas  
cepas fueron relativamente tolerantes a los aminoglucósidos (gentamicina, kanamicina  
  
y estreptomicina), y algunas de ellas fueron identificadas como resistentes según los  
estándares FEEDAP, como las cepas de L. plantarum C1 y EML1, L. salivarius C12 y P.  
  
acidilactici C5. Sin embargo, no se localizaron marcadores genotípicos de resistencia en  
ninguno de sus genomas. Por el contrario, se identificaron los genes tet(L) y tet(M),  
  
asociados con la resistencia a tetraciclina, en las cepas L. salivarius C2 y E. faecalis A1.  
  
Junto con L. plantarum C1, estas dos especies mostraron tolerancia a la tetraciclina.  
Además, observamos que E. casseliflavus fue tolerante a la vancomicina y que esta  
  
característica fenotípica se correlaciona con la presencia de múltiples genes de  
resistencia a la vancomicina (vanC2 / 3, vanXY-c4, vanT-C, vanR-C y vanS-C). Por último,  
  
no se encontraron marcadores genéticos asociados a resistencias antimicrobianas en  
ninguna de las cepas de P. acidilactici.  
  
  
Por otro lado, se buscaron marcadores de virulencia en los genomas de los aislados  
  
como parte del estudio de seguridad. Las dos cepas de E. faecalis poseen varios genes  
  
de virulencia, incluida una serina proteasa (sprE), una gelatinasa (gelE), proteínas  
asociadas a producción de biopelículas (ebpA, ebpB, ebpC) y su regulación (bopD),  
  
reguladores de sistemas de virulencia (fsrA, fsrB), citolisinas (cylI, cylA, cylB, cylM, cylS)  
  
 154 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 155:  
 LAB | Capítulo II  
  
y reguladores (cylR1, cylR2); hialuronidasas (EF0818, EF3023, EF0485), proteínas de  
  
superficie (fss1) y sustancias de agregación (asa1, prgB/asc10). Los genomas de  
  
lactobacilos y pediococos no mostraron factores de virulencia.  
  
  
  
  
  
Figura 2.3. Mapa de calor que muestra la susceptibilidad de los aislados a los antibióticos que se utilizan  
con frecuencia en medicina veterinaria y humana. La susceptibilidad se cuantificó utilizando  
concentraciones mínimas inhibitorias (CMI, µg/mL) y se representan como gradientes de color. Las cepas  
que son reconocidas como resistentes por los estándares FEEDAP se indican con una «R». La R redondeada  
indica concordancia entre la resistencia genotípica y fenotípica, con los marcadores de genes de  
resistencia mostrados en cursiva. No se requiere la evaluación de vancomicina (n.r.) para los lactobacilos  
y estreptomicina para L. plantarum, debido a su resistencia natural innata a estos antibióticos.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 155

Página 156:  
LAB | Capítulo II  
  
  
  
  
  
Figura 2.4. Genes de resistencia antimicrobiana y marcadores genéticos de virulencia. Los aislados de  
lactobacilos y pediococos carecen de genes de resistencia y virulencia, a excepción de L. salivarius C2 que  
presenta genes para la resistencia a tetraciclinas; y los aislados de enterococos presentan numerosos  
marcadores genéticos de resistencias antimicrobianas y virulencia, en especial las dos cepas de E. faecalis.  
  
  
  
La proximidad filogenética de BAL varía entre cepas aisladas de alimentos, animales y  
humanos.  
  
Para complementar el estudio de seguridad y determinar el origen filogenético de los  
  
aislados, se realizó un análisis comparativo de los genomas con otros genomas  
publicados para las mismas especies de BAL con diferentes orígenes. Los aislamientos  
  
de L. plantarum EML1 y SA3 son casi idénticos y ambos muestran similitudes con el  
  
aislado C1 (Figura 2.5). Todos ellos parecen estar relacionados con cepas aisladas de  
alimentos fermentados o productos relacionados con probióticos. De manera similar, L.  
  
paracasei SA5 se ubica cerca de cepas derivadas de alimentos, en particular productos  
  
 156 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 157:  
 LAB | Capítulo II  
  
lácteos fabricados para consumo humano (Figura 2.6). Los aislamientos C2 y C12 de L.  
  
salivarius se agruparon entre otros dos grupos que representan cepas de cerdos sanos  
  
y humanos (Figura 2.7). Curiosamente, los aislamientos de P. acidilactici C5 y R91  
mostraron una proximidad cercana a cepas de diverso origen, incluidos alimentos,  
  
animales y humanos (Figura 2.8), sin embargo, se observó una divergencia significativa  
entre estos dos pediococos. Mientras que la cepa C5 pertenece a un grupo en el que se  
  
encuentran otras cepas aisladas de alimentos fermentados, de humanos y animales de  
compañía, el aislado R91 se relaciona con un grupo diferente de cepas que derivan de  
  
alimentos (fermentados y lácteos) y animales de granja (pollo y cerdo), pero ninguna de  
ellas relacionadas con procesos patológicos. Por el contrario, ambos aislamientos de E.  
  
faecalis (A1 y R8) están muy cerca de las cepas patógenas aisladas de cerdos (Figura 2.9)  
De igual manera, E. casseliflavus también se encuentra en la proximidad de otros  
  
aislados patógenos pero derivados de pacientes humanos (Figura 2.10), aunque el  
  
número de genomas disponibles es muy reducido para establecer comparaciones.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 157

Página 158:  
LAB | Capítulo II  
  
 Figura 2.5. Árbol filogenético de los aislados de L. plantarum  
  
  
  
  
  
 Origen del aislado  
 Jabalí  
 Alimento crudo / fermentado  
 Humano  
 Lácteos  
 Medio ambiente / plantas  
 Animal  
  
  
  
  
  
 158 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 159:  
 LAB | Capítulo II  
  
  
  
 Figura 2.6. Árbol filogenético de los aislados de L. salivarius  
  
  
  
  
  
Origen del aislado  
Jabalí  
Animal  
  
Humano  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 159

Página 160:  
 LAB | Capítulo II  
  
  
  
  
 Figura 2.7. Árbol filogenético de los aislados de L. paracasei  
  
  
  
  
  
Origen del aislado  
Jabalí  
Lácteos  
Humano  
Alimento crudo / fermentado  
Medio ambiente / plantas  
Animal  
Bebida  
  
  
  
  
 160 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 161:  
 LAB | Capítulo II  
  
  
 Figura 2.8. Árbol filogenético de los aislados de Pediococcus acidilactici  
  
  
  
  
  
Origen del aislado  
Jabalí  
  
Alimento crudo / fermentado  
Animal  
Lácteos  
Humano  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 161

Página 162:  
 LAB | Capítulo II  
  
 Origen del aislado  
Figura 2.9. Árbol filogenético de los aislados de E. faecalis Jabalí  
  
 Animal  
 Humano  
 Medio ambiente / plantas  
 Alimento crudo / fermentado  
 Lácteos  
  
  
  
  
  
 162 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 163:  
 LAB | Capítulo II  
  
  
 Figura 2.10. Árbol filogenético de los aislados de E. casseliflavus  
  
  
  
  
  
Origen del aislado  
Jabalí  
  
Humano  
Desconocido  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 163

Página 164:  
LAB | Capítulo II  
  
La actividad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas frente a los patógenos es  
  
específica de la especie  
  
  
Las dos cepas de E. faecalis muestran la mayor actividad antimicrobiana frente a E. coli  
y ambas contienen grupos de genes implicados en la biosíntesis de sactipéptidos (Figura  
  
2.11), un grupo de bacteriocinas modificadas postraduccionalmente caracterizadas por  
  
la presencia de enlaces entre el azufre de las cisteínas y el carbono alfa de otros residuos  
(Grove et al., 2017). Además, el aislado E. faecalis A1 y E. casseliflavus R95 portan genes  
  
que codifican un lantipéptido (Figura 2.11C), otra bacteriocina modificada mediante  
enlaces tioéter postraduccionales (Repka et al., 2017). Por otro lado, los sobrenadantes  
  
de cultivos de L. salivarius mostraron una actividad muy significativa y específica frente  
a P. multocida (Figura 2.12), que albergan una cantidad considerable de genes que  
  
codifican bacteriolisinas, unas bacteriocinas de clase III que hidrolizan los  
peptidoglicanos de la pared celular (Cotter et al., 2005). Por último, un aislado de P.  
  
acidilactici (R91) mostró un halo claro de inhibición contra L. monocytogenes (Figura  
2.13A). Este aislado es el único que mostró actividad frente a este patógeno y el único  
  
que posee un grupo de genes asociado con la producción de pediocina (Fig. 2.13B), que  
  
muestra una actividad muy conocida por ser anti-listerial.  
  
  
  
  
  
Figura 2.11. E. faecalis inhibe E. coli y produce potencialmente bacteriocinas modificadas  
postraduccionalmente. (A) Reducción logarítmica de las ufc/ml de E. coli cuando se cocultiva con las BAL  
  
 164 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 165:  
 LAB | Capítulo II  
  
tras 24 h de incubación. La reducción logarítmica se calculó utilizando al menos 3 réplicas biológicas con  
respecto al monocultivo de E. coli. (B) Agar selectivo para enterobacterias (VRBG) que contiene el  
monocultivo de E. coli y un cocultivo con E. faecalis A1. (C) Clústeres de genes implicados en la biosíntesis  
de sactipéptidos y lantipéptidos, dos bacteriocinas modificadas postraduccionalmente que se encuentran  
en los aislados de E. faecalis A1 y R8 y E. casseliflavus R95. La nomenclatura para los grupos de  
bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las  
bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de modificación postraduccional (azul), las proteínas de  
transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas hipotéticas (gris).  
  
  
  
  
  
Figura 2.12. L. salivarius muestra actividad extracelular contra Pasteurella multocida y potencialmente  
secreta múltiples bacteriolisinas y bacteriocinas de clase II (A) Unidades Arbitrarias por mililitro (UA/mL)  
de los sobrenadantes obtenidos de los aislados frente a P. multocida serotipo B después de una  
incubación durante 24 h a 37 ºC. La UA / mL se define como el recíproco de la mayor dilución que muestra  
una clara inhibición del crecimiento del patógeno. (B) P. multocida en un ensayo de microdilución usando  
caldo Mueller Hinton. Inhibición del crecimiento después de la exposición con el sobrenadante de un  
cultivo de L. salivarius C2 (derecha) con respecto al control (izquierda).  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 165

Página 166:  
LAB | Capítulo II  
  
  
  
  
  
Figura 2.13. P. acidilactici R91 muestra una clara actividad anti-listerial y potencialmente bacteriocinas de  
un solo péptido sin modificar compatible con pediocina. (A) Prueba de la gota o «spot-on-agar» de los  
cultivos de las BAL frente a Listeria monocytogenes. Los controles se muestran en la fila inferior: L.  
plantarum WCFS-1 (pH +, acidulante), P. acidilactici PA1.0 (productor de pediocina, Ped), Lactococcus  
lactis NZ9700 (productor de nisina, Nis) y Lactococcus lactis NZ9800 (control negativo, pH-). (B) Grupo de  
genes implicados en la síntesis hipotética de Pediocin PA-1 en Pediococcus acidilactici R91. La  
nomenclatura es la misma que la citada anteriormente: las bacteriocinas precursoras (verde) y las  
proteínas de transporte / inmunidad (rojo).  
  
  
  
  
  
 166 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 167:  
 LAB | Capítulo II  
  
Algunas bacterias ácido-lácticas interactúan con los fagocitos y activan respuestas  
  
inmunitarias innatas  
  
  
El perfil fagocítico de los aislados se determinó mediante FACS utilizando sangre porcina  
y bacterias marcadas con PKH2. A excepción de L. salivarius C12, todos los lactobacilos  
  
interactuaron con los fagocitos, entre los cuales los monocitos respondieron mucho más  
  
que los neutrófilos, salvo en el único aislado de L. paracasei que también interactuó con  
los neutrófilos (Figura 2.14). Ninguno de los aislados de Pediococcus o Enterococcus  
  
mostró ninguna interacción significativa con los fagocitos. El perfil fagocítico de los  
lactobacilos se correlacionó positivamente con su capacidad para activar respuestas  
  
inmunitarias innatas protectoras en los macrófagos. Todos los lactobacilos indujeron la  
activación de NF-kB o IFN-I de forma diferente en función de la especie (Figura 2.15).  
  
Tanto L. plantarum como L. paracasei desencadenan una activación de IFN-I muy  
significativa, mientras que L. salivarius induce de forma muy potente la activación de  
  
NF-κB. El aislado de P. acidilactici C5 también activó una respuesta NF-κB significativa.  
El resto de los aislamientos, principalmente enterococcos, no activó ninguna de las vías  
  
de señalización.  
  
  
Se identificaron en los genomas marcadores asociados con respuestas inmunitarias  
  
innatas. Se encontraron genes que codifican proteínas implicadas en mecanismos de  
evasión, como polisacáridos capsulares (cap8A, capa, ywqC) en todos los aislados;  
  
adhesión, las adhesinas (cna y sraP) en L. plantarum y enterococos; y colonización, los  
factores de virulencia anteriormente descritos para enterococos (Figura 2.14D). Por otro  
  
lado, mediante las anotaciones del genoma detectamos otro tipo de ligandos que se  
asocian con la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como  
  
los TLR y los receptores tipo NOD (Figura 2.15D). Las moléculas encontradas en los 11  
  
aislados incluyen precursores fimbriales (ebpA, ebpB, ebpC, fimA y comC) de forma  
predominante en enterococos; componentes de la pared celular en todos los aislados  
  
como LTA (lta, ltaS1\_2, ltaS1\_3), WTA (tagGH, D-Ala) y lipoproteínas de membrana  
(TmpC, lolD); compuestos solubles en L. salivarius y L. paracasei (lactocepina PrtP) y  
  
proteínas ricas en serina-treonina (STp) en los pediococos; y agonistas de receptores  
TLR2 en L. plantarum (EPS) y L. paracasei (lipoproteína de membrana, lolD).  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 167

Página 168:  
LAB | Capítulo II  
  
  
  
  
  
Figura 2.14. Los lactobacilos interactúan con los fagocitos porcinos y portan moléculas asociadas con la adhesión celular. La respuesta de PMN (A) y monocitos  
(B) a las BAL se cuantificó utilizando bacterias marcadas con PKH2 y se expresa como log2 de la intensidad de fluorescencia media (MFI). (C) El perfil fagocítico  
de la mayoría de los aislados de lactobacilos son predominantemente monocíticos, pero L. paracasei también interactúa con los PMN. Los enterococos y los  
pediococos apenas muestran con los fagocitos. (D) Los aislados de LAB portan genes que se asocian con la evasión, la adhesión y / o la colonización.  
  
 168 MARÍA BRAVO SANTILLANA

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

Página 170:  
LAB | Capítulo II  
  
DISCUSIÓN  
  
  
En el capítulo anterior, se describió el aislamiento de varias especies de BAL que  
  
potencialmente podrían tener propiedades como probióticos, especialmente aquellas  
que fueron aisladas de jabalíes con una situación epidemiológica particular. Estos  
  
animales parecen ser naturalmente resistentes a la tuberculosis, puesto que la  
prevalencia de la enfermedad es nula pese a que su hábitat está localizado en varias  
  
zonas, geográficamente dispersas, de alto riesgo para esta enfermedad y las fincas en  
  
las que habitan están rodeadas de zonas con altas prevalencias. Además, dado que estos  
animales viven en condiciones de libertad y tienen menos influencia humana, gozan de  
  
una microbiota que podría disponer de importantes propiedades que deben ser  
estudiadas y analizadas en profundidad, y cuyas características únicas deben ser  
  
explotadas para lograr una mejora en la sanidad de animales que estén más  
condicionados a padecer enfermedades.  
  
  
Por ello, se decidió realizar una caracterización probiótica exhaustiva de las 11 BAL  
  
aisladas de la microbiota digestiva del jabalí. La caracterización se realizó en tres  
términos que son fundamentales para este propósito: en primer lugar, se realizaron  
  
varios análisis para evaluar la seguridad de los aislados para su posible utilización en  
  
animales; en segundo lugar, se analizaron sus propiedades antimicrobianas frente a  
patógenos de suidos en general y el jabalí en particular y; por último, se estudió su  
  
capacidad de interacción con las células del sistema inmunitario en un modelo de sangre  
porcina. Todos los fenotipos mostrados por las BAL trataron de ser corroborados por su  
  
genotipo mediante análisis bioinformáticos.  
  
  
La mayoría de las especies de lactobacilos y pediococos, comúnmente utilizados en  
productos probióticos, reciben el estado de presunción cualificada de seguridad (QPS),  
  
ya que, en principio, no entrañan ningún tipo de riesgo para su utilización en alimentos  
  
y piensos (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2021). Sin embargo, es  
recomendable realizar una evaluación completa para garantizar su seguridad, en  
  
particular cuando se sospecha que puedan poseer resistencias antimicrobianas  
  
 170 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 171:  
 LAB | Capítulo II  
  
adquiridas que puedan ser transferibles, especialmente cuando vienen codificadas en  
  
su genoma (REGLAMENTO (CE) No 429/2008 DE LA COMISIÓN de 25 de Abril de 2008  
Obre Normas de Desarrollo Para La Aplicación Del Reglamento (CE) No 1831/2003 Del  
  
Parlamento Europeo y Del Consejo Por Lo Que Se Refiere a La Preparación y  
Presentación de Solicitudes y a La Evaluación y Autorización de Aditivos Para Piensos,  
  
2008; EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed  
  
(FEEDAP), 2012). Los lactobacilos y pediococos aislados en este estudio no portan  
factores de virulencia y fueron susceptibles a la mayoría de los antibióticos probados,  
  
que son los recomendados por la EFSA para este propósito; aunque con algunas  
excepciones. La resistencia intrínseca encontrada en los aislados de lactobacilos y  
  
pediococos a la vancomicina es bien conocida (Campedelli et al., 2019; Goldstein et al.,  
2015; Nelson, 1999) y, de hecho, no se requiere la evaluación de este antimicrobiano  
  
para los grupos de bacterias mencionados (EFSA Panel on Additives and Products or  
Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012). Se encontró cierta tolerancia  
  
fenotípica a los aminoglucósidos, siendo algunas de las cepas resistentes, según los  
estándares FEEDAP, lo que también ha sido descrito previamente (Jaimee y Halami,  
  
2016; Klose et al., 2014; Singla et al., 2018). Aunque se observó resistencia fenotípica a  
  
la tetraciclina en tres lactobacilos en este estudio, solo L. salivarius C2 porta el  
determinante genotípico que codifica para la bomba de expulsión activa tet(L) y la  
  
proteína de protección ribosomal tet(M), que son los marcadores de resistencia  
adquirida más extendidos en los lactobacilos (Campedelli et al., 2019; Klose et al., 2014).  
  
Este aislado no cumple los criterios para el estado QPS y, por lo tanto, no puede ser  
considerada como aditivo alimentario debido al riesgo de transferencia horizontal de  
  
estos genes, que han sido asociados a plásmidos previamente (EFSA Panel on Additives  
and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2012; Jacobsen et al., 2007).  
  
El resto de las cepas que presentan una resistencia inherente sin el determinante  
  
genético son consideradas aceptables por la FEEDAP. De hecho, los niveles de tolerancia  
a los antibióticos encontrados en la última década en lactobacilos llevaron a la propuesta  
  
de reconsiderar los valores de corte recomendados por la EFSA (Campedelli et al., 2019).  
  
  
Por el contrario, aunque algunos enterococos se utilizan como aditivos alimentarios, el  
género no ha obtenido el estado QPS debido al potencial de algunas especies de  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 171

Página 172:  
LAB | Capítulo II  
  
transferencia de resistencia y patogenicidad (Hanchi et al., 2018). De hecho, se encontró  
  
un perfil de resistencias antimicrobianas y factores de virulencia completamente  
diferente en este grupo de BAL y prácticamente todas las resistencias fenotípicas  
  
detectadas se correlacionan con el genotipo. Ambos E. faecalis portan genes  
intransferibles, localizados en el cromosoma, que confieren resistencia a trimetoprim  
  
(dihidrofolato reductasa, dfrE) (Coque et al., 1999) y eritromicina (bomba de expulsión  
  
activa de múltiples fármacos, lsa (A)) (Dina et al., 2003). Los dos aislados de E. faecalis  
también mostraron resistencia a la tetraciclina, pero solo la cepa A1 porta el  
  
determinante tet(M), que presenta un gran riesgo de transferencia horizontal como se  
ha indicado anteriormente (Jacobsen et al., 2007; Jamet et al., 2012). E. casseliflavus  
  
forma parte del grupo de enterococos con resistencia intrínseca a la vancomicina y  
además alberga varios determinantes de esta resistencia (Cetinkaya et al., 2000;  
  
Lebreton et al., 2014). Estos aislamientos mostraron fenotipos y genotipos similares a  
estudios previos en jabalíes (Klose et al., 2014; Poeta et al., 2007). Además, los genomas  
  
de los dos aislados de E. faecalis revelaron la presencia de varios genes de virulencia,  
incluidas proteasas, gelatinasas, hialuronidasas, citolisinas, sustancias de agregación,  
  
proteínas de superficie y asociadas a biopelículas, que han sido ampliamente descritos  
  
en estudios previos (Ch’ng et al., 2019; Fisher y Phillips, 2009; Gomes et al., 2008; Martin  
et al., 2006), así como reguladores de virulencia que parecen jugar un papel importante  
  
en la patogénesis (Ali et al., 2017; Ch’ng et al., 2019; Gomes et al., 2008).  
  
  
Para completar la evaluación de seguridad de los aislados de BAL, los árboles  
filogenéticos proporcionaron una descripción general de las relaciones evolutivas entre  
  
nuestras cepas y otros aislados estrechamente relacionados de diversos orígenes  
(Baker, 2020). La evolución ecológica de las diferentes especies de BAL nos ayuda a  
  
comprender su origen y ha recibido una atención creciente en los últimos años (Duar et  
  
al., 2017; Zheng et al., 2015). Utilizando los términos propuestos previamente por  
algunos autores (Martino et al., 2016), se ha considerado que las especies L. plantarum  
  
y L. paracasei han evolucionado desde tener un comportamiento de «vida libre»  
asociado fundamentalmente al medio ambiente y a las plantas, a considerarse dos  
  
especies «nómadas», que pueden ser encontradas en diversos nichos ecológicos (Duar  
et al., 2017; Martino et al., 2016). Nuestros aislados de jabalí están relacionados  
  
 172 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 173:  
 LAB | Capítulo II  
  
principalmente con alimentos fermentados y productos lácteos, respectivamente. Por  
  
el contrario, L. salivarius es una especie que está mejor adaptada a sus hospedadores  
vertebrados (Duar et al., 2017) y esto se evidencia en nuestras cepas, que están  
  
relacionadas con aislamientos de animales sanos. En cualquier caso, nuestros aislados  
de lactobacilos están estrechamente relacionados con otras cepas ampliamente  
  
utilizadas como probióticos de diferentes fuentes (Ai et al., 2011; Choi y Chang, 2015;  
  
Liu et al., 2016; Zhang et al., 2019). Nuestros dos aislados de pediococcus se encuentran  
en dos grupos diferentes en el árbol filogenético, lo que sugiere diferentes orígenes  
  
evolutivos para ellos. Ambos aislamientos están relacionados con cepas alimentarias,  
sin embargo, C5 muestra la mayor similitud con P. acidilactici de la American Type  
  
Culture Collection ATCC® 8042 ™, cuyas propiedades como probióticos se han descrito  
ampliamente (Cho et al., 2019; Halim et al., 2017; Sandoval-Mosqueda et al., 2019); y P.  
  
acidilactici R91 se encuentra en el mismo grupo que las cepas de ganadería, pero  
ninguna de ellas está relacionada con procesos patológicos. Por el contrario, aunque los  
  
enterococos también tienen diferentes orígenes en la naturaleza, incluidos el tracto  
intestinal humano y animal, el medio ambiente y los alimentos, algunas especies  
  
aisladas de casos clínicos tienen potencial para causar infecciones (Akter et al., 2020;  
  
Hanchi et al., 2018). De hecho, los aislados de enterococos A1 y R8 están muy cerca de  
varias cepas patógenas aisladas de humanos y animales (Akter et al., 2020). Tanto E.  
  
faecalis A1 como R8 son similares entre ellos y, curiosamente, están muy próximos  
filogenéticamente a la cepa CVM N48037F de E. faecalis aislada de un jabalí.  
  
  
En virtud de todo lo anterior, podemos afirmar que, prácticamente todos los  
  
lactobacilos y pediococos se consideran seguros para su uso como probióticos, en  
contraste con los enterococos que pueden representar un riesgo potencial para la salud  
  
humana o animal. Además, dado el origen de las muestras, que fue descrito en el  
  
capítulo I de esta tesis doctoral, parece que las cepas que son inocuas están relacionadas  
con un mejor estado de salud en los animales de las fincas de estudio y los enterococos,  
  
relacionados con patógenos, se aislaron de animales adaptados a vivir en un ambiente  
más hostil. Esto nos lleva a pensar que, con una simple toma de muestras y  
  
procesamiento microbiológico básico podría ser posible predecir y monitorear el estado  
de salud y el medio ambiente de los animales, examinando su perfil de BAL comensales  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 173

Página 174:  
LAB | Capítulo II  
  
más abundante. No obstante, sería necesario confirmar esta cuestión con pruebas de  
  
campo e implementar este proceso de selección monitorizando otros parámetros,  
incluida la presencia de patógenos bacterianos y virales, para establecer buenos  
  
indicadores de salud. Además, en un estudio más avanzado con secuenciación completa  
del genoma y procesamiento bioinformático, se podrían determinar sus marcadores  
  
genómicos y sus relaciones filogenéticas para poder obtener más información sobre el  
  
origen de los aislados, lo que pone de manifiesto la importancia de la bioinformática  
para el manejo de poblaciones de fauna salvaje y medio ambiente, un campo totalmente  
  
inexplorado hasta la fecha.  
  
  
El primer cribado antimicrobiano de los aislados se realizó enfrentando las BAL a las  
bacterias M. smegmatis y M. luteus, lo que permitió realizar una selección de cepas con  
  
potencial actividad antibacteriana. M. smegmatis ha demostrado su utilidad como  
indicador para la detección del efecto antimicobacteriano, como se demostró en el  
  
capítulo I y en otro estudio (Stedman et al., 2020), y M. luteus es útil para detectar  
posibles BAL productoras de bacteriocinas, ya que es susceptible a la mayoría de los  
  
péptidos modificados postraduccionalmente (Stedman et al., 2020). Con el fin de  
  
determinar el potencial de las BAL como probióticos para el control de enfermedades  
infecciosas en fauna salvaje, se seleccionaron tres patógenos diferentes del jabalí como  
  
indicadores de la actividad antimicrobiana.  
  
  
Se utilizaron dos bacterias Gram- de las cuales una cepa de E. coli patógena se seleccionó  
como indicador representativo de procesos digestivos infecciosos en estos animales  
  
(Navarro-Gonzalez et al., 2015) y un aislado de P. multocida serotipo B, aislado de un  
caso clínico en jabalí (Risco et al., 2013), se utilizó como indicador de procesos  
  
respiratorios. Las dos cepas de E. faecalis muestran una fuerte actividad antimicrobiana  
  
frente a E. coli y ambas contienen grupos de genes implicados en la biosíntesis de  
sactipéptidos, un grupo de bacteriocinas modificadas postraduccionalmente  
  
caracterizadas por la presencia de enlaces entre el azufre de las cisteínas y el carbono  
alfa de otros residuos (Dunbar et al., 2017). Además, el aislado E. faecalis A1 y E.  
  
casseliflavus R95 portan genes que codifican un lantipéptido, otra bacteriocina  
modificada mediante enlaces tioéter postraduccionales (Repka et al., 2017). Las  
  
 174 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 175:  
 LAB | Capítulo II  
  
bacteriocinas de los enterococos han demostrado ser activas contra un amplio espectro  
  
de bacterias Gram-, incluida la E. coli, por lo que la actividad específica de estos aislados  
podría deberse a la producción de estas bacteriocinas, dado que estas dos cepas tenían  
  
menos capacidad de producir otros metabolitos antimicrobianos, como se explicó en el  
capítulo I. En todo caso, se debe explorar la utilización potencial de los aislados de E.  
  
faecalis productores de bacteriocinas con actividad antimicrobiana probada contra E.  
  
coli como una posible opción para controlar los brotes de esta infección en animales  
salvajes y domésticos. Sin embargo, es importante resaltar que estas dos cepas  
  
contienen determinantes de resistencia y factores de virulencia y no pueden utilizarse  
en productos probióticos que contengan bacterias vivas (EFSA Panel on Biological  
  
Hazards (BIOHAZ), 2021). Una posibilidad que puede ser explorada en un futuro es la  
purificación de las bacteriocinas y su administración como biofármacos, una vez que se  
  
proporcionen evidencias de su actividad y se realicen los ensayos de seguridad y  
toxicidad que requiera la normativa.  
  
  
Por otro lado, se encontró una actividad extracelular considerablemente potente a  
  
partir de los sobrenadantes de los cultivos de las dos cepas de L. salivarius frente a P.  
  
multocida serotipo B. Los aislados de L. salivarius producen dos tipos de bacteriocinas,  
tanto de clase IId como numerosas bacteriolisinas de clase III, y diferentes tipos de  
  
metabolitos con actividad antimicrobiana como lactato, acetato, etanol, H2O2 y CO2  
debido al metabolismo heterofermentativo de estas especies, que ya se explicaron en  
  
el capítulo I. Además, el posible efecto sinérgico entre estos metabolitos y el pH se  
explicó anteriormente y será estudiado en mayor profundidad en capítulos posteriores  
  
de esta tesis doctoral. Estudios previos describieron bacteriocinas con efecto inhibidor  
sobre Pasteurellaceae (Bizani y Brandelli, 2002; Desriac et al., 2010; Sugita et al., 1997).  
  
Además, un estudio publicó una cepa de L. amylovorus, una especie filogenéticamente  
  
cercana a L. salivarius (Duar et al., 2017), con una fuerte actividad contra especies de la  
familia Pasteurellaceae que podría explicarse por la producción de enterolisina A (Amat  
  
et al., 2019), una bacteriocina de clase III que también ha sido encontrada en nuestros  
aislados.  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 175

Página 176:  
LAB | Capítulo II  
  
Para completar el perfil antimicrobiano, se seleccionó la bacteria Gram+ Listeria  
  
monocytogenes, que puede causar septicemia y procesos reproductivos en cerdos y  
también ha sido aislada en jabalíes (Weindl et al., 2016; Yoshida et al., 2000). No es  
  
sorprendente que la única cepa que mostraba inhibición el aislado de P. acidilactici R91,  
puesto que su genoma reveló que esta bacteria tiene la capacidad de producir  
  
pediocina, una bacteriocina de clase IIa muy conocida por tener un efecto anti-listerial  
  
que se ha utilizado ampliamente como conservante de alimentos (Amado et al., 2016;  
Bédard et al., 2018).  
  
  
Es bien sabido que las BAL que forman parte de la microbiota interactúan con las células  
  
inmunitarias del hospedador y juegan un papel importante en el desarrollo de un  
sistema inmunitario adecuado (Hevia et al., 2015). Sin embargo, se necesita más  
  
información acerca de las moléculas y los mecanismos involucrados en esta interacción.  
La última parte del estudio de caracterización probiótica de los aislados de jabalí, se  
  
centra en la determinación de sus propiedades inmunomoduladoras, para lo cual se  
utilizó un modelo monocítico de sangre porcina, adaptado de un estudio previo que  
  
demostró ser útil para este propósito (Stedman et al., 2020).  
  
  
Se encontró un perfil de activación de las dos rutas de señalización inmunitaria testadas  
  
que fue especialmente relevante en los lactobacilos y resultó ser específico de las  
diferentes especies bacterianas de este estudio. Mientras que los aislados de L.  
  
salivarius mostraron una gran capacidad para inducir la activación de NF-kB, la vía del  
interferón IFN-I fue principalmente activada en presencia de L. plantarum y L. paracasei.  
  
Es importante, además, que perfil fagocítico de los lactobacilos se correlacionó  
positivamente con esta capacidad para activar respuestas inmunitarias innatas  
  
protectoras en los macrófagos, lo que concuerda con la importancia de que se produzca  
  
la fagocitosis bacteriana para la activación de mediadores proinflamatorios, mediante  
estas dos rutas mencionadas (Aderem, 2003; Kaufmann y Dorhoi, 2016). En este sentido,  
  
se encontraron en los genomas de L. plantarum y L. paracasei dos adhesinas (cna y sraP)  
asociadas a la internalización por los fagocitos que podrían tener un papel relevante  
  
(Foster et al., 2014). Sin embargo, no se encontraron determinantes genéticos que  
expliquen la internalización de los aislados de L. salivarius, aunque la ausencia de  
  
 176 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 177:  
 LAB | Capítulo II  
  
moléculas asociadas a la evasión podría ser suficiente para explicar la fagocitosis en  
  
estos aislados. Los pediococos mostraron cierta resistencia a la fagocitosis y una menor  
activación de las vía, lo que podría explicarse por la presencia de un probable  
  
polisacárido capsular en su genoma (ywqC), que facilitaría la evasión del sistema  
inmunitario del hospedador (Mijakovic et al., 2003).  
  
  
Los fagocitos del sistema inmunitario del hospedador discriminan entre bacterias  
residentes y patógenas a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR),  
  
como los TLR o NLR, que reconocen ligandos microbianos conocidos como MAMP (Hevia  
et al., 2015; Ren et al., 2016). Los MAMP incluyen una amplia variedad de metabolitos  
  
microbianos y moléculas estructurales como EPS, lipoproteínas de membrana, ácidos  
lipoteicoicos y teicoicos (LTA y WTA respectivamente), pili y fimbrias, entre otros (Hevia  
  
et al., 2015; Stedman et al., 2020), que han sido encontrados en todos los aislados de  
este estudio. Los componentes de la pared celular se encontraron en todos los aislados  
  
como LTA (lta, ltaS1\_2, ltaS1\_3), WTA (tagGH, D-Ala), lipoproteínas de membrana  
(TmpC, lolD), además del peptidoglicano presente en todas las bacterias Gram+ (Hevia  
  
et al., 2015; Ren et al., 2016). Además, cabe destacar que dos aislados de L. plantarum  
  
poseen genes asociados a la producción de EPS, que recientemente ha sido asociado a  
la inmunomodulación mediada por TLR2 y TLR4 en esta especie (Barragán et al., 2020);  
  
y L. paracasei posee una lipoproteína de membrana (lolD) que también podría estar  
involucrada en la activación vía TLR2 (Hutchings et al., 2009). Además, en este aislado  
  
se encontró el gen que codifica para lactocepina (PrtP), una enzima que contribuye a su  
efecto inmunomodulador degradando citoquinas proinflamatorias (Hevia et al., 2015;  
  
Hörmannsperger et al., 2013). Las proteínas ricas en serina-treonina (STp) que han sido  
encontradas en los pediococos parecen estar involucradas en procesos de agregación  
  
bacteriana y en la modulación de las células dendríticas y hasta ahora solo se habían  
  
descrito en lactobacilos y bifidobacterias (Hevia et al., 2015). Por otro lado, las  
bacteriocinas, que también son secretadas, pueden contribuir a los efectos  
  
inmunomoduladores actuando sobre las células mononucleares de sangre periférica,  
como los monocitos, y también sobre las células dendríticas (Hegarty et al., 2016).  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 177

Página 178:  
LAB | Capítulo II  
  
Los aislados que mostraron una estimulación de la ruta del interferón poseen los  
  
factores de adhesión que favorecerían la fagocitosis y la internalización necesaria para  
esta vía de señalización, con la subsecuente activación de sensores citosólicos o TLR  
  
endosomales, como ha sido propuesto en otros estudios previos (Kawashima et al.,  
2013; Negishi et al., 2012; Stedman et al., 2020), aunque se necesitaría investigar en  
  
profundidad estos mecanismos. No obstante, estos aislados podrían ser buenos  
  
candidatos para estimular la respuesta inmunitaria eficaz frente a patógenos virales,  
puesto que se ha comprobado que la activación de esta ruta sensibiliza las células del  
  
hospedador a la apoptosis, eliminando de esta forma el nicho del patógeno intracelular  
(Kawashima et al., 2013; Koyama et al., 2008). Este hecho es muy importante no solo  
  
para el control de enfermedades provocadas por virus en poblaciones animales, sino  
también para el desarrollo de inmunoadyuvantes de vacunas frente a infecciones por  
  
agentes virales (Lebedeva et al., 2018).  
  
  
Los aislados de L. salivarius, que mostraron una especificidad muy elevada tanto  
antimicrobiana, frente a P. multocida, como inmunomoduladora, activando respuestas  
  
proinflamatorias mediadas por TLR2 que activarían NF-kB, que es una ruta fundamental  
  
en la lucha frente a enfermedades bacterianas. Por esto, podrían ser utilizados como  
probióticos para el control de la pasterelosis, que es especialmente importante en  
  
animales de producción. De los dos aislados, el que realmente merecería la pena  
explotar sería el C12, puesto que carece de resistencias antimicrobianas genotípicas.  
  
Además, el estudio filogenético reveló que esta especie se encuentra muy adaptada a  
su hospedador, al contrario que las demás que han sido encontradas en orígenes muy  
  
diversos. Esto favorecería su utilización como probióticos, puesto que la colonización  
sería más eficiente y tendría mayor influencia sobre la fisiología del hospedador (Duar  
  
et al., 2017).  
  
  
Los enterococos no activaron ninguna de las dos vías estudiadas ni interaccionaron con  
  
los fagocitos, pese a poseer varios MAMP. Esto puede ser debido a los determinantes  
que poseen para evadir la respuesta inmunitaria y también a que el hospedador no  
  
reconozca estas bacterias como comensales sino como potencialmente patógenas,  
debido a los marcadores de virulencia que han sido detallados anteriormente y a que el  
  
 178 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 179:  
 LAB | Capítulo II  
  
estudio filogenético reveló una gran diversidad en el origen de las cepas similares. No  
  
obstante, dado el potencial antimicrobiano de los aislados, habría que estudiar en  
profundidad si el origen de esta actividad encontrada está en las bacteriocinas  
  
detectadas, para diseñar estrategias de purificación y producción de estas, sin necesidad  
de utilizar las bacterias vivas, dado su potencial para transferir genes de resistencia y  
  
causar enfermedad en los hospedadores. Algunas de estas estrategias incluyen el cultivo  
  
de fermentación de las bacterias en sus condiciones óptimas y la purificación mediante  
ultracentrifugación, cromatografía, precipitación o mediante la producción de  
  
recombinantes (Garsa et al., 2014; Van Zyl et al., 2019).  
  
  
Los pediococos mostraron una respuesta inmunomoduladora más limitada, pero nada  
desdeñable en el caso de P. acidilactici C5, que pareció activar NF-kB y también mostró  
  
algunos ligandos MAMP, aunque tuvo mucha menos influencia sobre la capacidad  
fagocítica No obstante, el mayor potencial lo encontramos en el aislado R91, un  
  
potencial productor de pediocina, que es una baceriocina muy importante como  
conservante para controlar las listeriosis alimentarias (Amado et al., 2016; Bédard et al.,  
  
2018) y cuyo uso en sanidad animal está todavía por explorar.  
  
  
Es muy relevante que la especificidad mostrada por las especies, tanto antimicrobiana  
  
como inmunomoduladora, nos deja una colección de aislados bacterianos que cumplen  
con los requisitos para ser utilizadas en fórmulas funcionales con compuestos bioactivos  
  
y que pueden explotarse para aportar soluciones a problemas sanitaros en diferentes  
poblaciones animales, tanto domésticas como salvajes.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 179

Página 181:  
 LAB | Capítulo III  
  
  
CAPÍTULO III: Optimización funcional del efecto antimicrobiano,  
determinación de la naturaleza de la actividad y estudios de  
sinergia con antibióticos  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 181

Página 182:  
LAB | Capítulo III  
  
  
  
  
  
 182 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 183:  
 LAB | Capítulo III  
  
INTRODUCCIÓN  
  
  
  
Etapas del crecimiento microbiano  
  
Las bacterias ácido-lácticas y otros microorganismos beneficiosos tienen capacidad  
  
ejercer un efecto inhibitorio para antagonizar a otros microorganismos con los que  
comparten nicho ecológico, tanto comensales como patógenos. El efecto  
  
antimicrobiano primario se debe a mecanismos de competencia por los nutrientes del  
nicho, pero también puede ser debido a la producción de sustancias inhibitorias  
  
producto de su metabolismo, lo que conlleva importantes ventajas tecnológicas (Cotter  
et al., 2005; Papagianni, 2012; Pessione, 2012).  
  
  
El crecimiento bacteriano se representa de forma gráfica mediante una curva cuyos  
tramos definen las diferentes fases del crecimiento en las poblaciones bacterianas. La  
  
primera fase se denomina de «latencia» y es un periodo de transición previo al inicio del  
crecimiento, cuando la bacteria es inoculada en el medio de cultivo. A esta fase le sigue  
  
una etapa de «crecimiento exponencial» o «fase logarítmica» en el que la velocidad de  
crecimiento es máxima hasta que alcanzan la «fase estacionaria», en la que cesa el  
  
crecimiento bien por agotamiento de nutrientes o por acumulación de productos  
tóxicos. La etapa final se conoce como «fase de muerte» porque empieza a disminuir  
  
rápidamente el número de células viables (Madigan et al., 2003). La duración de cada  
una de las fases depende de algunos parámetros como temperatura, tiempo, pH… y de  
  
la concentración de determinados nutrientes, y puede variar entre cepas bacterianas,  
  
incluso de la misma especie (Bárcena et al., 1998; Todorov y Dicks, 2006). Además, la  
producción de metabolitos es variable entre las diferentes fases, por lo que, a nivel  
  
industrial, es muy importante determinar en qué fases del crecimiento se produce la  
mayor parte de la actividad antimicrobiana y en qué condiciones de cultivo, de cara a  
  
optimizar la producción de moléculas antimicrobianas.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 183

Página 184:  
LAB | Capítulo III  
  
Fracciones antimicrobianas de las bacterias ácido-lácticas  
  
Los componentes antimicrobianos de las BAL pueden ser clasificados en función de su  
masa molecular, así, pueden ser moléculas de bajo peso molecular como los metabolitos  
  
de la fermentación liberados al medio por cualquiera de las dos vías glucolíticas  
principales: EMP y PKP. Las BAL homofermentativas convierten las hexosas en ácido  
  
láctico mediante la ruta EMP, mientras que las heterofermentativas además de generar  
  
ácido láctico también producen cantidades significantes de ácido acético, etanol y  
dióxido de carbono (CO2) mediante la ruta PKP (Papagianni, 2012). Todas estas  
  
moléculas que se han descrito, así como otros componentes de bajo peso molecular  
como los metabolitos del oxígeno, por ejemplo peróxido de hidrógeno, radicales libres  
  
y anión superóxido (Vásquez et al., 2009), pueden ejercer una actividad antimicrobiana  
en mayor o menor medida.  
  
  
Por otro lado, las BAL secretan otro tipo de componentes de alto peso molecular que  
  
son principalmente moléculas de naturaleza proteica y que se conocen con el nombre  
de «bacteriocinas» cuando son secretadas por bacterias Gram-positivas, como el caso  
  
que nos ocupa (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Cotter et al., 2005; Meade et al., 2020). Esta  
  
fracción proteica, que es secretada por las bacterias al medio extracelular, es la que  
tiene mayor interés industrial, por su estabilidad y mayores aplicaciones en sanidad  
  
animal y es uno de los mecanismos antimicrobianos naturales más antiguos que se  
conocen (Cotter et al., 2005). Las bacteriocinas se sintetizan en el ribosoma, pueden  
  
tener o no modificaciones postraduccionales y tienen modos de acción y espectro  
antimicrobiano variable entre las diferentes clases, como se vio en el capítulo anterior.  
  
  
  
  
Efecto sinérgico de los agentes antimicrobianos: combinación de bacteriocinas y  
  
antibióticos  
  
Las interacciones de carácter farmacodinámico de tipo funcional entre diferentes  
compuestos con actividad antimicrobiana se producen cuando se origina un aumento  
  
cuantitativo de la acción farmacológica por la acción simultánea de dos agentes, en este  
  
 184 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 185:  
 LAB | Capítulo III  
  
caso, antimicrobianos. Estas interacciones pueden ser de tipo aditivas o de  
  
potenciación. Las de tipo aditivas son sumatorias y se producen cuando al efecto  
terapéutico de un agente se añade el efecto terapéutico de otro, y ocurre generalmente  
  
cuando ambos agentes actúan sobre el mismo receptor o tienen el mismo mecanismo  
de acción. Las interacciones de potenciación son las sinergias propiamente dichas, y se  
  
producen cuando el efecto combinado de ambas es mayor al efecto de estos utilizados  
  
de forma individual (Blumenthal y Garrison, 2011).  
  
  
Las bacteriocinas de clase I y II, como se ha visto, tienen un mecanismo de acción muy  
parecido, que consiste en la formación de poros en la pared celular bacteriana y la  
  
disipación de la fuerza motriz de protones, aunque existen particulares en cada clase.  
Las bacteriolisinas actúan degradando la pared celular bacteriana, mientras que los  
  
mecanismos del resto de bacteriocinas de clase III necesitan ser investigados en mayor  
profundidad, especialmente los de tipo no lítico (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Se ha  
  
comprobado que la utilización conjunta de bacteriocinas de diferente clase potencia el  
efecto antimicrobiano original y amplía su espectro de inhibición frente a un mayor  
  
número de patógenos (Soltani et al., 2021). Asimismo, se ha comprobado que el ácido  
  
láctico permeabiliza la pared celular favoreciendo también la acción de las bacteriocinas  
y otros metabolitos antimicrobianos (Alakomi et al., 2000). Por otro lado, la acidificación  
  
del pH favorece la acción de las bacteriocinas y además dificulta el desarrollo de un gran  
número de microorganismos y, por el contrario, favorece el crecimiento de las BAL, que  
  
son ácido-tolerantes (Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2016; Vásquez et al., 2009). Por todo  
esto, la acción conjunta de todos los componentes antimicrobianos secretados por las  
  
BAL es fundamental para el desarrollo de una actividad antimicrobiana efectiva.  
  
  
Las bacteriocinas se han utilizado tradicionalmente para el control de la contaminación  
  
de los alimentos pero su utilización como agente terapéutico en medicina humana o  
animal actualmente es limitada debido a su baja biodisponibilidad (Ng et al., 2020;  
  
Soltani et al., 2021). Aunque las bacteriocinas por sí mismas se han propuesto como  
alternativa terapéutica para el tratamiento de diversas infecciones en función de su  
  
mecanismo de acción, una opción mucho más eficiente que está cobrando cada vez más  
relevancia en la actualidad, es utilizarlas en combinación con la terapia antibiótica  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 185

Página 186:  
 LAB | Capítulo III  
  
 (Meade et al., 2020; Ng et al., 2020). La combinación entre determinadas bacteriocinas  
  
 y los antibióticos, con los que puedan actuar de forma sinérgica, puede contribuir al  
 tratamiento de la infección potenciando su efecto antimicrobiano y también puede  
  
 prevenir el desarrollo de resistencias antimicrobianas si se consigue el mismo efecto  
 terapéutico con menos dosis de antibiótico (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021;  
  
 Mathur et al., 2017; Ng et al., 2020).  
  
  
 El objetivo de la terapia antibiótica es eliminar el agente infeccioso del organismo  
  
 mediante la administración de una cantidad óptima del agente antimicrobiano que  
 supere y mantenga durante un tiempo adecuado una concentración mínima capaz de  
  
 inhibir al microorganismo patógeno en el lugar de la infección (Bravo, 2019). La  
 resistencia de un microorganismo a un antibiótico al que originalmente era vulnerable  
  
 ocasiona que le terapia antibiótica se vuelva ineficaz, por lo que las infecciones persisten  
 y se incrementa el riesgo de propagación de los agentes infecciosos. A este fenómeno  
  
 se le conoce con el nombre de «resistencia antimicrobiana». La emergencia de bacterias  
 resistentes a los antibióticos es una de las mayores preocupaciones en materia de salud  
  
 a nivel global, puesto que supone una seria amenaza para la Salud Pública mundial. Este  
  
 fenómeno, unido al hecho de que el descubrimiento de nuevas clases de antibióticos o  
 antimicrobianos de nueva generación en la actualidad es muy limitado, pone de  
  
 manifiesto la necesidad para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas para el  
 control de enfermedades infecciosas (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021; Mathur et  
  
 al., 2017).  
  
  
 Los objetivos de este capítulo III son:  
- Optimizar la producción de moléculas antimicrobianas en una selección de BAL descritas  
  
 en los capítulos anteriores.  
  
- Determinar la naturaleza de la fracción del sobrenadante con mayor potencial  
 antimicrobiano.  
  
- Estudiar la sinergia in vitro de los metabolitos producidos por las BAL y una selección de  
 antibióticos importantes en medicina veterinaria frente a los patógenos indicadores P.  
  
 multocida y E. coli.  
  
  
 186 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 187:  
 LAB | Capítulo III  
  
 MÉTODO  
  
  
  
1. Optimización de la producción de moléculas antimicrobianas y obtención de  
 sobrenadantes  
  
 Para valorar las condiciones de cultivo óptimas para las bacterias, se realizó un estudio  
 de cinética microbiana. Se realizaron fermentaciones controladas a 37 ºC y se tomaron  
  
 muestras a tiempo 24 h, 48 h y 72 h. Estas muestras fueron diluidas en serie y sembradas  
 en MRS para calcular las ufc/mL y se midió la absorbancia a 600 nm mediante un  
  
 espectrofotómetro (Lan Optics® V-1100).  
  
  
 La monitorización de la producción de metabolitos antimicrobianos se realizó mediante  
  
 ensayos de actividad iguales a los descritos previamente en el capítulo II y que fueron  
 diferentes para cada BAL, en función de su espectro antimicrobiano. Para L. plantarum  
  
 EML1 y L. casei SA5 se eligió como patógeno indicador la bacteria E. coli, se realizó la  
 técnica del cocultivo inoculando diferentes proporciones de las BAL y el patógeno en el  
  
 medio TSB e incubando a 37 ºC durante 24 h y se expresaron los resultados como  
 porcentaje de inhibición. Para el ensayo de la bacteria L. salivarius C12 se obtuvieron los  
  
 sobrenadantes libres de células microbianas mediante centrifugación a 5000 r.p.m  
 durante 10 min y posterior filtrado mediante un filtro estéril millipore (Branchia) para  
 jeringa de 0,22 µm y se realizaron diluciones en serie 1:2 en una placa de 96 pocillos con  
  
 medio MH. Se inoculó la bacteria patógena P. multocida con los correspondientes  
  
 controles y, tras una incubación a 37 ºC durante 24 h, se calcularon las Unidades  
 Arbitrarias por mL (UA).  
  
  
  
  
2. Determinación de la naturaleza de la actividad antimicrobiana  
  
 Nuestros estudios previos demostraron que la actividad de los sobrenadantes se debe a  
  
 la presencia de metabolitos liberados durante el proceso de fermentación que ejercen  
 un efecto sinérgico con el pH, siendo más activos a pH ácido. Para comenzar a  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 187

Página 188:  
LAB | Capítulo III  
  
caracterizar las fracciones que puedan tener una mayor importancia sobre la actividad  
  
total, se realizaron diversos tratamientos de los sobrenadantes, seguido de nuevos  
ensayos de actividad para determinar, fundamentalmente, la importancia de las  
  
moléculas de naturaleza proteica. Los tratamientos realizados se describen a  
continuación.  
  
  
Tratamiento enzimático de los sobrenadantes  
  
  
La enzima DNasa degrada los fragmentos de ADN que hayan podido ser liberados al  
medio durante la lisis bacteriana. Se añadió DNasa a los sobrenadantes a una  
  
concentración final de 0,5 mg/mL y se incubaron durante 10 min a temperatura  
ambiente.  
  
  
Las enzimas pronasa, tripsina y proteinasa K son tres enzimas proteolíticas que degradan  
  
las proteínas, por lo que objetivo de este tratamiento es eliminar las proteínas del  
sobrenadante. Se añadieron las enzimas de forma independiente a los sobrenadantes a  
  
una concentración final de 0,1 mg/mL para la proteinasa K y a 1 mg/mL para la pronasa  
  
y la tripsina. Se añadió la misma concentración de enzimas al mismo volumen de medio  
MRS como control negativo y se dejaron incubar las muestras problema, el control  
  
negativo y un control del sobrenadante sin proteinasa durante 1 h a 56 ºC para la  
proteinasa K y 1 h a temperatura ambiente para las otras dos enzimas. En el caso de la  
  
proteinasa K se realizó por duplicado y la mitad de los sobrenadantes se trató a 95 ºC  
durante 15’ para desnaturalizar la proteinasa, incluidos los controles negativos, por si el  
  
efecto de la incubación a temperatura alta o la propia proteinasa pudiese afectar a la  
actividad de los sobrenadantes.  
  
  
Tratamiento de los sobrenadantes con diferentes temperaturas  
  
  
Se trataron los sobrenadantes a diferentes temperaturas por varios motivos. Por un  
lado, los tratamientos con calor son importantes durante el proceso de fermentación y,  
  
especialmente, para el proceso de inactivación de células vivas para la obtención de  
productos posbióticos. Por otro lado, algunos grupos de bacteriocinas son  
  
 188 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 189:  
 LAB | Capítulo III  
  
termoestables, mientras que otros son termolábiles, por lo que la información sobre la  
  
actividad de los sobrenadantes en función de la temperatura también nos aporta  
información sobre la contribución de este tipo de bacteriocinas a la actividad.  
  
  
Se incubó 1 mL de cada sobrenadante a diferentes temperaturas: 40, 70, 80 y 90 ºC  
  
durante 10 min en un termobloque (Analog heatblock, VWR) y para los controles  
  
negativos se incuba 1 mL de MRS a las diferentes temperaturas. Se realizó la incubación  
por duplicado, incluidos los controles y, una vez transcurrido el tiempo de incubación,  
  
los sobrenadantes se dejaron enfriar de forma progresiva a temperatura ambiente.  
  
  
Tratamiento de los sobrenadantes con tricloroacético  
  
  
El objetivo de este tratamiento es logar la precipitación ácida de las proteínas mediante  
la adición de tricloroacético (TCA) para separar y concentrar la fracción proteica, sin  
  
degradarla. Se añadió TCA a una concentración final del 20 % a los sobrenadantes y al  
medio MRS como control negativo y se incubaron durante 10 min a 4 ºC. Se  
  
centrifugaron las muestras y el control a 14.000 r.p.m. durante 5 min, se lavó dos veces  
  
el pellet con 200 µL de acetona fría (-20 ºC) y se volvió a centrifugar a las mismas  
condiciones. Se incubó el pellet en un termobloque a 95 ºC durante 10’ para evaporar  
  
la acetona y se resuspendió el pellet seco en 1mL de caldo MRS. Se midió el pH por si  
hiciese falta neutralizarlo al mismo pH del sobrenadante original.  
  
  
Separación de las fracciones de los sobrenadantes por peso molecular  
  
  
Se separaron diferentes fracciones de los sobrenadantes en función de los pesos  
  
moleculares de sus componentes, principalmente proteínas, mediante  
  
ultracentrifugación y filtración a través de membranas con diferentes cortes de peso  
molecular. Se utilizaron filtros de 50K, de 30K, de 10K y de 3K (Amicon®) y se emplearon  
  
consecutivamente de mayor a menor para obtener las diferentes fracciones, filtrando  
un volumen total de 10 mL de sobrenadante. Se filtraron los primeros 500 µL en los  
  
filtros de 50K en una ultracentrífuga (Eppendorf 5424 R) en refrigeración a 4 ºC a 14 K g  
durante 10 min. Se obtuvo el volumen concentrado en el filtro de 50K centrifugando a  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 189

Página 190:  
 LAB | Capítulo III  
  
 1K g durante 2min en refrigeración (>50K) y el volumen filtrado se conservó (<50K) y se  
  
 filtró con la siguiente membrana en tamaño. Se repitió el procedimiento para los filtros  
 de 30K (10 min 14 K g), de 10 K (20 min 14 K g) y de 3K (50 min-1h 14K g) utilizando  
  
 siempre los filtrados de la membrana inmediatamente anterior. Los concentrados  
 obtenidos por fracciones fueron >50 K, 30-50 K, 10-30 K y 3-10 K y el último filtrado se  
  
 conservó como <3 K. Se anotaron todos los volúmenes filtrados y concentrados para  
  
 realizar las diluciones pertinentes a la hora de hacer el ensayo de actividad.  
 Todos los sobrenadantes tratados se congelaron a -80 ºC con 15 % de glicerol hasta su  
  
 procesamiento para el ensayo de actividad.  
  
  
 Mediante el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior, se realizó un ensayo  
 de actividad de los sobrenadantes tratados frente a la bacteria indicadora P. multocida  
  
 mediante la técnica de microdiluciones y el cálculo de Unidades Arbitrarias por mL (UA).  
 Este procedimiento permite cuantificar la actividad y así poder comparar los diferentes  
  
 valores numéricos entre los controles positivos (sobrenadantes sin tratar), las muestras  
 problema (los sobrenadantes tratados) y los controles negativos (el medio de cultivo  
  
 MRS con y sin los tratamientos de los sobrenadantes).  
  
  
  
  
3. Estudio de los metabolitos en sinergia con antibióticos  
  
 El objetivo del procedimiento que será descrito a continuación es el de estudiar la  
 sinergia in vitro de los metabolitos producidos por las BAL y una selección de antibióticos  
  
 importantes en medicina veterinaria frente los patógenos indicadores P. multocida y E.  
 coli. Ambos aislados patógenos han sido aisladas por INGULADOS en sendos casos  
  
 clínicos a partir de un brote con elevada mortalidad por pasterelosis en un cebadero de  
 cordero y de un brote de colibacilosis en porcino, respectivamente, y ambos mostraron  
  
 multirresistencia antimicrobiana. Los antibióticos seleccionados fueron amoxicilina,  
  
 gentamicina, doxicilina y enrofloxacina, por su utilización en medicina veterinaria  
 debido a que tienen un amplio espectro de acción y también porque pueden ser  
  
 utilizados en ensayos con roedores de experimentación, que será descrito en el capítulo  
  
  
 190 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 191:  
 LAB | Capítulo III  
  
siguiente. Para ello, se eligió la técnica del Epsilon test o epsilometría (Etest®,  
  
bioMérieux), que es una expansión del método tradicional Kirby-Bauer de difusión de  
discos en agar que permite realizar una lectura directa de la concentración mínima  
  
inhibitoria (CMI), pero con modificaciones que permitan incluir los compuestos  
bioactivos producidos por las BAL y se considera un buen método para la detección de  
  
sinergia entre compuestos (Mathur et al., 2017). Así, podremos cuantificar cambios en  
  
las CMI cuando incluimos los compuestos bioactivos, detectando posibles casos de  
sinergia.  
  
  
En primer lugar, se prepararon placas con medio de cultivo Mueller Hinton y Mueller  
  
Hinton II (suplementado con 5 % de sangre de oveja) a las que se añadieron  
concentraciones crecientes de sobrenadantes con los metabolitos producidos por las  
  
BAL. Los sobrenadantes libres de células microbianas se obtuvieron, mediante los  
procedimientos de centrifugación y filtrado descritos anteriormente, a las condiciones  
  
óptimas para cada bacteria determinadas a partir de los resultados del procedimiento  
de optimización, esto es, 37 ºC para todos los aislados durante 24 h para L. plantarum y  
  
70 h para L. casei y L. salivarius. Los sobrenadantes se añadieron al medio MH II antes  
  
de solidificar cuando su temperatura fue inferior a 40 ºC, para no alterar la fracción  
proteica. Las concentraciones finales en el medio fueron 5 % y 10 %. A partir de cultivos  
  
puros de los patógenos, se prepararon suspensiones en solución salina a una turbidez  
0,5 en la escala de McFarland y se inocularon mediante un hisopo en las placas de MH  
  
para E. coli y MH II para P. multocida. Los controles negativos para comparar la posible  
acción sinérgica consistieron en las placas sin sobrenadantes. Para la realización del  
  
Etest® se colocaron las tiras de plástico no poroso (bioMérieux), que llevan incluido un  
gradiente antimicrobiano de 15 diluciones para cada uno de los antibióticos elegidos  
  
(amoxicilina, gentamicina, doxicilina y enrofloxacina) y creando, tras su difusión en el  
  
agar, un gradiente exponencial de las concentraciones del antibiótico que se reflejan  
como zonas de inhibición elipsoidales y simétricas a lo largo de las tiras, tras la  
  
incubación a 37 ºC durante 24 h. El valor de CMI se obtuvo a partir del punto de  
intersección entre el extremo de inhibición y la tira.  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 191

Página 192:  
LAB | Capítulo III  
  
  
  
  
  
 192 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 193:  
 LAB | Capítulo III  
  
Figura resumen del método  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 193

Página 194:  
LAB | Capítulo III  
  
RESULTADOS  
  
  
La etapa de crecimiento microbiano en la que se detecta la producción óptima de  
metabolitos antimicrobianos difiere según la especie  
  
En el caso de L. plantarum EML1 y L. casei SA5, se decidió utilizar como indicador la  
bacteria E. coli en función de los resultados previos. La actividad máxima (100% de  
  
inhibición) se obtuvo con el cocultivo con L. plantarum a las 24 h del inicio de la  
fermentación, cuando la bacteria se encuentra al final de la fase de crecimiento  
  
exponencial (Tabla 3.1 y Figura 3.1 y 3.2). En el caso de L. casei, su actividad máxima  
aparece más tarde, a las 72 h después del inicio de la fermentación, durante la fase  
  
estacionaria (Tabla 3.1 y Figuras 3.1 y 3.2). En cuanto L. salivarius se escogió utilizar  
  
como indicador la bacteria P. multocida debido también a resultados previos. Como  
puede observarse en la tabla 3.1, se encontró que la mayor actividad mostrada por esta  
  
bacteria se daba a las 72 h después del inicio de la fermentación, cuando la bacteria se  
encuentra en fase estacionaria, justo después de la fase de crecimiento exponencial, por  
  
lo que parece que el crecimiento de esta bacteria es más lento. Además, para todas las  
bacterias se consiguió incrementar su actividad antimicrobiana con respecto a estudios  
  
previos, por lo que se optimizó la producción de metabolitos antimicrobianos.  
  
 Tabla 3.1. Resultado de la concentración bacteriana y actividades antimicrobianas para los aislados de  
  
 BAL seleccionados  
  
 Tiempo ABS600 Recuentos Actividad antimicrobianaa  
 (h) (ufc/mL)  
 L. plantarum EML1 0 0,03 1,7·106 0 %  
 24 6,16 1,51·109 100 %  
 48 8,11 1,56·109 99,97 %  
 72 8,6 1,63·109 96,67 %  
 L. casei SA5 0 0,03 1,7·106 0 %  
 24 6,53 1,37·109 65 %  
 48 7,16 1,50·109 93,5 %  
 72 7,82 1,53·109 99,87 %  
 L. salivarius C12 0 0,13 1,29·107 0 UA  
 24 8,56 1,05·109 1600 UA  
 48 8,09 1,22·109 1600 UA  
 72 9,14 1,39·109 3200 UA  
 aPorcentaje de inhibición de E. coli para EML1 y SA5 y Unidades Arbitrarias frente a P. multocida para  
 C12.  
 194 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 195:  
 LAB | Capítulo III  
  
  
  
  
  
Figura 3.1. Curvas de concentración bacteriana en función del tiempo de fermentación para L. plantarum  
EML1 (círculos), L. casei SA5 (cuadrados) y L. salivarius C12 (triángulos). Los puntos marcados con estrellas  
muestran la actividad antimicrobiana máxima, que se detecta al final de la fase exponencial para EML1 y  
en la fase estacionaria para SA5 y C12.  
  
  
  
  
  
Figura 3.2. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana máxima encontrada para EML1, que  
representa un porcentaje de inhibición de la bacteria patógena del 100 % con los metabolitos producidos  
tras 24 h de incubación y de SA5, que es 99,87 %, con los metabolitos antimicrobianos producidos a las  
72 h de incubación.  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 195

Página 196:  
LAB | Capítulo III  
  
La fracción proteica extracelular contribuye de forma significativa a la actividad  
  
antimicrobiana de los cultivos  
  
En la tabla 3.2 se muestran los resultados de forma resumida mediante un gradiente de  
  
color que indica si se ha mantenido la actividad antimicrobiana basal, si esta actividad  
se ha reducido, aunque pueda seguir considerándose como buena o si por el contrario  
  
la actividad ha disminuido o incluso ha llegado a desaparecer. Mientras que el  
  
tratamiento con DNasa no tuvo ningún efecto sobre la actividad basal de los  
sobrenadantes, los tratamientos con las enzimas proteolíticas proteinasa K, pronasa y  
  
tripsina y la precipitación con tricloroacético ocasionaron una eliminación total de la  
actividad antimicrobiana. En cuanto a los resultados de los filtrados por pesos  
  
moleculares, se obtuvo que las fracciones más pequeñas (F 3 -10 y F < 3 en la tabla)  
conservan buena parte de la actividad de los sobrenadantes. Por otro lado, en función  
  
de los datos obtenidos después de los tratamientos con diferentes temperaturas,  
observamos que la actividad disminuye a medida que se alcanzan temperaturas altas  
  
para EML1 y SA5. Según se muestra en la tabla, para estos dos aislados la actividad se  
mantiene estable a temperaturas hasta 70 ºC y comienza a disminuir a partir de 80 ºC,  
  
desapareciendo a 90 ºC en el caso de L. plantarum EML1.  
  
  
 Tabla 3.2. Resultados de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes tratados.  
  
  
  
  
  
 196 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 197:  
 LAB | Capítulo III  
  
En el caso de L. salivarius C12 la actividad se mantiene estable en todo el rango de  
  
temperaturas probado (Tabla 3.2) y son las fracciones pequeñas las que muestran la  
actividad antimicrobiana (Figura 3.3).  
  
  
  
  
 2 4 8 16 32 64 C-  
  
 Control 1600 UA  
  
 200 UA F > 50 KDa  
  
 200 UA F 30-50 KDa  
  
 200 UA F 10-30 KDa  
  
 800 UA F 3-10 KDa  
  
 F < 3 KDa 1600 UA  
  
  
  
Figura 3.3. Resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana encontrada para las diferentes  
  
fracciones por pesos moleculares de L. salivarius C12. Las fracciones más pequeñas (3 -10 KDa y < 3 KDa)  
conservan buena parte de la actividad basal del sobrenadante completo (control).  
  
  
  
Los sobrenadantes de las BAL contienen metabolitos que pueden actuar en sinergia  
  
con antibióticos en dos cepas patógenas con multirresistencia antimicrobiana  
  
En la tabla 3.3 se muestran los resultados de las CMI para los dos patógenos indicadores  
  
seleccionados del Etest® frente a los antibióticos utilizados de forma aislada y en  
  
combinación con los sobrenadantes de las bacterias ácido-lácticas. Los resultados en la  
tabla se muestran como un gradiente de color, donde el rojo indica que no existió  
  
diferencia en la CMI cuando se utilizó en combinación con los sobrenadantes y en verde  
se muestran las combinaciones en las que existió sinergia, es decir, en las que, al añadir  
  
los metabolitos producidos por las bacterias lácticas, la CMI disminuyó.  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 197

Página 198:  
LAB | Capítulo III  
  
En el caso de E. coli multirresistente, como se observa en la tabla 3.3 y en la figura 3.4,  
  
se consiguió inhibición en su crecimiento cuando se combinaron los metabolitos de la  
bacteria L. salivarius C12 y los diferentes antibióticos. La CMI era >256 µg/mL para todos  
  
los antimicrobianos, es decir, la bacteria patógena mostraba multirresistencia  
antibiótica y disminuyó a 0,125 µg/mL para amoxicilina, 16 µg/mL para gentamicina, 2  
  
µg/mL para enrofloxacina y 64 µg/mL para doxaciclina con la adición del sobrenadante.  
  
En todos los casos, la bacteria continúa siendo resistente, excepto en el caso de la  
amoxicilina, que pasó a ser sensible.  
  
  
En el caso de P. multocida, se observó una disminución en la CMI de la doxicilina  
  
necesaria para inhibir a la bacteria patógena, del punto de corte equivalente a 4 µg/mL  
(resistente) a 1 µg/mL (sensible) al combinarlo con los sobrenadantes de todas las  
  
bacterias (Figura 3.5). No se detectaron diferencias en el resto de las combinaciones  
probadas.  
  
  
Tabla 3.3. Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias (µg/mL) de los antimicrobianos frente  
 a los patógenos solos y en combinación con los sobrenadantes  
  
  
  
  
  
 198 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 199:  
 LAB | Capítulo III  
  
  
 A B  
  
  
  
  
  
Figura 3.4. Técnica E-test para el patógeno E. coli multirresistente en combinación con el sobrenadante  
de la bacteria ácido-láctica L. salivarius C12. (A) Se observa un crecimiento total del patógeno pese a la  
colocación de las tiras con antibióticos (>256 µg/mL) y (B) la aparición de inhibición del cultivo al añadir  
el sobrenadante de la bacteria C12, con diferentes puntos de corte para los diferentes antibióticos.  
  
  
 A B  
  
  
  
  
  
Figura 3.5. Técnica E-test para el patógeno P. multocida resistente a tetraciclinas y el antimicrobiano  
doxiciclina en combinación con el sobrenadante de la bacteria ácido-láctica L. salivarius C12. Se observa  
una disminución en el punto de corte equivalente a la CMI de 4 µg/mL en el control (A) a 1 µg/mL al añadir  
el sobrenadante al 10 % (B).  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 199

Página 200:  
LAB | Capítulo III  
  
DISCUSIÓN  
  
  
Debido al metabolismo fermentativo de las BAL su utilización a nivel industrial para la  
producción de metabolitos inhibidores del crecimiento de patógenos está cada vez  
  
cobrando mayor importancia en la actualidad. Por ello, se hace necesario el diseño de  
estrategias que permitan conocer la naturaleza de esos metabolitos y optimizar su  
  
producción. En este trabajo se describen los procedimientos para determinar la  
naturaleza de los metabolitos antimicrobianos y optimizar su producción en una  
  
selección de aislados de BAL descritos en los capítulos anteriores de esta tesis doctoral.  
  
  
Como se ha comentado en la introducción, la determinación de la fase de crecimiento  
  
microbiano en la que se producen la mayor parte de metabolitos antimicrobianos  
depende de cada cepa bacteriana y es fundamental para optimizar el proceso  
  
tecnológico de elaboración de suplementos con actividad antimicrobiana. En este  
estudio, se consiguió optimizar la producción de metabolitos antimicrobianos, ya que se  
  
obtuvieron valores de actividad antimicrobiana superiores a los arrojados por estudios  
previos incluidos en esta tesis doctoral, concretamente en el capítulo II. Es muy  
  
interesante el hecho de que la actividad antimicrobiana máxima haya sido detectada en  
diferentes fases del crecimiento microbiano para cada una de las cepas estudiadas, por  
  
lo que este método de optimización de la producción de metabolitos antimicrobianos  
se considera de gran utilidad industrial a la hora de elaborar un suplemento y lograr la  
  
máxima eficacia de sus componentes. Algunos otros parámetros que no se han medido  
  
en este estudio y que pueden condicionar la actividad antimicrobiana porque favorecen  
el crecimiento de las cepas bacterianas podrían ser la composición de nutrientes del  
  
medio, el pH, la temperatura, la humedad, la concentración de O2 y CO2, entre otros  
(Bárcena et al., 1998; Todorov y Dicks, 2006). Por ello, en futuros estudios se  
  
monitorizarán estos parámetros con el objetivo de estandarizar su producción a escala  
industrial y también de poder abaratar el proceso de producción.  
  
  
En el caso de L. plantarum y L. casei, la actividad antimicrobiana máxima frente al  
  
patógeno indicador E. coli se produce durante la fase de crecimiento exponencial, previo  
  
  
 200 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 201:  
 LAB | Capítulo III  
  
al inicio de la fase estacionaria, que en este estudio fue a las 24 h después del inicio de  
  
la fermentación para la primera cepa y a las 72 h para la segunda, que parece tener un  
crecimiento más lento. Las curvas de crecimiento microbiano coinciden con estudios  
  
previos en otras cepas de estas especies (Al-Otaibi et al., 2016; Barragán et al., 2020;  
Teneva et al., 2016). La actividad antimicrobiana máxima encontrada coincide con el  
  
momento de mayor producción de metabolitos antimicrobianos como las bacteriocinas  
  
de clase IIb encontradas en ambos genomas y que fueron descritas en capítulos  
anteriores (Bárcena et al., 1998; Reenen, 1998; Zacharof y Lovitt, 2012); y con la máxima  
  
producción de ácido láctico (Rezvani et al., 2017), que también tiene efecto  
antimicrobiano frente al patógeno E. coli (Teneva et al., 2016). El hecho de que la  
  
actividad antimicrobiana de L. casei aparezca bastante más tarde puede ser debido a  
que el pH disminuye de forma más acusada a las 70 h después del inicio de la  
  
fermentación, especialmente en esta especie (Al-Otaibi et al., 2016). Además, en el  
capítulo I ya se comprobó la influencia del pH sobre la actividad antimicrobiana en esta  
  
cepa en concreto. Se optimizó la actividad antimicrobiana de estos aislados, debido a  
que se obtuvo una inhibición de la bacteria patógena, en este caso E. coli, del 100 % para  
  
L. plantarum y de 99,87 % para L. casei, correspondiente a una reducción logarítmica de  
  
4,3 y 2,88 respectivamente, superior a la encontrada en trabajos previos de esta tesis  
doctoral y en estudios de otros autores (Ołdak et al., 2017; Roldán et al., 2011; Teneva  
  
et al., 2016). En el caso de L. salivarius, ocurre algo similar, se encontró la máxima  
actividad antimicrobiana frente al patógeno indicador, en este caso P. multocida, 72 h  
  
después del inicio de la fermentación, cuando la bacteria se encuentra en fase  
estacionaria, justo después de la fase de crecimiento exponencial, por lo que parece que  
  
el crecimiento de esta bacteria es más lento, de acuerdo con algunos estudios en otras  
cepas de esta especie (Afdora et al., 2010; Sanhueza et al., 2015). En este caso también  
  
se incrementó la actividad antimicrobiana con respecto a los estudios previos del  
  
capítulo II, en los que los tiempos de fermentación fueron más cortos y menos  
controlados.  
  
  
Los tratamientos con enzimas proteolíticas ocasionaron una eliminación total de la  
  
actividad antimicrobiana extracelular, lo que concuerda con nuestra hipótesis de que las  
moléculas de naturaleza proteica contribuyen de forma significativa a la actividad  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 201

Página 202:  
LAB | Capítulo III  
  
antimicrobiana de estos aislados (Mirkovic et al., 2015; Saad et al., 2015). Además, si  
  
nos fijamos en los resultados de los fraccionamientos por pesos moleculares, podemos  
observar que las fracciones más pequeñas conservan buena parte de la actividad de los  
  
sobrenadantes. Estos filtrados podrían contener péptidos antimicrobianos o  
bacteriocinas con pesos moleculares menores a 10 kDa, lo que se corresponde con los  
  
resultados de la secuenciación de los genomas que se han descrito en los capítulos  
  
anteriores. El método de ultracentrifugación utilizado ha sido previamente descrito  
como uno de los métodos de elección para evaluar la actividad antimicrobiana de las  
  
bacteriocinas, así como para su separación del resto de componentes y su concentración  
(Parada et al., 2007). No obstante, deberá combinarse en un futuro con otras técnicas  
  
de concentración de proteínas, puesto que, en este estudio, la precipitación ácida con  
TCA ocasionó una desaparición total de la actividad antimicrobiana. Algunos de los  
  
métodos que se han descrito son la precipitación con sales neutras, la diálisis, la  
cromatografía o la liofilización (Dimitrieva-Moats y Ünlü, 2012; Parada et al., 2007; Xu  
  
et al., 2021), pero habría que estudiar en profundidad su rendimiento en péptidos de  
pequeño tamaño y su factibilidad tecnológica.  
  
  
En el estudio de termoestabilidad para los aislados EML1 y SA5, se observó que la  
actividad antimicrobiana fue disminuyendo progresivamente a medida que se fueron  
  
alcanzando temperaturas más altas, pero manteniendo una actividad reseñable hasta  
temperaturas de 90 ºC. Esto podría indicar que la actividad antimicrobiana se debe a  
  
una combinación de las bacteriocinas de clase II, que son termoestables a temperaturas  
incluso más altas que las de este estudio (Adesina y Enerijiofi, 2016; Wang et al., 2018)  
  
y de clase III, que son termolábiles (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Saad et al., 2015); puesto  
que observamos una disminución de la actividad, pero no una desaparición total de la  
  
misma. Además, las bacteriolisinas, unas bacteriocinas de la clase III, por sí mismas no  
  
parecen tener actividad antimicrobiana porque se encontrarían en las fracciones de  
mayor peso molecular, que carecen de actividad antimicrobiana, como se ha visto  
  
anteriormente; y las fracciones pequeñas en las que hipotéticamente estarían las  
bacteriocinas de clase II, conservan buena parte de la actividad, pero no alcanzan la  
  
actividad basal del sobrenadante completo. Los genes que codifican para ambas clases  
de bacteriocinas fueron descritos en los tres aislados en el capítulo I de esta tesis  
  
 202 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 203:  
 LAB | Capítulo III  
  
doctoral, por lo que estos resultados en su conjunto confirman que la fracción proteica  
  
extracelular, en concreto los pequeños péptidos conocidos de forma general como  
«bacteriocinas», contribuyen de forma significativa a la actividad antimicrobiana de las  
  
BAL aisladas y todo parece indicar que actúan de forma sinérgica para lograr la mayor  
actividad posible. De hecho, se ha demostrado que la utilización de bacteriocinas de  
  
diferentes clases, especialmente con mecanismos de acción distintos, incrementa tanto  
  
el espectro de actividad como su efecto antimicrobiano y además reduce la probabilidad  
de desarrollo de resistencias a las bacteriocinas (Soltani et al., 2021; Turgis et al., 2016).  
  
En el caso del aislado C12, la actividad antimicrobiana se mantiene estable en todo el  
rango de temperaturas probado y son las fracciones pequeñas las que conservan buena  
  
parte de la actividad (fracción de 3 a 10 KDa) y la totalidad de la actividad (fracción  
menor de 3 KDa). En este caso la actividad antimicrobiana podría deberse a las  
  
bacteriocinas de clase IId cuyos genes se encontraron en el genoma de este aislado y  
que coincide con los pesos moleculares descritos. En esta bacteria también se  
  
encontraron numerosas bacteriolisinas que podrían contribuir a la actividad  
antimicrobiana de forma sinérgica, como en el caso anterior, pero que por sí mismas no  
  
parecen tener actividad, puesto que las fracciones de mayor peso molecular no  
  
demostraron inhibición de la bacteria patógena.  
  
  
Pese a que está muy documentado que las bacteriocinas tienen un efecto  
antimicrobiano que en ocasiones puede tener un amplio espectro de acción, en la  
  
actualidad su uso está limitado a la industria alimentaria (Meade et al., 2020; Ng et al.,  
2020). Su utilización como fármacos no se contempla en la actualidad debido a que han  
  
demostrado tener baja biodisponibilidad, por lo que son necesarias nuevas  
herramientas terapéuticas para sacar provecho de esta actividad antimicrobiana natural  
  
(Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021; Meade et al., 2020; Soltani et al., 2021). Entre  
  
estas nuevas opciones terapéuticas destaca su posible utilización en sinergia con la  
terapia antibiótica, para reducir las dosificaciones de estos contribuyendo así a prevenir  
  
el desarrollo de resistencias antibióticas y los efectos secundarios indeseables o  
secundarios (Gradisteanu-Pircalabioru et al., 2021; Ng et al., 2020). Las bacteriocinas  
  
tienen menor espectro de acción que los antibióticos, lo que hace que sean más  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 203

Página 204:  
LAB | Capítulo III  
  
selectivas para un patógeno en concreto y más respetuosas con la microbiota (Meade  
  
et al., 2020).  
  
  
En los últimos años está aumentando el número de estudios encaminados a explorar  
esta nueva opción terapéutica que combina bacteriocinas de diversas clases y  
  
antibióticos para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos  
  
resistentes a los antibióticos (Hanchi et al., 2017; Jabés et al., 2011; Soltani et al., 2021;  
Turgis et al., 2016). En esta tesis doctoral, se realizó un estudio de sinergia  
  
antimicrobiana in vitro con una cepa de E. coli multirresistente a los antibióticos que  
presenta una CMI de >256 µg/mL para todos los antimicrobianos seleccionados. Tras la  
  
adición del sobrenadante que contiene los metabolitos antimicrobianos de la cepa L.  
salivarius C12, obtenidos bajo sus condiciones óptimas a una concentración del 10 %, la  
  
CMI disminuyó para todos los antibióticos. No obstante, solo en el caso de la amoxicilina  
se considera que el antibiótico podría llegar a tener utilidad clínica tras la adición de los  
  
metabolitos antimicrobianos producidos por esta cepa, puesto que el Comité Europeo  
de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana considera como punto de corte clínico el  
  
valor de CMI inferior a 8 µg/mL para este antibiótico (EUCAST, 2021) y el valor obtenido  
  
tras la adición de los metabolitos fue de 0,125 µg/mL. Para todos los demás, pese a que  
se reduce significativamente el valor de CMI, el punto de corte continúa estando por  
  
debajo de los criterios clínicos, por lo que deberán estudiarse nuevas combinaciones.  
Una posible estrategia podría ser aumentar la concentración del sobrenadante de esta  
  
misma bacteria y/o utilizar otro método de determinación de la sinergia que permita  
ensayar varias dosificaciones a la vez. La realización del procedimiento de determinación  
  
de sinergia entre bacteriocinas y antibióticos mediante Etest® se considera un método  
válido para este propósito y se utiliza en la actualidad debido, fundamentalmente, a la  
  
rapidez de la técnica y a la facilidad en la lectura de los resultados (Mathur et al., 2017;  
  
Orhan et al., 2005). No obstante, existen otros métodos que permiten determinar las  
cantidades exactas de antibiótico y metabolitos antimicrobianos y además determinan  
  
el tipo de sinergia, como la técnica del tablero de ajedrez (LeBel et al., 2013; Mathur et  
al., 2017). Aunque este método es más costoso y laborioso, se tendrá en cuenta para  
  
futuros estudios cuyos objetivos se centren en determinar las dosis mínimas de cada  
agente antimicrobiano para inhibir el desarrollo de un patógeno en concreto. De forma  
  
 204 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 205:  
 LAB | Capítulo III  
  
similar, en el estudio de evaluación de sinergia frente a P. multocida, los sobrenadantes  
  
de las tres cepas disminuyeron la CMI para la doxiciclina, de 4 a 1 µg/mL, siendo este su  
punto de corte clínico.  
  
  
Dada la novedad y la relevancia científica de estos resultados, se pone de manifiesto la  
  
necesidad de validación de estos estudios in vitro con un modelo experimental que  
  
valide los procedimientos descritos. Los estudios in vivo representan una etapa más  
avanzada de la investigación, que será descrita en el bloque III de esta tesis doctoral.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 205

Página 206:  
LAB | Capítulo III  
  
  
  
  
  
 206 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 207:  
 EXP | Capítulo IV  
  
BLOQUE II: EXPERIMENTACIÓN ANIMAL IN VIVO  
  
  
  
  
  
 207

Página 208:  
LAB | Capítulo III  
  
  
  
  
  
 208 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 209:  
 EXP | Índice  
  
  
ÍNDICE BLOQUE II  
  
  
  
  
  
CAPÍTULO IV: Efecto sinérgico de los metabolitos microbianos sobre la terapia antibiótica en una  
neumonía experimental en modelo ratón 211  
  
 INTRODUCCIÓN 212  
  
 MÉTODO 218  
  
 FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO 225  
  
 RESULTADOS 226  
  
 DISCUSIÓN 230  
  
CAPÍTULO V: Administración de posbióticos para la mejora de los indicadores sanitarios y los  
parámetros productivos en ganadería 235  
  
 INTRODUCCIÓN 237  
  
 MÉTODO 243  
  
 FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO 252  
  
 RESULTADOS 254  
  
 DISCUSIÓN 263  
  
CAPÍTULO VI: Administración de posbióticos para el control de tuberculosis en fauna silvestre 271  
  
 INTRODUCCIÓN 273  
  
 MÉTODO 280  
  
 FIGURA RESUMEN DEL MÉTODO 285  
  
 RESULTADOS 286  
  
 DISCUSIÓN 291  
  
  
  
  
  
 209

Página 210:  
LAB | Capítulo III  
  
  
  
  
  
 210 MARÍA BRAVO SANTILLANA

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

Página 212:  
EXP | Capítulo IV  
  
  
  
  
  
 212 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 213:  
 EXP | Capítulo IV  
  
INTRODUCCIÓN  
  
  
  
Investigación en modelos animales  
  
Un «modelo animal» es una especie distinta de la humana que se utiliza en investigación  
  
para obtener información acerca de procesos biológicos que ocurren de forma similar  
en otra especie, fundamentalmente en la especie humana, en la que ciertos  
  
experimentos son impracticables, generalmente por normas éticas. Los estudios in vivo  
permiten extrapolar aspectos de numerosos procesos fisiológicos y patológicos que son  
  
imposibles de ensayar en experimentos in vitro.  
  
Los modelos animales constituyen, en muchas ocasiones, una etapa más del método  
científico ampliamente utilizada en el ámbito de la investigación biomédica, ya que  
  
contribuye al conocimiento de muchos procesos fisiológicos. Dentro de los modelos  
animales, diversos mamíferos se utilizan de forma habitual en todo tipo de ensayos  
  
debido a su similitud estructural, funcional y genética con el ser humano y otros  
  
organismos superiores. Uno de los mamíferos más utilizados y, por ello, cuyos  
procedimientos están más estandarizados, es el modelo ratón (Mus musculus), debido,  
  
principalmente, a que existe un extenso conocimiento sobre sus características  
fisiológicas y genómicas y a que estos animales se mantienen estables genéticamente  
  
frente a numerosos estímulos físicos, químicos y biológicos. Además, los ratones  
alcanzan la madurez sexual en poco tiempo, por lo que se pueden obtener varias  
  
generaciones de animales en periodos cortos; y su pequeño tamaño facilita su manejo  
para los diferentes procedimientos y su mantenimiento en condiciones de bienestar  
  
animal de forma económica (Viera y Márquez, 2020).  
  
  
Pese a que lo ideal es poder sustituir estos procedimientos científicos por otros métodos  
  
alternativos que no requieran de la utilización de animales vivos, la experimentación  
animal es aún muy necesaria para contribuir a la protección de la salud humana, animal  
  
y el medio ambiente. Desde la práctica científica, los modelos animales deben garantizar  
  
  
  
 213

Página 214:  
EXP | Capítulo IV  
  
el cumplimiento de una serie de normas éticas y bioéticas que están amparadas por una  
  
normativa estricta.  
  
  
  
Legislación en experimentación animal  
  
Desde el año 1986, la Unión Europea (UE) cuenta con una normativa específica que  
abarca el uso de animales de experimentación animal. En el año 2010 la UE adoptó la  
  
Directiva 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos  
  
para reforzar la legislación anterior y mejorar el bienestar de los animales que se utilizan.  
Esta normativa viene aplicada en España con la legislación más actual, publicada  
  
recientemente a través del Real Decreto 118/2021 de 23 de febrero por el que se  
modifica el Real Decreto 53/2013, que se establece las normas básicas aplicables para  
  
la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos,  
incluyendo la docencia (BOE-A-2013-1337).  
  
Las normativas se fundamentan especialmente en el principio de las tres erres  
  
(Reemplazo, Reducción y Refinamiento). En primer lugar, el principio de «reemplazo»  
establece la utilización de estrategias avaladas científicamente que no conlleve la  
  
utilización de animales vivos. El principio de «reducción» consiste en velar por que el  
número de animales utilizados en los proyectos en los que no exista una alternativa al  
  
ensayo con modelos animales sea el mínimo posible sin comprometer los objetivos de  
la investigación. Por último, la normativa también establece un principio de  
  
«refinamiento» de la cría, el alojamiento y los cuidados, así como de los métodos  
  
utilizados en procedimientos, que elimine o reduzca al mínimo cualquier posible dolor,  
sufrimiento, angustia o daño duradero a los animales.  
  
No obstante, la legislación establece como objetivo final el reemplazo total de los  
  
procedimientos con animales vivos para fines científicos, tan pronto como sea  
científicamente posible hacerlo, con lo que fomenta la búsqueda de alternativas.  
  
  
  
  
  
 214 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 215:  
 EXP | Capítulo IV  
  
Modelos experimentales en patología infecciosa respiratoria  
  
Los modelos animales que reproducen las enfermedades infecciosas constituyen, desde  
hace más de un siglo, uno de los pilares fundamentales en el conocimiento de la  
  
patogenia de la enfermedad y en el desarrollo de medidas de control (Miró y Gatell,  
2000). Los modelos de neumonías bacterianas provocadas por diferentes agentes  
  
causales se han utilizado de forma frecuente para los estudios preclínicos del desarrollo  
  
de nuevos antimicrobianos y su actividad antimicrobiana in vivo (Pachón et al., 2000).  
En estos modelos se han utilizado varios tipos de animales destinados a fines científicos,  
  
entre los que se incluyen los ratones que pueden ser inoculados por diversas vías, como  
la instilación intratraqueal o intrabronquial, mediante aerosoles o por vía  
  
intraperitoneal (Ferran et al., 2011; Praveena et al., 2010; Vasseur et al., 2017).  
  
  
El modelo de neumonía experimental está catalogado como un «modelo  
discriminativo», diseñado para similar la producción de la infección de la manera más  
  
similar posible a lo que ocurre de forma natural. Por ello, reúne los criterios ideales de  
este tipo de modelos de infección, esto es, una técnica de infección simple;  
  
microorganismos causantes, ruta de entrada, diseminación en el organismo y afectación  
  
tisular muy semejantes a la infección natural; gravedad, curso y duración de la  
enfermedad predecibles, reproducibles y analizables; y, por último, capacidad de medir  
  
y reproducir la eficacia del tratamiento antimicrobiano (Pachón et al., 2000).  
  
  
Históricamente, primeros modelos de infección respiratoria bacteriana eran los  
modelos de neumonías neumocócicas, producida por Streptococcus pneumoniae, casi  
  
exclusivos a principios del siglo XX. Posteriormente, se introdujeron otros patógenos  
ante el aumento de la casuística en humanos de infecciones por Staphylococcus aureus  
  
y bacilos Gram- como Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Legionella  
  
pneumophila y Haemophilus influenzae (Pachón et al., 2000). La infección experimental  
por Pasteurella multocida no es de las más frecuentes en este tipo de modelos,  
  
fundamentalmente debido a que no reviste mucha importancia clínica en patología  
respiratoria humana (Kristinsson y Adam, 2007). No obstante, además de ser una  
  
infección zoonósica, es una enfermedad muy relevante en medicina veterinaria debido  
  
 215

Página 216:  
EXP | Capítulo IV  
  
a que ocasiona importantes pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas  
  
(Kristinsson y Adam, 2007; Radostits et al., 2007), como se explicará con más detalle en  
el capítulo V. Por todo esto, son necesarios más estudios en modelos animales, tanto  
  
para conocer la fisiopatología de la infección por P. multocida, como para aportar  
diferentes estrategias terapéuticas para el control de la enfermedad en las poblaciones  
  
susceptibles.  
  
  
  
Estudios de eficacia y seguridad de los metabolitos producidos por BAL  
  
Entre las nuevas opciones terapéuticas que están cobrando cada vez mayor relevancia  
  
en la actualidad, los probióticos y sus derivados se posicionan como una de las  
alternativas a los antibióticos más utilizadas en ganadería (Bajagai et al., 2016; Ng et al.,  
  
2020). Los metabolitos producidos por bacterias probióticas, como las BAL, han  
demostrado ser útiles para el control de los patógenos alterantes y causantes de  
  
toxiinfecciones alimentarias, sin embargo, su utilización como agente terapéutico en  
medicina veterinaria está actualmente limitada, debido, fundamentalmente, al  
  
desconocimiento sobre la farmacocinética de los metabolitos (Ng et al., 2020). De  
hecho, diversos estudios apuntan a que las bacteriocinas, los componentes producidos  
  
por estas bacterias con mayor potencial terapéutico, han demostrado tener baja  
  
biodisponibilidad por sí mismas (Ng et al., 2020; Soltani et al., 2021), por lo que una  
alternativa interesante sería utilizar todos los componentes producidos por las bacterias  
  
sin alterar la composición secretada al medio de forma natural.  
  
  
Una de las principales opciones terapéuticas que se están explorando en la actualidad,  
es la utilización de estos metabolitos en sinergia con antibióticos, como ya se comentó  
  
en el CAPÍTULO III. No obstante, la mayoría de los estudios disponibles en la actualidad  
se corresponden con ensayos in vitro y las actividades antimicrobianas encontradas en  
  
el laboratorio no siempre se corresponde con su resultado real in vivo, por lo que son  
  
necesarios más estudios en modelos animales para dilucidar su utilidad clínica real  
(Cebrián et al., 2019; Singh et al., 2014). La terapia combinatoria entre estos agentes  
  
con sinergia funcional puede contribuir al tratamiento de las enfermedades infecciosas  
  
  
 216 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 217:  
 EXP | Capítulo IV  
  
potenciando el efecto antimicrobiano de los fármacos y también puede prevenir el  
  
desarrollo de resistencias antimicrobianas y otros efectos adversos si se consigue el  
mismo efecto terapéutico con menos dosis de antibiótico (Gradisteanu-Pircalabioru et  
  
al., 2021; Mathur et al., 2017; Ng et al., 2020).  
  
  
Por último, es importante destacar que las BAL poseen la presunción cualificada de  
  
seguridad (QPS), otorgada por la EFSA, mediante la cual no es necesario someter a  
ningún microorganismo de este grupo a una evaluación de seguridad completa (EFSA  
  
Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2021), pero no está claro si ocurre lo mismo con  
los componentes producidos por las mismas. Algunos autores apuntan que las  
  
bacteriocinas y el resto de metabolitos antimicrobianos son seguros y carecen de  
toxicidad para las células de los mamíferos, pero es importante realizar estudios de  
  
seguridad si se pretenden incluir en la terapia antimicrobiana en un futuro (Soltani et  
al., 2021).  
  
  
Por ello, los objetivos de este capítulo son:  
  
  
 - Comprobar la seguridad de un suplemento elaborado a partir de los metabolitos  
 producidos por las BAL administrados por vía oral en modelo ratón.  
  
  
 - Estudiar el efecto de la administración vía oral del suplemento en combinación  
  
 con la terapia antibiótica para el control de la infección experimental producida  
 por Pasteurella multocida en modelo ratón.  
  
  
  
  
  
 217

Página 218:  
EXP | Capítulo IV  
  
MÉTODO  
  
  
A raíz de los resultados obtenidos en los anteriores capítulos de esta tesis doctoral, se  
seleccionó la bacteria L. salivarius C12 para la elaboración de un suplemento, a partir de  
  
los metabolitos secretados por la misma, para su administración por vía oral para el  
control de la enfermedad infecciosa provocada por P. multocida en combinación con la  
  
terapia antibiótica.  
  
  
  
Consideraciones bioéticas  
  
La elección del modelo animal, en este caso modelo ratón (Mus musculus) cepa ICR  
albina, se ha realizado debido a que este se considera el procedimiento óptimo para la  
  
realización de una infección experimental in vivo, no habiendo posibilidad de sustituirlo  
  
por otros métodos alternativos. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en el  
Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura (ES 10037000183) previa  
  
autorización por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la misma universidad  
(240/2019), cumpliendo el principio de las tres erres, en la medida de lo posible:  
  
  
- Reemplazo: no es posible debido a las características de la infección  
  
experimental.  
- Reducción: aceptando una potencia estadística del 80 %, fijando el nivel de  
significación en a=0,05 y anticipando un tamaño del efecto elevado, puesto que las  
  
proporciones esperadas para mortalidad entre grupos tratados y grupo control son de  
  
50 % y 0 %, el número adecuado de individuos por grupo para reducir al máximo su  
utilización es de 6 animales.  
  
- Refinamiento: el centro en el que se realizó el estudio sigue la normativa vigente  
en cuanto a mantenimiento de los animales en condiciones óptimas que respeten el  
  
bienestar animal y se evitó el sufrimiento de estos mediante sacrificio final.  
  
  
  
  
  
 218 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 219:  
 EXP | Capítulo IV  
  
 Los procedimientos en los que los animales pudieron experimentar dolor, sufrimiento o  
  
 estrés, y su grado de severidad de acuerdo con los criterios de clasificación establecidos  
 en el Anexo IX del RD 53/2013 son:  
  
  
 - Administración de suplementos y/o antibióticos por vía oral: severidad leve,  
  
 podría provocar alteración del estado de bienestar por estrés animal, pero de corta  
  
 duración.  
 - Infección experimental con P. multocida por vía intraperitoneal: de «moderada»  
  
 a «severa», en función de la progresión de la enfermedad.  
 - Sacrificio final para estudio anatomopatológico: sin recuperación.  
  
  
 No se contempló la posibilidad de administración de agentes analgésicos o anestésicos  
  
 porque podrían influir en el desarrollo del estudio. Se procedió al sacrificio final de todos  
 los animales para la realización de una evaluación anatomopatológica al finalizar el  
  
 estudio y se practicó la eutanasia cuando se detectaron altos niveles de dolor y  
 sufrimiento de los animales. El método eutanásico de elección fue la dislocación cervical,  
  
 puesto que es un método rápido que no deja residuos en el animal, no interfiriendo, por  
  
 tanto, en su posterior evaluación patológica.  
  
  
1. Elaboración del suplemento y selección del antibiótico  
  
  
 El suplemento administrado consiste en el sobrenadante de un cultivo de la bacteria L.  
 salivarius C12 añadido al agua de bebida para su administración por vía oral, de modo  
  
 que se reduzca la manipulación de los animales y, con ello, el estrés, puesto que puede  
 afectar al bienestar animal y al desarrollo de los ensayos. La bacteria se cultivó en las  
  
 condiciones óptimas para la producción de sus metabolitos, que han sido descritas en  
  
 el capítulo III, y los sobrenadantes se obtuvieron mediante los procedimientos también  
 detallados previamente.  
  
  
 Por otro lado, el agente terapéutico de elección fue la doxicilina, un antibiótico del grupo  
  
 de las tetraciclinas que se utiliza para el tratamiento de infecciones que afectan al  
  
  
 219

Página 220:  
 EXP | Capítulo IV  
  
 aparato respiratorio y además arrojó buenos resultados en sinergia con el sobrenadante  
  
 de la BAL C12. Asimismo, es importante destacar que es un antibiótico que se utiliza de  
 forma habitual por vía oral en ensayos con ratones por su facilidad de administración en  
  
 el agua de bebida.  
  
  
2. Preparación del inóculo del patógeno  
  
  
 Se seleccionó la bacteria patógena P. multocida tipo A aislada de un brote de alta  
  
 mortalidad en un cebadero de corderos y se cultivó en el medio Agar Sangre durante 48  
 h a 37 ºC. Posteriormente, se inoculó en caldo Mueller Hinton durante 48 h a 37 ºC. y se  
  
 centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en SSF estéril  
 ajustado a dos valores de absorbancia a 450 nm: 0,19 y 0,35 correspondiente a dos dosis  
 de inóculo (104 y 107 ufc/mL, respectivamente).  
  
  
3. Fase previa: puesta a punto de las técnicas y seguridad de los suplementos  
  
  
 Esta fase tiene dos objetivos principalmente: por un lado, poner a punto las técnicas y  
  
 establecer las dosis de infección adecuadas para la realización del ensayo clínico y, por  
 otro lado, garantizar la seguridad para los animales de los metabolitos bioactivos  
  
 contenidos en los suplementos. Además, también nos permitió calcular el tamaño  
 muestral.  
  
  
  
 Elaboración de los grupos  
  
 Se realizaron 4 grupos de 6 ratones cada uno, separados en jaulas de 3 animales que  
  
 fueron instaladas en una sala SPF (Specific Pathogen Free, libre de patógenos  
 específicos) una semana antes de comenzar los procedimientos para garantizar una  
  
 correcta adaptación de los animales a su nuevo hábitat. La elaboración de los grupos se  
  
 realizó como se muestra en la Tabla 4.1:  
  
  
  
  
  
 220 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 221:  
 EXP | Capítulo IV  
  
  
  
 Tabla 4.1. Elaboración de los grupos de la fase previa del estudio experimental  
 Grupo Tratamiento o infección  
  
 Control No recibió ningún tipo de tratamiento ni infección.  
  
 Suplemento Se administró el suplemento con los metabolitos secretados por  
  
 la bacteria L. salivarius C12 en una proporción 1:1 semanalmente  
  
 (50 mL de sobrenadante en 50 mL de agua de bebida en el  
 biberón) durante 21 días.  
  
  
 Infección DL50 Se inyectó una dosis única vía intraperitoneal a cada ratón de 0,2  
 mL del inóculo a 104 ufc/mL.  
  
  
 Infección DL100 Se inyectó una dosis única vía intraperitoneal a cada ratón de 0,2  
 mL del inóculo a 107 ufc/mL.  
  
  
 Se monitorizó el consumo del agua de bebida con y sin suplemento para garantizar que  
 los animales consumían el producto sin problemas y para calcular la dosis que ingirieron  
  
 los animales. Se observó diariamente a los ratones para evaluar la progresión de la  
 enfermedad mediante la valoración del estado de ánimo (inactividad, anorexia,  
  
 depresión), la sintomatología propia de la enfermedad (signos respiratorios como  
  
 disnea, ruidos respiratorios, presencia de exudados) y otros signos particulares de  
 enfermedad en los ratones, como los pelos erizados (Praveena et al., 2010). Además,  
  
 se registró la mortalidad y se monitorizó la aparición de otros signos y síntomas y se  
 realizó necropsia para estudio anatomopatológico y el diagnóstico de P. multocida de  
  
 los animales que causaron baja mediante los procedimientos que serán detallados más  
 adelante en este apartado.  
  
  
  
4. Estudio de la eficacia de los compuestos bioactivos sobre el desarrollo de la infección  
  
 Como resultado de la fase previa, se estableció como dosis letal 50 (DL50), es decir, la  
 dosis del patógeno que provoca la muerte de la mitad de los animales, el inóculo de 104  
  
 221

Página 222:  
 EXP | Capítulo IV  
  
 ufc/mL. Para esta fase se estableció un nuevo grupo control y dos grupos tratamiento  
  
 diferentes, a uno se le administró antibiótico y a otro el suplemento (Tabla 4.2).  
  
  
  
  
 Tabla 4.2. Elaboración de los grupos de la primera fase del estudio experimental  
 Grupo Tratamiento o infección  
  
 Control Se realizó la inyección intraperitoneal de SSF estéril y se rellenó  
  
 el biberón con 100 mL de agua.  
  
 Antibiótico Se inyectó vía intraperitoneal a cada ratón la DL50 y se administró  
 el antibiótico doxicilina a una dosis de 10 mg/Kg/día durante 5  
 días en el agua de bebida (300 µL de doxiciclina al 10 % en 100  
  
 mL de agua en el biberón).  
  
 Suplemento Se administró el suplemento con los metabolitos bioactivos de la  
 bacteria L. salivarius C12 en una proporción 1:1 semanalmente  
  
 (50 mL de sobrenadante en 50 mL de agua de bebida en el  
 biberón) durante 14 días antes de la inyección intraperitoneal  
  
 con el inóculo del patógeno a la DL50. Posteriormente a la  
 infección, se prolongó la administración del suplemento durante  
  
 5 días más.  
  
  
  
  
  
5. Estudio de la eficacia de los compuestos bioactivos en sinergia con antibióticos sobre  
  
 el desarrollo de la infección  
  
  
 Dado que la DL50 no fue suficiente para valorar el efecto, se realizó un nuevo ensayo  
 con la dosis letal absoluta (DL100), es decir, el inóculo de 107 ufc/mL. En esta ocasión,  
 se estableció un nuevo grupo control, dos grupos tratamientos como en la fase anterior  
  
 y un nuevo grupo tratamiento con una combinación del antibiótico y el suplemento  
 (Tabla 4.3).  
  
  
  
  
 222 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 223:  
 EXP | Capítulo IV  
  
  
  
  
  
 Tabla 4.3. Elaboración de los grupos de la segunda fase del estudio experimental  
 Grupo Tratamiento o infección  
  
 Control Se realizó la inyección intraperitoneal de SSF estéril y se rellenó  
  
 el biberón con 100 mL de agua de bebida.  
  
 Antibiótico Se inyectó vía intraperitoneal a cada ratón la DL100 y se  
 administró el antibiótico doxicilina a una dosis de 10 mg/Kg/día  
 durante 5 días en el agua de bebida (300 µL de doxiciclina al 10  
  
 % en 100 mL de agua en el biberón).  
  
 Suplemento Se administró el suplemento en una proporción 1:1  
 semanalmente (50 mL de sobrenadante en 50 mL de agua en el  
  
 biberón) durante 14 días antes de la inyección intraperitoneal  
 con el inóculo del patógeno a la DL100. Posteriormente a la  
  
 infección, se prolongó la administración del suplemento durante  
 5 días más.  
  
 Suplemento + Se administró el suplemento a la misma dosis que el grupo  
  
 antibiótico suplemento durante 14 días antes de la infección con la DL100 y  
 se administró el antibiótico a la misma dosis que el grupo  
  
 antibiótico. Posteriormente a la infección, se prolongó la  
 administración del suplemento durante 5 días más.  
  
  
  
  
6. Finalización del estudio y diagnóstico de la infección  
  
  
 Se realizó necropsia a los animales que causaron baja en las siguientes 24 h tras la  
  
 muerte y al final de cada fase se eutanasió a los supervivientes mediante dislocación  
 cervical para la realización de las necropsias y estudios anatomopatológicos de todos los  
  
 ratones participantes en el estudio. El objetivo de esta fase es comparar las lesiones,  
 principalmente en los pulmones y realizar el diagnóstico de P. multocida para establecer  
  
 la causa de la muerte. Se tomaron muestras de los pulmones e hígado para confirmar el  
  
  
 223

Página 224:  
 EXP | Capítulo IV  
  
 diagnóstico de P. multocida mediante cultivo en Agar Sangre y MacConkey, pruebas de  
  
 identificación básicas y confirmación mediante PCR según el protocolo previamente  
 descrito (Townsend et al., 2001).  
  
  
7. Estudio estadístico  
  
  
 El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism versión 8.00 para Windows  
 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Se realizaron curvas  
  
 de supervivencia de Kaplan-Meier y se analizaron las diferencias mediante la prueba del  
 logaritmo del rango (Logrank test), estableciendo 5 % de nivel de significación. El resto  
  
 de los parámetros del estudio se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis (Chi-  
 cuadrado) para las variables cualitativas y la prueba exacta de Fisher para variables  
  
 cuantitativas.  
  
  
  
  
  
 224 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 225:  
 EXP | Capítulo IV  
  
Figura resumen del método  
  
  
  
  
  
 225

Página 226:  
EXP | Capítulo IV  
  
RESULTADOS  
  
  
  
Los metabolitos contenidos en el sobrenadante de L. salivarius son seguros para su  
administración por vía oral  
  
Los resultados completos del estudio se encuentran en el Apéndice II. Durante la fase  
previa al desarrollo del ensayo se confirmó que los animales se adaptaron bien a las  
  
jaulas en pocos días y no se registraron síntomas compatibles con enfermedad ni  
alteraciones en el comportamiento típico de la especie en el grupo control ni en el grupo  
  
suplementado, por lo que podemos afirmar que los metabolitos contenidos en el  
suplemento son seguros para su administración por vía oral y respetuosos con el  
  
bienestar animal. En todos los animales infectados se detectó el patógeno Pasteurella  
  
multocida mediante cultivo y confirmación por PCR y, como es lógico, se detectaron  
diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad y morbilidad (síntomas y  
  
lesiones) entre los animales que no fueron infectados, incluidos los que recibieron el  
suplemento, y los animales infectados. Esto confirma la infección y descarta que se  
  
produzcan alteraciones debido a la administración del suplemento (morbilidad,  
exudados, lesiones macroscópicas en pulmón, hemorragias en cavidad torácica y  
  
número de bajas P<0,0001, y adherencias en cavidad torácica P<0,05). Algunos detalles  
de signos y síntomas se encuentran en la figura 4.2. En cuanto a las curvas de  
  
supervivencia de Kaplan-Meier que se muestran en la figura 4.1A, se observaron  
diferencias estadísticamente significativas mediante el test del logaritmo del rango  
  
(P<0,0001).  
  
  
  
La DL50 no es adecuada para valorar una posible sinergia del antibiótico y los  
metabolitos del sobrenadante  
  
En cuanto a los grupos infectados, se estableció como DL50 el inóculo del patógeno a  
104 ufc/mL, puesto que se produjo una mortalidad del 50 % en este grupo, y como DL100  
el inóculo a 107 ufc/mL, con una mortalidad del 100 %. Las bajas para la DL50 se  
observaron en los dos primeros días posinfección (dpi) con animales con síntomas leves  
  
 226 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 227:  
 EXP | Capítulo IV  
  
inespecíficos como pelos erizados e inactividad. Las bajas para la DL100 se sucedieron  
  
por goteo durante los cuatro dpi con síntomas más graves como signos respiratorios,  
inactividad total y, en algunos casos, coma previo a la muerte. En la fase 1 se infectó a  
  
los animales con la DL50 y se propusieron dos tratamientos: un grupo recibió el  
suplemento y otro grupo recibió terapia antibiótica. Aproximadamente la mitad de los  
  
animales mostró síntomas leves, igual que en la fase previa, y en todos los animales  
  
infectados se aisló P. multocida, que fue confirmado mediante PCR. No se observaron  
diferencias en la mortalidad en el grupo control con respecto al grupo suplementado, ni  
  
en las curvas de supervivencia (Figura 4.1B, P=0,78), sin embargo, todos los animales del  
grupo antibiótico se recuperaron favorablemente y no se registró ninguna baja en este  
  
grupo. Debido a esto, este ensayo no se considera adecuado para evaluar la sinergia del  
antibiótico y el suplemento, por lo que se repitió el ensayo con la DL100 y se incluyó un  
  
grupo con ambos tratamientos.  
  
  
  
Los metabolitos antimicrobianos producidos por L. salivarius C12 disminuyen la  
  
mortalidad provocada por la infección con P. multocida en combinación con la terapia  
antibiótica  
  
En la fase 2 se infectó a los ratones con la DL100 y se obtuvo una mortalidad del 100 %  
  
en el grupo control en el grupo que recibió el suplemento y en el grupo que recibió el  
antibiótico. A diferencia de la fase anterior, el antibiótico no fue suficiente para  
  
recuperar a los animales, cuya muerte se produjo tras la aparición de síntomas graves  
como depresión, signos respiratorios y coma previo a la muerte. Por el contrario, en el  
  
grupo que recibió el antibiótico y el suplemento, se encontró una supervivencia del  
33,33 % de los animales, además, estos animales supervivientes mostraron síntomas de  
  
menor gravedad y consiguieron recuperarse en pocos días. Las diferencias encontradas  
en las curvas de supervivencia fueron estadísticamente significativas (Figura 4.1C,  
  
P=0,0255). Se confirmó la infección de P. multocida en todos los animales que fueron  
  
inoculados, pero no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el  
estudio anatomopatológico ni en los síntomas mostrados por los animales (P>0,05).  
  
  
  
 227

Página 228:  
EXP | Capítulo IV  
  
  
  
  
  
Figura 4.1. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en los diferentes grupos del estudio. (A) En la fase previa se  
detectaron diferencias estadísticamente significativas (test del logaritmo del rango, P<0,0001) en la supervivencia de los  
animales infectados (triángulos) con respecto a los animales que no fueron infectados (círculos y cuadrados, superpuestos),  
incluidos los que recibieron el suplemento. (B) En la fase 1 se infectó a los animales con la DL50 y, tanto en el grupo control  
sin tratamiento (círculos) como en el grupo suplemento (triángulos) no se observaron diferencias en la supervivencia de los  
animales, que fue del 50 %. El grupo antibiótico (cuadrados) tuvo una supervivencia del 100 pero estas diferencias no fueron  
estadísticamente significativas (test del logaritmo del rango, P<0,78). (C) En la fase 2 se infectó a los animales con la DL100,  
que provocó una mortalidad del 100 % en el grupo control (círculos), antibiótico (cuadrados) y suplemento (triángulos). Sin  
embargo, se registró una supervivencia del 33,33 % en el grupo que fue tratado con antibióticos en combinación con el  
suplemento (test del logaritmo del rango, p<0,05).  
  
 228 MARÍA BRAVO SANTILLANA

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

Página 230:  
EXP | Capítulo IV  
  
DISCUSIÓN  
  
  
La investigación en modelos animales de infección experimental continúa siendo  
necesaria para aumentar el conocimiento sobre las enfermedades y sus medidas de  
  
control, además de ser fundamental para el desarrollo de nuevas herramientas  
terapéuticas. En este capítulo se seleccionó para la infección experimental la bacteria  
  
patógena P. multocida tipo A, por la importancia que tienen los procesos provocados  
  
por esta bacteria en Sanidad Animal, puesto que tienen un gran impacto negativo sobre  
las explotaciones ganaderas (Radostits et al., 2007). Además, este serotipo en concreto,  
  
ha sido previamente estudiado en modelo ratón y sus resultados son extrapolables a  
otras especies (Ferran et al., 2011; Praveena et al., 2010; Vasseur et al., 2017).  
  
  
Por otro lado, para la planificación y el diseño de un modelo experimental que replique  
  
una enfermedad infecciosa, es necesario realizar una intensa batería de estudios in vitro  
como paso previo al desarrollo del modelo (Miró y Gatell, 2000). En este sentido, a raíz  
  
de los resultados descritos en los capítulos anteriores de esta tesis doctoral, se  
seleccionó el aislado de BAL L. salivarius C12 debido a que produce metabolitos  
  
antimicrobianos que actúan en sinergia con el antibiótico doxiciclina, potenciando el  
  
efecto inhibitorio frente al patógeno mencionado. En el estudio previo de evaluación de  
sinergia antimicrobiana, el sobrenadante de esta BAL disminuyó la CMI para la  
  
doxiciclina, de 4 a 1 µg/mL, siendo este su punto de corte clínico. Además, este  
antibiótico se considera de elección para su administración por vía oral para el  
  
tratamiento de procesos infecciosos que cursen con neumonía en ratones, incluidos los  
animales criados en condiciones de laboratorio para este tipo de estudios (Harkness et  
  
al., 2013; Morris, 1995).  
  
  
En la primera fase del ensayo experimental se demostró que el suplemento elaborado  
  
a partir de los metabolitos del aislado C12 son seguros para su administración por vía  
oral, puesto que no se observaron alteraciones en el comportamiento ni presencia de  
  
signos clínicos de enfermedad en los animales del estudio. Aunque está aceptado por la  
comunidad científica que las bacteriocinas y el resto de metabolitos antimicrobianos  
  
 230 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 231:  
 EXP | Capítulo IV  
  
producidos por las BAL son seguros y carecen de toxicidad para las células de los  
  
mamíferos, debido al estatus QPS de los microorganismos que las producen, es  
  
importante realizar estudios de seguridad si se pretenden incluir en la terapia  
antimicrobiana en un futuro (Soltani et al., 2021). Por lo general, no son necesarios  
  
estudios adicionales para asegurar su inocuidad, pero en ocasiones podría ser  
interesante llevar a cabo estudios de toxicidad en modelos celulares y/o animales para  
  
descartar una acción potencialmente perjudicial sobre las células animales o la  
acumulación de productos tóxicos, sobre todo cuando se trata de componentes del  
  
sobrenadante no caracterizados y el objetivo sea el desarrollo de biofármacos (Cebrián  
et al., 2019; Singh et al., 2014; Soltani et al., 2021).  
  
  
Debido a la importancia de las infecciones producidas por especies de la familia  
  
Pasteurellacea en medicina veterinaria, especialmente en producción animal (Radostits  
  
et al., 2007), se diseñó un modelo de infección experimental con un aislado de P.  
multocida obtenido a partir de un brote en un cebadero de corderos. Se infectó a los  
  
ratones con P. multocida tipo A de forma experimental y para el tratamiento de los  
animales se propuso una terapia combinatoria entre el antibiótico doxiciclina y un  
  
suplemento elaborado a partir de los metabolitos antimicrobianos de la cepa L.  
salivarius C12. El objetivo de la terapia antibiótica es eliminar el patógeno de un  
  
organismo mediante la administración de una cantidad óptima del agente  
antimicrobiano que sea capaz de inhibir al agente infeccioso en el lugar de la infección  
  
(Bravo, 2019). Las interacciones de tipo funcional entre diferentes compuestos con  
  
actividad antimicrobiana se producen cuando se origina un aumento cuantitativo de la  
acción farmacológica por la acción simultánea de dos agentes, y se denominan de  
  
«potenciación» o sinergias propiamente dichas cuando el efecto combinado de ambos  
es mayor al efecto de estos utilizados de forma individual (Blumenthal y Garrison, 2011),  
  
como lo que ocurre en este ensayo clínico.  
  
  
La DL50 del patógeno utilizada durante el ensayo no se consideró adecuada para valorar  
una posible sinergia entre el antibiótico y las fracciones antimicrobianas del suplemento  
  
puesto que, si bien la bacteria mostró resistencia antibiótica in vitro, la terapia  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 231

Página 232:  
EXP | Capítulo IV  
  
antibiótica in vivo en el modelo animal propuesto consiguió recuperar a la totalidad de  
  
los animales. La DL100 causó la muerte de la totalidad de los animales infectados sin  
  
tratamiento o con ambos tratamientos por separado, sin embargo, se consiguió  
recuperar un tercio de los animales cuando se combinaron la terapia antibiótica y el  
  
suplemento con los metabolitos antimicrobianos producidos por L. salivarius C12, con  
diferencias estadísticamente significativas en las diferentes curvas de Kaplan-Meier, que  
  
son un método válido para analizar diferencias en estudios de supervivencia, incluso  
cuando se trata de grupos pequeños de comparación (Rich et al., 2010). Nuestros  
  
resultados son comparables a otros estudios de infección experimental con P. multocida  
en modelo ratón cuya terapia se basa en la administración de antibióticos (Ferran et al.,  
  
2011), pero hasta la fecha este es el primer estudio que ensaya esta asociación para este  
patógeno en concreto. No obstante, existen diversos estudios en otros modelos  
  
animales que confirman la asociación efectiva entre diferentes agentes antimicrobianos,  
  
entre los que se incluyen bacteriocinas u otros metabolitos y antibióticos (Mathur et al.,  
2017; Singh et al., 2014).  
  
  
Como se ha comentado anteriormente, los metabolitos antimicrobianos de las BAL  
  
tienen un mayor espectro de acción frente a bacterias Gram +, más próximas a ellas  
filogenéticamente y con las que generalmente comparten nichos ecológicos. Además,  
  
el mecanismo de acción de la mayoría de las bacteriocinas se basa en actuar sobre la  
pared bacteriana (Alvarez-Sieiro et al., 2016), motivo por el cual es posible que el efecto  
  
terapéutico del suplemento por sí mismo no sea suficiente para el control de la infección  
  
producida por el patógeno, que es Gram -. El suplemento podría contener las  
bacteriocinas de clase IId y de clase III que se encontraron en el genoma y cuya actividad  
  
antimicrobiana se comprobó en los estudios in vitro descritos más arriba y puede  
deberse a la degradación de la pared bacteriana, que junto con el ácido láctico, que  
  
actúa permeabilizando esta membrana celular (Alakomi et al., 2000), favorecería la  
entrada del antibiótico a la célula del patógeno, donde se une a la subunidad 30S del  
  
ribosoma e inhibe la síntesis de proteínas para ejercer su mecanismo de acción  
inhibiendo el desarrollo de la bacteria. Al combinar todos los metabolitos del  
  
suplemento con la terapia antibiótica, se consigue potenciar el efecto antimicrobiano  
  
original y ampliar el espectro de inhibición del patógeno, incluso existiendo resistencia  
 232 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 233:  
 EXP | Capítulo IV  
  
antibiótica, puesto que es importante destacar que la cepa de P. multocida utilizada  
  
mostró originalmente resistencia a la doxiciclina in vitro. Uno de los mecanismos de  
  
resistencia a tetraciclinas que se han descrito radica en la alteración de la permeabilidad  
de la membrana para evitar el paso del antibiótico al interior celular, fundamental para  
  
ejercer su mecanismo de acción (Grossman, 2016; Kehrenberg et al., 2001). El  
mecanismo de acción del ácido láctico y las bacteriocinas en su conjunto podría revertir  
  
este mecanismo de resistencia, favoreciendo el paso del antibiótico al interior celular,  
como se ha comentado anteriormente.  
  
  
Desde el punto de vista de la investigación básica, sería muy interesante ahondar en el  
  
conocimiento de los metabolitos exactos que tienen una mayor actividad y poder  
realizar una caracterización completa de los sobrenadantes para conocer la totalidad de  
  
sus componentes y la interacción entre ellos, determinando las bases farmacodinámicas  
  
de la sinergia detectada. Los componentes antimicrobianos podrían identificarse de  
forma fiable mediante resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía o  
  
espectrometría de masas (Aguilar-Toalá et al., 2018; Kanak y Yilmaz, 2018; Şanlıbaba y  
Güçer, 2015) y la cuantificación de la fracción proteica mediante el método de Bradford  
  
o utilizando el ácido bicinconínico (BCA) (Cleveland et al., 2002; Kawai et al., 2004). Esta  
caracterización completa será llevada a cabo en futuros estudios para lograr la  
  
optimización de la producción de los metabolitos que jueguen un papel más relevante y  
poder cuantificarlos para la realización de estudios dosis-efecto. No obstante, desde el  
  
punto de vista industrial, el suplemento elaborado, con todos sus componentes en las  
  
proporciones que se generan de forma espontánea, ha demostrado ser seguro y tener  
efectividad en el tratamiento de una enfermedad de gran relevancia en Sanidad Animal.  
  
  
Esta tesis doctoral engloba, por primera vez, un conjunto de experimentos encaminados  
  
a optimizar la producción de metabolitos de una cepa de L. salivarius para elaborar un  
suplemento que actúe de forma sinérgica con la terapia antibiótica para el control de  
  
una infección experimental por P. multocida. El modelo experimental de este estudio no  
solo comprueba la eficacia del suplemento elaborado, sino que además ha permitido  
  
validar el método de selección de las bacterias beneficiosas, la evaluación de su  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 233

Página 234:  
EXP | Capítulo IV  
  
actividad antimicrobiana y el proceso de optimización de metabolitos y detección de  
  
sinergias con antibióticos in vitro, descrita en los capítulos del bloque anterior.  
  
  
Las infecciones experimentales en modelos animales son fundamentales para evaluar la  
  
efectividad y seguridad de un nuevo tratamiento o una nueva pauta antimicrobiana  
(Miró y Gatell, 2000) y podrían ser consideradas como un paso previo a la elaboración  
  
de un producto que pueda ser administrado y analizado en condiciones reales, más allá  
de las puramente experimentales, como se verá en los siguientes capítulos. Este estudio  
  
sienta las bases científicas del desarrollo industrial de un producto posbiótico, que será  
definido y descrito en los siguientes capítulos de esta tesis doctoral, y que surge de  
  
forma innovadora como nueva alternativa para el control de enfermedades infecciosas  
en medicina veterinaria, que compense la escasez de antibióticos de nueva generación  
  
y ayude a combatir el grave problema de las resistencias a los antibióticos.  
  
  
  
  
  
 234 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 235:  
 EXP | Capítulo IV  
  
  
  
CAPÍTULO V: Administración de posbióticos para la mejora de los  
indicadores sanitarios y los parámetros productivos en  
ganadería  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 235

Página 236:  
EXP | Capítulo V  
  
  
  
  
  
 236 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 237:  
 EXP | Capítulo V  
  
INTRODUCCIÓN  
  
  
  
La búsqueda de alternativas a los antibióticos: una necesidad actual  
  
El sector ganadero ha sufrido importantes transformaciones y ha ido progresando de  
  
forma exponencial durante las últimas décadas, siendo el sector que más crecimiento  
ha experimentado dentro de la economía agrícola. La ganadería aporta un 40 % del valor  
  
de la producción agrícola global y representa el principal medio de subsistencia de casi  
1.300 millones de personas en todo el mundo. El crecimiento poblacional y económico  
  
ha favorecido la intensificación en la producción ganadera como respuesta al  
incremento en la demanda de productos de origen animal (Alexandratos y Bruinsma,  
  
2012; Bajagai et al., 2016). Estos hechos han traído aparejados dos graves problemas  
  
relacionados con la Salud Pública. Por una parte, la administración de antibióticos en  
dosis subterapéuticas como promotores del crecimiento para aumentar los indicadores  
  
productivos de los animales es una de las principales causas de aparición y diseminación  
de resistencias antimicrobianas, lo que ocasionó la prohibición de esta práctica en todos  
  
los países de la Unión Europea en el año 2006 (EC/1831/2003). Por otra parte, la  
emergencia de las enfermedades zoonóticas transmitidas a través de los alimentos de  
  
origen animal, denominadas «toxiinfecciones alimentarias», continúan siendo una seria  
amenaza para la Salud Pública y además causan importantes pérdidas económicas en  
  
las producciones a nivel mundial (Bajagai et al., 2016; Gil-Sánchez, 2003).  
  
  
En este contexto, surge la necesidad de buscar alternativas para limitar la  
  
administración de antimicrobianos para su uso terapéutico y permitan satisfacer el  
incremento en la demanda de productos de origen animal, sin comprometer la salud de  
  
estos y de las personas (Bajagai et al., 2016; Ribeiro et al., 2016). Estas alternativas  
deben ser sostenibles; mejorar los indicadores productivos de los animales y, sobre  
  
todo, su salud, la salud medioambiental y, con ello, la salud humana bajo la estrategia  
global «One Health» (Figura 5.1).  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 237

Página 238:  
EXP | Capítulo V  
  
  
  
  
  
 Figura 5.1. Resumen del contexto de la necesidad de búsqueda de alternativas  
  
  
  
El sector ovino de carne y la importancia de mitigar los problemas asociados a los  
  
factores de estrés  
  
El sector de los pequeños rumiantes representa en torno al 3,8 % de la Producción Final  
  
Agraria (PFA) en España, lo que supone un 9,9 % de la Producción Final de la rama  
Ganadera (PFG), ocupando el quinto lugar en importancia económica en nuestro país.  
  
En cuanto al sector ovino en particular, el 80 % del censo se encuentra localizado en 5  
comunidades autónomas, siendo Extremadura la primera comunidad en censo, con el  
  
24 % (Figura 5.2). En la Unión Europea, España aportaría aproximadamente el 18 % del  
censo total de ovino, situándose como el segundo país en importancia por número de  
  
animales, superado únicamente por Reino Unido (Bravo et al., 2020; Caracterización Del  
  
Sector Ovino y Caprino En España, 2019).  
  
  
  
  
  
 238 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 239:  
 EXP | Capítulo V  
  
  
  
  
  
 Figura 5.2. Distribución provincial del censo de ovino en España (datos del año 2019).  
 Fuente: S.G. Análisis, Coordinación y Estadística (MAPA).  
  
Las explotaciones clasificadas para la producción cárnica representan más del 75 % del  
  
total de la producción ovina nacional (González et al., 2016; Caracterización Del Sector  
Ovino y Caprino En España, 2019). El periodo de cebo de los animales es una etapa  
  
crucial en la producción de ovino de carne, debido a que las condiciones de  
  
intensificación empleadas en este periodo conllevan importantes factores que pueden  
afectar al estrés de los animales, como el destete, el transporte y la adaptación al  
  
cebadero. Los grandes niveles de estrés que sufren los animales frecuentemente  
pueden ocasionar el padecimiento de importantes problemas sanitarios, con la  
  
consecuente bajada en la producción y pérdidas económicas (Bajagai et al., 2016;  
González et al., 2016).  
  
  
Los factores estresantes relacionados con el manejo de los corderos pueden alterar la  
  
composición y las importantes funciones de la microbiota, lo que resulta en una disbiosis  
  
que tiene consecuencias negativas para la salud animal (Deng et al., 2017; Li et al., 2019).  
De hecho, cada vez existe una mayor evidencia científica del papel importante que tiene  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 239

Página 240:  
EXP | Capítulo V  
  
la microbiota del tracto gastrointestinal en la rentabilidad de los animales de producción  
  
(Bajagai et al., 2016; Ribeiro et al., 2016; Yoon et al., 2015). Por todo esto, se ha  
incrementado la necesidad de mitigar los problemas asociados a la intensificación de la  
  
producción ganadera, como ocurre en la etapa de cebo de los animales, que consigan  
aumentar los aspectos relacionados con el bienestar animal sin ocasionar un detrimento  
  
de los parámetros productivos de los animales y respetando la normativa actual en  
  
materia de aditivos promotores del crecimiento.  
  
  
  
Importancia de las pasteurelosis en cebaderos de ovino  
  
Los procesos respiratorios causados por patógenos infecciosos son una de las patologías  
más importantes en la producción ovina (Risco y García, 2020). Las «pasteurelosis»  
  
representan uno de los procesos más relevantes y están producidos por distintos  
agentes bacterianos pertenecientes a la familia Pasteurellaceae, entre la que destacan  
  
los géneros Pasteurella, Mannheimia y Bibersteinia (Martín-Palomino, 2020).  
  
  
En general, el desencadenamiento de estos procesos es de naturaleza multifactorial y  
se asocia con la presencia de otros factores concurrentes. Entre ellos, destacan los  
  
factores relacionados directamente con el hospedador (edad, estado fisiológico, sistema  
  
inmunitario, etc.), agentes infecciosos concomitantes (virus, bacterias, parásitos, etc.) y  
factores ambientales (cambios bruscos en la temperatura, gases irritantes, etc.) y de  
  
manejo, que pueden verse altamente influenciados por el estrés (Radostits et al., 2007;  
Risco y García, 2020).  
  
  
Las especies Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica y Bibersteinia threalosi  
  
son las que originan mayor morbilidad y mortalidad en pequeños rumiantes y  
constituyen una de las principales causas de pérdidas económicas, debido a que causan  
  
una diminución en la rentabilidad de los animales y un aumento en los costes por  
  
tratamientos (Lacasta et al., 2008; Martín-Palomino, 2020; Radostits et al., 2007). Estas  
especies bacterianas forman parte de la microbiota residente en el tracto respiratorio  
  
superior de los animales y pueden ejercer como patógenos oportunistas, ocasionando  
  
  
 240 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 241:  
 EXP | Capítulo V  
  
una disbiosis que es perjudicial para el animal, cuando se dan los factores concurrentes  
  
antes mencionados (Martín-Palomino, 2020).  
  
  
  
Utilización de compuestos bioactivos en piensos funcionales como alternativa  
  
En la actualidad, el empleo de aditivos funcionales en nutrición animal es la principal  
opción para mejorar los índices productivos, prevenir la aparición de enfermedades y  
  
respetar el bienestar animal (Bajagai et al., 2016). En este sentido, entendemos como  
  
«piensos funcionales» a los piensos para alimentación animal suplementado con  
compuestos bioactivos que, incorporados a la dieta de los animales, pueden mejorar su  
  
bienestar y productividad más allá de lo que cabría esperar o explicar por su simple  
potencial nutricional (Velasco et al., 2006).  
  
  
Entre los componentes bioactivos más utilizados en alimentación animal, los  
  
compuestos de la familia de los -bióticos son los más utilizados. Tanto los «prebióticos»,  
ingredientes no digestibles que actúan como sustrato de microorganismos beneficiosos;  
  
como los «probióticos», los propios microorganismos vivos que confieren beneficios  
para la salud; y los «simbióticos», la combinación de ambos, son productos muy  
  
habituales en el mercado y su utilización está muy extendida en el campo de la nutrición  
  
animal. No obstante, los «posbióticos», el miembro más novedoso de la familia de los  
compuestos bioactivos aún no es muy conocido. Si bien los probióticos son  
  
generalmente las bacterias vivas que producen sustancias beneficiosas para la salud, los  
posbióticos engloban toda aquella preparación que incluya tanto los microorganismos  
  
beneficiosos inanimados como sus componentes (Salminen et al., 2021). El consenso  
publicado a mediados del año 2021 por la Asociación Científica Internacional de  
  
Probióticos y Prebióticos (ISAPP) indica que el término «inanimadas» en lugar de  
«inactivadas», haciendo referencia a las células microbianas, radica en que la utilización  
  
de microorganismos que no estén vivos no implica que estos hayan perdido su  
  
funcionalidad.  
Así, los posbióticos son productos o subproductos metabólicos bioactivos, secretados  
  
por bacterias vivas o liberados a partir de la lisis de la membrana celular bacteriana, que  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 241

Página 242:  
EXP | Capítulo V  
  
pueden ser utilizados para mejorar la salud del hospedador (Aguilar-Toalá et al., 2018;  
  
Wegh et al., 2019). Los posbióticos pueden incluir metabolitos como enzimas, péptidos,  
proteínas, exopolisacáridos, ácidos orgánicos y lípidos (AGCC); y componentes  
  
estructurales, fundamentalmente de la pared celular bacteriana, como ácidos teicoico y  
lipoteicoico, peptidoglicano, proteínas de la capa superficial bacteriana y otros  
  
polisacáridos (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019).  
  
  
La gran potencialidad de los posbióticos en producción animal se le atribuye debido a la  
  
gran variedad de los efectos de sus componentes, que pueden ser tanto locales,  
principalmente a nivel intestinal, como sistémico, mediante la acción reguladora de sus  
  
moléculas. No obstante, depende en gran medida de la cepa bacteriana que se utilice  
en su producción y de los tipos de compuestos bioactivos que produzcan, que en  
  
ocasiones son difíciles de cuantificar y caracterizar. El número de estudios en esta área  
es todavía muy limitado, por lo que es necesaria una mayor investigación, en especial  
  
en condiciones reales de campo.  
  
  
El objetivo general de este capítulo es evaluar el efecto beneficioso de un producto  
  
posbiótico elaborado a partir de una selección de BAL sobre los indicadores sanitarios y  
los parámetros productivos en corderos de cebo.  
  
  
Para ello, los objetivos específicos son los siguientes:  
  
  
 - Realizar una selección de BAL beneficiosas para elaborar un producto posbiótico  
  
 con los compuestos bioactivos producidos por las mismas que sea específico  
 para el control de los procesos infecciosos más comunes en un cebadero de  
  
 ovino.  
  
  
 - Analizar el efecto de la administración del producto añadido al pienso de cebo  
  
 sobre los indicadores sanitarios y su repercusión sobre los parámetros  
 productivos de los corderos.  
  
  
  
  
 242 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 243:  
 EXP | Capítulo V  
  
 MÉTODO  
  
  
  
1. Diagnóstico previo de procesos infecciosos en el cebadero  
  
 Como paso previo al estudio, se llevó a cabo un análisis completo para diagnosticar los  
  
 procesos infecciosos más frecuentes en corderos de cebo y detectar el momento de  
 máxima incidencia de estos procesos. Se evaluó el historial clínico de los animales  
  
 enfermos y/o que causaron baja en los meses previos al ensayo y posteriormente se  
 realizaron 20 necropsias regladas y completas de corderos fallecidos en el cebadero  
  
 entre los meses de mayo y junio de 2019. Se aislaron los agentes infecciosos  
 involucrados y se determinó el cuadro patológico que presentaban los animales  
  
 (respiratorio, digestivo, septicémico, etc.), el curso de la enfermedad (agudo o crónico)  
  
 y la causa más probable de la muerte.  
  
  
 En el caso de los pulmones, se realizó un estudio macroscópico para evaluar el tipo de  
 neumonía (bronconeumonía, neumonía intersticial, neumonía fibrinosa o neumonía  
  
 tromboembólica) el curso de las lesiones (agudo o crónico), la presencia de exudado  
 (seroso, fibrinoso o purulento) el grado de extensión o afectación del pulmón (% de  
  
 órgano afectado). Se tomaron muestras de los pulmones, hígado, riñón e intestino de  
 los corderos y se realizó cultivo en medios Agar Sangre y MacConkey para el aislamiento  
  
 de bacterias, que fueron inicialmente identificadas mediante pruebas bioquímicas  
 básicas (catalasa y oxidasa), por sus características tintoriales (tinción de Gram) y la  
  
 galería API®ID (bioMérieux). Los aislados bacterianos potencialmente patógenos fueron  
  
 confirmados mediante técnicas moleculares y se conservaron con un 15 % de glicerol a  
 -80 ºC para pruebas posteriores.  
  
  
  
2. Selección de BAL con actividad frente a los patógenos más frecuentes del cebadero  
  
 Para realizar la selección de BAL con actividad antimicrobiana frente a los patógenos  
  
 obtenidos en el cebadero, se empleó la técnica de microdilución en caldo mediante los  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 243

Página 244:  
 EXP | Capítulo V  
  
 procedimientos previamente descritos en esta tesis doctoral. También se tuvieron en  
  
 cuenta los resultados de estudios previos de la capacidad inmunomoduladora de los  
 aislados, seleccionando aquellas BAL que potencialmente podrían favorecer la  
  
 activación de rutas inmunitarias protectoras frente a los procesos infecciosos  
 diagnosticados.  
  
  
  
3. Elaboración del producto posbiótico  
  
 En función de los resultados de los procedimientos anteriores, se seleccionó una  
 combinación de BAL que pueda favorecer el control de los patógenos en el cebadero de  
  
 ovino. Las BAL seleccionadas están depositadas en la Colección Española de Cultivos  
 Tipo (CECT) y fueron utilizada para desarrollar un producto posbiótico cuya composición  
  
 está protegida por secreto industrial.  
  
  
 De forma general, el posbiótico se obtiene a partir de la fermentación de los cultivos de  
 microorganismos que son transformados durante el propio proceso de fabricación  
  
 conforme al reglamento (UE) 2017/1017 (European Commission, 2017). El proceso  
 general fue desarrollado en las instalaciones de la empresa PentaBiol S.L. (Navarra,  
  
 España) y consiste en una fermentación líquida en medios de cultivo en un circuito de  
  
 fermentadores cerrado, controlando diferentes parámetros como temperatura, pH y  
 contaminaciones con microorganismos no deseados, seguida de una inactivación. La  
  
 fase final de producción incluye una etapa de secado del producto fermentado y el  
 molido en un molino de molturación.  
  
  
 El producto final obtenido se presenta como gránulos desecados, está registrado como  
  
 suplemento alimentario y se añade al pienso animal sin alterar la composición analítica  
 del mismo ni los patrones dietéticos de los animales. Además, se considera seguro para  
  
 su uso como complemento alimenticio debido a que todas las BAL utilizadas durante el  
  
 proceso de fermentación cumplen los requisitos de la evaluación de QPS (EFSA Panel on  
 Biological Hazards (BIOHAZ), 2021).  
  
  
  
 244 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 245:  
 EXP | Capítulo V  
  
4. Diseño del estudio experimental: elaboración de los grupos de estudio  
  
 El estudio fue desarrollado en un cebadero de ovino (Fomento Ovino Extremeño,  
 FOVEX, S.A.T.) durante el periodo de cebo de corderos en la época de máxima incidencia  
  
 de procesos infecciosos. Esta fue detectada mediante la evaluación del historial clínico  
 previo de un cebadero perteneciente a la misma cooperativa, con animales del mismo  
  
 origen y, por tanto, con procesos infecciosos similares. Un total de 200 corderos de unos  
  
 2 meses de edad y 18 Kg de peso vivo fueron distribuidos de forma aleatoria en dos  
 grupos de 100 animales, como se detalla en la Figura 5.3 y su pauta de alimentación se  
  
 realizó como se describe en la tabla 5.1. Todos los animales fueron identificados  
 individualmente mediante doble crotal electrónico.  
  
  
  
  
  
 Figura 5.3. Detalle de los grupos de estudio en el cebadero  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 245

Página 246:  
 EXP | Capítulo V  
  
 Tabla 5.1. Diseño de los grupos de estudio  
  
 Grupo Alimentación  
  
 Control Se alimentaron con el pienso de cebo estándar durante el periodo  
  
 de cebo  
  
 Suplementado Recibieron el mismo pienso estándar suplementado con un 0,4 %  
  
 del producto posbiótico (4 gramos por kilogramo de pienso)  
 durante todo el periodo de cebo  
  
  
 Todos los animales se alimentaron ad libitum durante las 7 semanas y media de  
 realización del estudio, previas a su transporte al matadero, y tenían agua de bebida a  
  
 su disposición en todo momento.  
  
  
  
  
5. Estimación de los parámetros sanitarios  
  
 Los indicadores sanitarios monitorizados durante el estudio fueron el índice de  
  
 mortalidad, los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos antes y después  
  
 del cebo y el estudio macroscópico de las lesiones detectadas, principalmente en los  
 pulmones, tras el sacrificio en el matadero.  
  
  
 Índice de mortalidad  
  
  
 Se estimó el índice de mortalidad de cada grupo anotando las bajas detectadas a lo largo  
  
 de la realización del estudio. El índice de mortalidad se expresa en porcentaje y relaciona  
 el número de animales fallecidos con respecto al total.  
  
  
 Analíticas sanguíneas  
  
  
 Se tomaron muestras de sangre de 50 animales elegidos de forma aleatoria de cada  
 grupo mediante punción en la vena yugular al inicio del estudio y al final de la  
  
 experiencia, previo al sacrificio. Las muestras de sangre entera se recogieron en tubos  
  
  
 246 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 247:  
 EXP | Capítulo V  
  
con EDTA para análisis hematológico y las muestras para la obtención del suero se  
  
depositaron en tubos con activador de la coagulación para la determinación de los  
parámetros bioquímicos. Las muestras se transportaron 4 ºC y se conservaron en  
  
refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio, donde el suero se obtuvo  
mediante centrifugación a 3000 r.p.m.  
  
  
Se realizaron hemogramas completos mediante un analizador de hematología (Celltac  
α MEK-6550, Nihon Kohden) para determinar los parámetros de la serie roja, que incluye  
  
recuento de hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM),  
hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular  
  
media (CHCM); la serie blanca, que incluye recuento de leucocitos y porcentaje de  
linfocitos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos; y la serie plaquetar.  
  
  
Además, se realizó un perfil bioquímico completo mediante un analizador automático  
  
de química clínica (Biosystem A15) para determinar el perfil proteico, es decir, las  
proteínas totales y la albúmina; el perfil hepático, que incluye las enzimas alanina  
  
aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) y la bilirrubina; el perfil  
  
renal, que incluye la creatinina y la urea; y otros parámetros del perfil general como la  
fosfatasa alcalina (ALP) y la lactato deshidrogenasa (LDH).  
  
  
Estudio macroscópico de las lesiones  
  
  
El sacrificio de los animales se realizó en el matadero de EA Group localizado junto al  
  
cebadero del estudio siguiendo la normativa vigente según el Reglamento (CE)  
1099/2009. Los corderos fueron eviscerados y se inspeccionaron las canales de cada uno  
  
de ellos de forma individual, manteniendo la identificación de los animales en todo  
  
momento. La inspección macroscópica post mortem incluyó todas las cavidades y  
órganos y, más detalladamente, los pulmones con todos sus lóbulos y los nódulos  
  
linfáticos adyacentes. La categorización de las lesiones se realizó de la misma manera a  
la descrita para el diagnóstico de procesos durante las necropsias, en la fase previa a  
  
este estudio. Además, se tomaron muestras de 6 pulmones con lesiones de cada grupo  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 247

Página 248:  
 EXP | Capítulo V  
  
 para realizar un diagnóstico de los agentes microbianos causantes de la lesión, que se  
  
 procesaron de la misma forma a la descrita para el aislamiento y la identificación de  
 patógenos.  
  
  
 Por otro lado, todos los animales que causaron baja durante el desarrollo del estudio  
  
 experimental fueron sometidos a necropsia reglada y a un minucioso procedimiento de  
  
 diagnóstico de los procesos patológicos para establecer la causa de la muerte, siguiendo  
 los procedimientos anteriormente descritos.  
  
  
  
6. Recogida de datos y toma de muestras  
  
 Cálculo de los parámetros productivos  
  
  
 Se evaluó la mejora en la productividad de los animales mediante el cálculo de tres  
  
 indicadores productivos: la ganancia media diaria (GMD), el índice de conversión (IC) y  
 el rendimiento de la canal.  
  
  
 Ganancia media diaria  
  
  
 Se recogió el peso de los corderos mediante una báscula de pesaje electrónica con  
 capacidad de lectura de crotales antes de la realización del estudio experimental (Figura  
  
 5.4), durante el estudio y al finalizar este, previo al sacrificio, para calcular la Ganancia  
 Media Diaria (GMD) en dos periodos diferentes (del primer pesaje al segundo y del  
  
 segundo pesaje al tercero) y la GMD total (del primer pesaje al último). La GMD es un  
 indicador productivo que se utiliza para medir la velocidad de crecimiento y viene  
  
 definido como la cantidad de peso ganado al día por los animales. Se calcula dividiendo  
 el peso ganado por los animales de ambos grupos entre el número de días de duración  
  
 del estudio.  
  
  
  
  
  
 248 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 249:  
 EXP | Capítulo V  
  
  
  
  
  
 Figura 5.4. Báscula de pesaje electrónica en el cebadero  
  
  
Índice de conversión  
  
  
El Índice de Conversión (IC) es un parámetro de rendimiento productivo que se define  
como la cantidad de alimento necesario para reponer 1 Kg de peso vivo, por lo que es  
  
un parámetro de eficiencia alimentaria. Se calcula dividiendo el consumo total de pienso  
entre la ganancia total de peso. Para su cálculo en nuestra experiencia hemos obtenido  
  
la diferencia entre la cantidad de alimento ofrecido y el pienso que no fue consumido  
por los animales.  
  
  
Rendimiento de la canal  
  
  
Se obtuvo el peso de la canal, que es el peso del cuerpo del animal sacrificado,  
desangrado, desollado y eviscerado, sin cabeza ni extremidades, que se realiza de forma  
  
automática al final de la cadena de sacrificio. Este valor se obtuvo de forma automática  
al final de la cadena de sacrificio y permite calcular el rendimiento de la canal, que es la  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 249

Página 250:  
 EXP | Capítulo V  
  
 relación entre el peso vivo del animal antes del sacrificio y el peso de la canal y se expresa  
  
 en porcentaje.  
  
  
  
7. Análisis estadístico  
  
 Se realizó un análisis inferencial para detectar las diferencias en los parámetros descritos  
 entre los dos grupos del estudio. Las variables cuantitativas se analizaron mediante la  
  
 prueba t de Student con corrección de Welch. Por el contrario, las diferencias entre las  
  
 variables cualitativas se exploraron mediante la prueba Chi-cuadrado. Los programas  
 estadísticos utilizados fueron R-4.0.4 y GraphPad Prism 8.  
  
  
  
  
 En la figura 5.5 se muestra una cronología con las etapas del estudio experimental  
 descrito.  
  
  
  
  
  
 250 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 251:  
 EXP | Capítulo V  
  
  
  
  
  
Figura 5.5. Cronología de la realización del estudio experimental  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 251

Página 252:  
EXP | Capítulo V  
  
  
  
  
  
 252 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 253:  
 EXP | Capítulo V  
  
Figura resumen del método  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 253

Página 254:  
EXP | Capítulo V  
  
RESULTADOS  
  
  
  
Las neumonías por Pasteurella spp. constituyen uno de los procesos más frecuentes  
en los cebaderos de ovino  
  
Se estudió la historia clínica de un cebadero de ovino, que fue completada con la  
realización de 20 necropsias de animales fallecidos en los meses de mayo y junio de 2019  
  
para diagnosticar la principal causa de la muerte y diseñar un producto para prevenir los  
  
cuadros infecciosos más frecuentes. Se llevó a cabo la inspección macroscópica de los  
órganos torácicos y abdominales de todos los animales, pero solo se procesaron en el  
  
laboratorio los órganos de 19 animales debido a que uno de ellos presentaba un alto  
grado de autolisis.  
  
  
Se aislaron diferentes especies de Pasteurella spp. en el 83,33% de los pulmones con  
  
lesiones neumónicas, que fueron identificadas como P. multocida tipo A en el 60 % de  
ellos, tipo B en el 6,67 % y tipo D en el 13,33 %. Algunos de los pulmones presentaban  
  
coinfecciones con otros patógenos como Mycoplasma spp., Biberstenia trehalosi,  
Streptococcus spp. o E. coli.  
  
  
Se realizaron diferentes ensayos de actividad antimicrobiana de la colección de aislados  
de BAL frente a los patógenos más frecuentes del cebadero. Para la preparación del  
  
producto posbiótico para elaborar el pienso con actividad funcional, se seleccionaron  
varias BAL en función de los resultados de la actividad antimicrobiana. Además, también  
  
se tuvo en cuenta la activación de rutas del sistema inmunitario descrita en los capítulos  
anteriores de esta tesis doctoral y que puedan resultar de utilidad para la protección de  
  
los animales frente a estos patógenos.  
  
  
Todos los resultados del diagnóstico de procesos y de los ensayos de actividad se  
  
encuentran detallados en los Apéndices IIIA y IIIB, respectivamente.  
  
  
  
  
 254 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 255:  
 EXP | Capítulo V  
  
  
Los animales suplementados presentan menos lesiones neumónicas y de menor  
  
extensión  
  
No se obtuvieron diferencias en el porcentaje de mortalidad, puesto que se registró un  
  
4 % de bajas en los dos grupos del estudio. Las causas de la muerte fueron similares en  
los dos grupos, registrándose en la mayoría de los casos lesiones neumónicas en las que  
  
se aisló Pasteurella spp., seguido de algún posible caso de Clostridium spp. en el grupo  
suplementado y otras causas no asociadas a procesos infecciosos de las cuales no se  
  
determinó el origen. El número de bajas no fue suficiente para realizar inferencia  
estadística.  
  
  
En cuanto a las lesiones neumónicas (Figura 5.6), se observó la misma tendencia cuando  
se exploran estas de forma cualitativa, es decir presencia o ausencia de lesiones, como  
  
de forma cuantitativa, es decir, porcentaje de extensión de las lesiones (Figura 5.7A y  
5.7B). Se detectaron lesiones neumónicas en 63 corderos del grupo control (65,62 %) y  
  
50 corderos del grupo suplementado (52,08 %) y la media de los porcentajes de  
extensión de estas fue de 15,24 % y 12,3 %, respectivamente. Se observan diferencias  
  
estadísticamente significativas con un nivel de confianza al 90 % (χ2= 3,097, P=0,078) en  
la presencia de lesiones, pero no en el porcentaje de extensión de las mismas (P=0,319),  
  
aunque la tendencia es igualmente positiva. Los animales suplementados con el  
posbiótico presentan menos lesiones y de menor extensión que los animales del grupo  
  
control. Por otro lado, el porcentaje de decomisos fue similar en ambos grupos (χ2=  
  
0,218, P=0,64) aunque se produjeron menos decomisos en el grupo suplementado, se  
encontraron un 33,33 % de decomisos en el grupo control y un 29,17 % en el grupo  
  
suplementado (Figura 5.7C). Por el contrario, con respecto a los patrones de las lesiones,  
así como su duración y el tipo de exudado, no se observa una tendencia clara y no se  
  
encontraron diferencias estadísticamente significativas (χ2= 3,93, P= 0,14; χ2= 1,156, P=  
0,763; χ2=4,628, P=0,592).  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 255

Página 256:  
EXP | Capítulo V  
  
El patógeno P. multocida tipo A es más prevalente en las lesiones neumónicas del  
  
grupo control  
  
En el grupo control se obtuvieron cultivos puros de P. multocida (fundamentalmente  
tipo A, a excepción de un aislado de tipo D) en el 66,67 % de los pulmones muestreados.  
  
Sin embargo, en el grupo suplementado, P. multocida solo se registró en el 33,33 % de  
los pulmones muestreados. En el resto de los pulmones de este grupo se obtuvieron  
  
varios cultivos mixtos en los que no se determinó ningún patógeno predominante que  
pudiera ser causante de enfermedad. La especie Aeromonas hydrophila se detectó en la  
  
misma proporción en los dos grupos (Figura 5.7D).  
  
  
  
  
  
 Figura 5.6. Distintos tipos de lesiones neumónicas encontradas durante el análisis macroscópico  
 realizado tras el sacrificio de los animales en el matadero.  
  
  
  
  
  
 256 MARÍA BRAVO SANTILLANA

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

Página 258:  
EXP | Capítulo V  
  
Los animales suplementados muestran una mayor velocidad de crecimiento y una  
  
mayor eficiencia alimentaria  
  
En cuanto a los pesos, se observaron diferencias estadísticamente significativas antes  
de comenzar el estudio, siendo el grupo suplementado el grupo con el peso medio más  
  
bajo (P=0,004). No obstante, durante la experiencia y una vez finalizado el periodo de  
suplementación, la media de los pesos fue similar entre los grupos (P= 0,849 y P=0,996,  
  
respectivamente). Esto viene refrendado por las diferencias encontradas en la GMD,  
que es un indicador de la velocidad de crecimiento, y que fue mayor en el grupo  
  
suplementado en el periodo inicial (P=0,003), así como en todo el periodo de cebo  
(P=0,14). La GMD del periodo final fue similar entre los grupos (P=0,776). Los animales  
  
del grupo que recibió el posbiótico tienen una velocidad de crecimiento más elevada y  
son capaces de alcanzar el mismo peso final partiendo de un peso inferior. De forma  
  
similar, se observó un IC inferior en el grupo suplementado, aunque las diferencias no  
  
son estadísticamente significativas (P=0,126). Por otro lado, no se observaron  
diferencias en los pesos a la canal ni en los rendimientos de esta (P=0,992 y P=0,632,  
  
respectivamente). Todos los resultados se muestran en la Tabla 5.2 y la Figura 5.8.  
  
  
 Tabla 5.2. Resultados de los parámetros productivos por grupos de estudio  
  
 Parámetros Control Suplementado  
  
 Peso inicial (Kg) 18,77 18,22 \*\*\*  
  
 Peso mitad (Kg) 24,13 24,2  
  
 Peso final (Kg) 27,58 27,57  
  
 GMD 1 (g) 165,99 186,07 \*\*  
  
 GMD 2 (g) 178,95 175,89  
  
 GMD Total (g) 172,04 182,80  
  
 Peso Canal (Kg) 12,79 12,79  
  
 Rendimiento (%) 46,39 46,24  
  
 IC 6,23 5,14  
  
 \*\*\*Diferencias significativas entre grupos (P=0,004)  
 \*\*Diferencias significativas entre grupos (P=0,003)  
  
  
  
  
  
 258 MARÍA BRAVO SANTILLANA

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

Página 260:  
EXP | Capítulo V  
  
Las analíticas realizadas a los corderos no arrojan datos de interés clínico relevante y  
la urea podría indicar un mejor aprovechamiento de las proteínas del pienso  
  
No se observaron diferencias en los hemogramas de los grupos de estudio antes y  
después de la experiencia y todos los valores están dentro de los rangos de referencia  
  
para la especie ovina (Tablas 5.3 y 5.4).  
  
En los parámetros bioquímicos se observaron diferencias entre los grupos, pero no  
revisten de una importancia clínica relevante (Tablas 5.5 y 5.6). Se observó una  
  
diferencia estadísticamente significativa en la enzima ALP (P=0,094), que es superior en  
  
el grupo suplementado tras la suplementación, y podría estar relacionado con la mayor  
velocidad de crecimiento de estos corderos. Por otro lado, se detectaron valores  
  
superiores a los rangos de referencia para ovinos en general en las actividades  
enzimáticas de la AST y LDH en ambos grupos de estudio, posiblemente relacionado con  
  
la toma o el manejo de las muestras. En los corderos del grupo suplementado se  
encontró una diferencia estadísticamente significativa (P=0,001) en los niveles de urea  
  
detectados en suero, que por lo general son muy elevados en todos los animales,  
posiblemente por la alta concentración de proteínas del pienso de cebo. Es probable  
  
que en estos animales la urea sea significativamente inferior por un mejor  
aprovechamiento de las proteínas del pienso debido a la administración del posbiótico.  
  
  
  
  
  
 260 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 261:  
 EXP | Capítulo V  
  
  
 Tabla 5.3. Hemogramas completos de cada grupo al inicio de la experiencia, valores de referencia y sus unidades  
  
 Serie Parámetro Valores referenciaa Unidades Control Suplementado  
  
 Roja Hematíes 9-15 106 /μl 10,78 10,87  
  
 Hemoglobina 9-15 g/dl 9,78 9,7  
  
 Hematocrito 27-45 % 32,15 32,36  
  
 VCM 28-40 fl 30,09 29,85  
  
 HCM 8-12 pg 9,62 8,95  
  
 CHMC 31-34 g/dl 30,12 30  
  
 Blanca Leucocitos 4-12 103/μl 10,01 10,67  
  
 Linfocitos 40-75 % 43 39  
  
 Neutrófilos 10-50 % 51 50  
  
 Monocitos 0-6 % 2 3  
  
 Eosinófilos 0-10 % 4 7  
  
 Plaquetar Plaquetas 300-750 103/μl 653,6 651,2  
  
 a Valores hematológicos de referencia para ovinos (Byers y Kramer, 2010)  
  
  
  
Tabla 5.4. Hemogramas completos al final de la experiencia de cada grupo de estudio, valores de referencia y sus unidades  
  
 Serie Parámetro Valores referenciaa Unidades Control Suplementado  
  
 Roja Hematíes 9-15 106 /μl 11,23 10,79  
  
 Hemoglobina 9-15 g/dl 10,10 9,93  
  
 Hematocrito 27-45 % 33,29 31,9  
  
 VCM 28-40 fl 29,43 29,82  
  
 HCM 8-12 pg 8,93 9,66  
  
 CHMC 31-34 g/dl 30,36 30,69  
  
 Blanca Leucocitos 4-12 103/μl 8,4 8,36  
  
 Linfocitos 40-75 % 50 52  
  
 Neutrófilos 10-50 % 40 40  
  
 Monocitos 0-6 % 2 2  
  
 Eosinófilos 0-10 % 8 2,9  
  
 Plaquetar Plaquetas 300-750 103/μl 704,4 598  
  
 a Valores hematológicos de referencia para ovinos (Byers y Kramer, 2010)  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 261

Página 262:  
EXP | Capítulo V  
  
 Tabla 5.5. Perfiles bioquímicos completos de cada grupo antes del estudio, valores de referencia y sus unidades  
  
 Perfil Parámetro Valores referenciaa Unidades Control Suplementado  
  
 Proteico Proteínas totales 5.9-7.8 g/dl 5,84 5,81  
  
 Albúmina 2.7-3.7 g/dl 3,31 2,8\*\*\*  
  
 Hepático ALT 20-25 UI/l 19,31 21,24  
  
 AST 49-123 UI/l 261,6 192,4  
  
 Bilirrubina 0-0.5 mg/dl 0,094 0,08  
  
 Renal Creatinina 0.9-2 mg/dl 0,61 0,63  
  
 Urea 10-26 mg/dl 26,78 27,15  
  
 General ALP 68-387 UI/l 265,7 280,9  
  
 LDH 83-476 UI/l 1211 1101  
  
 a Valores bioquímicos de referencia para ovinos (Kaneko et al., 2008; Latimer, 2011)  
  
 \*\*\*Diferencias significativas entre grupos (albúmina P = 3,66x10-11)  
  
  
Tabla 5.6. Perfiles bioquímicos completos de cada grupo al finalizar el estudio, valores de referencia y sus unidades  
  
 Perfil Parámetro Valores referenciaa Unidades Control Suplementado  
  
 Proteico Proteínas totales 5.9-7.8 g/dl 20,95 6,12  
  
 Albúmina 2.7-3.7 g/dl 3,37 3,3  
  
 Hepático ALT 20-25 UI/l 22,09 23,47  
  
 AST 49-123 UI/l 156,4 160,8  
  
 Bilirrubina 0-0.5 mg/dl 0,083\*\* 0,13  
  
 Renal Creatinina 0.9-2 mg/dl 0,64 0,63  
  
 Urea 10-26 mg/dl 42,19 34,94\*\*  
  
 General ALP 68-387 UI/l 156,4 326,4\*  
  
 LDH 83-476 UI/l 1538 1607  
  
 a Valores bioquímicos de referencia para ovinos (Kaneko et al., 2008; Latimer, 2011)  
  
 \*\*\*Diferencias significativas entre grupos (P=0,094)  
  
 \*\*Diferencias significativas entre grupos (bilirrubina P=0,002 y urea P = 0,001)  
  
  
  
  
  
 262 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 263:  
 EXP | Capítulo V  
  
DISCUSIÓN  
  
  
La intensificación de las producciones ganaderas se ha incrementado como respuesta al  
  
aumento en la demanda de productos de origen animal y, además, ha contribuido a la  
diseminación de las resistencias antimicrobianas y a la emergencia de patógenos  
  
zoonósicos (Alexandratos y Bruinsma, 2012). De hecho, la creciente preocupación por la  
  
propagación de bacterias resistentes a los antibióticos ocasionó la prohibición de la  
utilización de estos como promotores del crecimiento en el año 2006 (EC/1831/2003),  
  
y a partir de ahí se han desarrollado distintas estrategias recogidas en el PRAN (Plan  
Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos, 2014-2018;2019-2021) cuyo objetivo  
  
es reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencia a los antibióticos y,  
consecuentemente, reducir el impacto de este problema sobre la salud de las personas  
  
y los animales, preservando de manera sostenible la eficacia de los antibióticos  
existentes.. Desde ese momento, la comunidad científica busca alternativas para  
  
mejorar los indicadores productivos de los animales, para satisfacer la demanda de  
  
alimentos de origen animal y, sobre todo, su salud, para garantizar como fin último la  
salud humana bajo el concepto «One Health».  
  
  
La utilización de piensos funcionales enriquecidos con posbióticos constituyen una  
  
novedosa estrategia que se ha propuesto recientemente para mejorar tanto la salud  
como el rendimiento productivo de los animales, pero han sido escasamente  
  
investigados en estudios in vivo hasta la fecha, especialmente en el caso de los  
rumiantes. En este capítulo se describe la utilización de un posbiótico para evaluar su  
  
efecto sobre ciertos indicadores sanitarios, así como su impacto sobre los parámetros  
productivos, especialmente diseñado para el control de las pasteurelosis, un problema  
  
muy frecuente en cebaderos de ovino. La pasteurelosis es una de las enfermedades  
  
respiratorias que tiene un mayor impacto económico en todo el mundo (Radostits et al.,  
2007). En el ganado ovino, representa una de las principales causas de pérdidas  
  
económicas debido a la elevada morbilidad, gastos en tratamientos y a su influencia  
negativa sobre el rendimiento productivo de los corderos (Lacasta et al., 2008; Martín-  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 263

Página 264:  
EXP | Capítulo V  
  
Palomino, 2020). Esta aproximación sanitaria es diferente a la del resto de estudios  
  
similares en esta y otras especies de animales de producción, puesto que se mejoró la  
  
rentabilidad de los corderos gracias al control de determinados procesos infecciosos  
mediante la utilización de un pienso funcional específicamente diseñado para la mejora  
  
de los problemas sanitarios más frecuentes de la explotación.  
  
  
En el análisis previo al estudio experimental descrito en este capítulo, se realizó una  
evaluación del historial clínico de un cebadero de ovino para detectar los momentos de  
  
mayor incidencia de procesos infecciosos, así como un diagnóstico completo para aislar  
los patógenos causantes de enfermedad. Se estableció la infección por P. multocida tipo  
  
A como la enfermedad más frecuente del cebadero, pese a que las neumonías que  
causa, en ocasiones, pueden manifestarse de forma subclínica sin presencia de  
  
sintomatología evidente (García-Jiménez et al., 2019). De hecho, las lesiones que  
  
produce constituyen una causa frecuente de decomisos en matadero (García-Jiménez  
et al., 2019; Martín-Palomino, 2020). Los factores de estrés asociados al periodo de cebo  
  
y las condiciones climatológicas adversas pueden favorecer al padecimiento de la  
enfermedad y a la bajada consecuente del rendimiento productivo de los animales  
  
(González et al., 2016; Lacasta et al., 2008; Martín-Palomino, 2020). De hecho, se  
detectó que la máxima incidencia de pasteurelosis en el cebadero analizado se  
  
corresponde con el final de la primavera y el verano en Extremadura, región en la que  
se localiza el mismo. Por todo esto, se realizó un estudio experimental para tratar de  
  
controlar las neumonías infecciosas producidas fundamentalmente por P. multocida,  
  
considerado un residente habitual de la microbiota respiratoria ovina, que puede actuar  
como patógeno oportunista cuando se dan los condicionantes anteriormente  
  
mencionados y que afecta de forma sustancial al rendimiento productivo (Martín-  
Palomino, 2020).  
  
  
Para el diseño del posbiótico se realizó un exhaustivo trabajo previo de selección y  
  
caracterización de bacterias potencialmente beneficiosas, que ha sido descrito los  
capítulos anteriores de esta tesis doctoral, seguido de la infección experimental descrita  
  
en modelo ratón para garantizar la seguridad de los compuestos. Como estudio  
  
complementario, en este capítulo, las bacterias candidatas a ser incluidas en el producto  
 264 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 265:  
 EXP | Capítulo V  
  
  
diseñado para el cebadero en cuestión, fueron enfrentadas a los aislados patógenos más  
  
comunes del cebadero, brindando especial interés a los resultados frente a las especies  
de la familia Pasteurellaceae. Este último estudio permitió acotar una selección final de  
  
BAL a partir de las cuales se fabricó el producto posbiótico. Este producto fue añadido a  
una concentración del 0,4 % a la alimentación estándar de un grupo de corderos en  
  
cebo, cuyos indicadores sanitarios y productivos fueron mejores que los del grupo que  
no fue suplementado.  
  
  
En cuanto a los indicadores sanitarios, el grupo suplementado mostró menores lesiones  
  
neumónicas y de menor extensión que el grupo control y, aunque las diferencias  
  
encontradas fueron menores, también se observó una tendencia positiva en el  
porcentaje de decomisos, que fue menor en los corderos suplementados. De hecho, un  
  
resultado para tener en cuenta es que se detectó una menor presencia del patógeno P.  
multocida tipo A en los pulmones con lesiones neumónicas de los grupos  
  
suplementados, puesto que este patógeno se seleccionó como modelo frente al cual se  
diseñaron los experimentos de cribado para elaborar el posbiótico. Tal y como se  
  
describió en el capítulo II de esta tesis doctoral, las BAL contenidas en el producto tienen  
potencial para interaccionar con los macrófagos del hospedador, específicamente  
  
activando la ruta inmunitaria mediada por el factor de señalización NF-κB. Esta cascada  
de señalización podría estar contribuyendo al control de la infección producida por P.  
  
multocida en el cebadero y conferir cierta protección frente al desarrollo de las lesiones,  
  
puesto que se ha comprobado previamente que la activación de NF-κB vía TLR2 en el  
hospedador por esta y otras especies del género podría ser importante tanto para el  
  
control como para la prevención de la enfermedad (He et al., 2020; Hsuan et al., 1999).  
Por otro lado, se desconoce si los metabolitos antimicrobianos producidos por las BAL  
  
beneficiosas, que mostraron actividad antimicrobiana in vitro frente al patógeno  
seleccionado, pueden alcanzar el pulmón cuando son administrados por vía oral, aunque  
  
tanto los resultados de la neumonía experimental descrita en el capítulo IV como estos  
podrían indicar que se produce una migración vía sistémica. De hecho, la modulación de  
  
la microbiota gastrointestinal puede favorecer la resolución de procesos que afectan al  
  
aparato respiratorio debido a la interacción conocida con el nombre de «eje intestino-  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 265

Página 266:  
EXP | Capítulo V  
  
pulmón», que está recibiendo cada vez más atención en la comunidad científica durante  
  
los últimos años (He et al., 2017). En futuros estudios se ahondará en los mecanismos  
  
responsables de estos efectos beneficiosos observados.  
  
  
En cuanto a los indicadores productivos, la ganancia media diaria (GMD) es un indicador  
muy utilizado para medir la velocidad de crecimiento de los animales. El ritmo de  
  
crecimiento en animales de producción tiene una primera fase de crecimiento rápido en  
el que la GMD alcanza un valor máximo para comenzar a descender cuando el animal  
  
logra aproximadamente un 30 % de su peso adulto, que es cuando el crecimiento  
disminuye progresivamente hasta estabilizarse (Lawrence et al., 2012). Por ello, en este  
  
estudio, observamos que la mayor diferencia entre el grupo control y el suplementado  
se detecta en el primer periodo de cebo considerado, momento en el que el ritmo de  
  
crecimiento es mayor, y eso se traduce en una GMD total al final del periodo de cebo  
  
también superior. El índice de conversión (IC), un parámetro de eficiencia alimentaria  
fue menor en el grupo suplementado, lo que supone una tendencia positiva, aunque en  
  
este caso las diferencias detectadas no son estadísticamente significativas.  
  
  
La mejora en los indicadores productivos de los animales puede ser debida a que la  
administración de piensos con aditivos funcionales favorece la modulación de la  
  
microbiota, creando un equilibrio favorable entre poblaciones bacterianas que aportan  
un beneficio al hospedador y los grupos potencialmente nocivos (Pessione, 2012; Piqué  
  
et al., 2019). La mayor proporción de poblaciones bacterianas como lactobacilos  
  
favorece el incremento en la actividad enzimática ruminal e intestinal, lo que aumenta  
la digestibilidad de determinados nutrientes (LeBlanc et al., 2011; Pessione, 2012).  
  
Además, también se ha descrito en algunos estudios el aumento en la longitud de las  
vellosidades intestinales, incrementando la superficie de absorción de nutrientes, lo que  
  
se traduce en un mejor aprovechamiento de los alimentos y, con ello, un crecimiento  
más eficiente de los animales (Bajagai et al., 2016; Fleige et al., 2007; Saleem et al.,  
  
2017). De hecho, un estudio realizado en corderos destetados suplementados con  
posbióticos de L. plantarum describe un incremento en la altura y anchura de las papilas  
  
ruminales y un incremento en la función de barrera intestinal (Izuddin et al., 2019a); y  
  
otro estudio, también en corderos destetados, describe un aumento en los indicadores  
 266 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 267:  
 EXP | Capítulo V  
  
  
productivos, el consumo de alimento y nutrientes y su digestibilidad (Izuddin et al.,  
  
2019b). Estos autores encontraron un incremento de la GMD de un 12,17 % en el grupo  
suplementado, muy similar al 12,1 % de incremento observado en la GMD del primer  
  
periodo en este estudio. Estos resultados sugieren que la administración de posbióticos  
podría ser suficiente únicamente durante las primeras semanas para acelerar el  
  
crecimiento de los corderos que inicien el periodo de cebo con un peso menor. No  
obstante, se podría plantear incrementar el porcentaje de posbiótico añadido al pienso  
  
funcional durante las últimas semanas previas a la finalización del cebo para tratar de  
detectar diferencias en la fase final, cuando el crecimiento de los animales comienza a  
  
estabilizarse (Lawrence et al., 2012).  
  
  
Por otro lado, pese a que en todos los animales se observó una urea muy elevada, se  
  
descarta el fallo hepático o renal debido a que el resto de parámetros analíticos fueron  
normales y a que este parámetro no es un indicador válido para el diagnóstico de estas  
  
patologías debido al proceso fisiológico de reciclaje de la urea sanguínea que tiene lugar  
en el rumen (Getahun et al., 2019). La causa de estos niveles altos de urea podría ser el  
  
elevado porcentaje de proteína presente en el pienso de cebo. De hecho, en el grupo  
suplementado se encontraron unos niveles significativamente menores de urea en  
  
sangre, lo que parece indicar que estos animales poseen un mejor aprovechamiento de  
las proteínas del pienso. El metabolismo de las proteínas en rumiantes es diferente al  
  
del resto de mamíferos monogástricos, en el que los microorganismos del rumen tienen  
  
un papel fundamental para la síntesis de proteína microbiana. La utilización de  
compuestos bioactivos que modulan la microbiota intestinal podría estar contribuyendo  
  
al proceso fisiológico de metabolismo y síntesis de proteínas, optimizando los nutrientes  
de la dieta (Getahun et al., 2019; McCann et al., 2017). Los valores de la enzima fosfatasa  
  
alcalina (ALP) son mayores en los corderos suplementados. Esta enzima no se asocia a  
daño hepático en esta especie, a diferencia de otras especies, y su elevada actividad  
  
enzimática se debe a que en animales jóvenes, especialmente aquellos cuyo crecimiento  
es mayor, la ALP indica una mayor actividad osteoblástica, ya que se libera durante el  
  
remodelado óseo (Latimer, 2011). De la misma forma, tanto la enzima AST como la LDH,  
  
ambas con valores por encima de los rangos de referencia para la especie ovina, no son  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 267

Página 268:  
EXP | Capítulo V  
  
específicas para diagnóstico de patologías cuando se hallan de forma aislada, sino que  
  
sus valores se ven alterados si durante el procedimiento de toma de muestra o de  
  
obtención del suero, esta se encuentra moderadamente hemolizada (Latimer, 2011).  
  
Por último, otros de los procesos comunes en el cebadero analizado se corresponden  
con las patologías digestivas de etiología infecciosa, debido a la disbiosis que producen  
  
los factores de estrés asociados al periodo de cebo, incluido el cambio de alimentación,  
el transporte y el hacinamiento de los animales. Los procesos digestivos no se han tenido  
  
en cuenta en el diseño del estudio experimental y, dado que el producto se administra  
  
por vía oral, es muy probable que los efectos detectados también se puedan estar  
viendo beneficiados por este y tengan una repercusión sobre los indicadores  
  
productivos. En futuras líneas de investigación, se tratará de dilucidar esta cuestión y se  
incluirán los patógenos digestivos en el procedimiento de cribado de BAL beneficiosas  
  
como paso previo a la elaboración del producto posbiótico.  
  
  
El periodo de cebo es una etapa crucial para alcanzar la productividad óptima de los  
animales, pero las condiciones de intensificación conllevan situaciones de estrés para  
  
estos que pueden repercutir sobre su salud y, por ende, sobre el rendimiento productivo  
(González et al., 2016). Actualmente, el empleo de piensos funcionales enriquecidos con  
  
compuestos bioactivos es la principal alternativa para mejorar los parámetros  
  
productivos de los animales, incluso en situaciones de estrés, manteniendo tanto sus  
indicadores sanitarios en valores óptimos y respetando el bienestar animal, así como la  
  
normativa europea en materia de aditivos y regulación del uso de antimicrobianos  
(Bajagai et al., 2016). La gran ventaja que ofrecen los posbióticos con respecto a los  
  
probióticos es que no se requiere de la colonización para ejercer su acción, puesto que  
se añaden las moléculas funcionales producidas de forma óptima y además, el hecho de  
  
no incluir bacterias vivas en la preparación final facilita su conservación en condiciones  
de campo (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh et al., 2019).  
  
  
En este estudio, se realizó por primera vez una aproximación sanitaria para la  
consecución de una mejora en los parámetros productivos. El control de determinados  
  
procesos sanitarios, gracias a la utilización de un pienso funcional específicamente  
  
 268 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 269:  
 EXP | Capítulo V  
  
  
diseñado para el patógeno más común del cebadero tuvo repercusión positiva, no solo  
  
sobre los indicadores sanitarios de los corderos, sino también sobre los indicadores  
productivos, mejorando la rentabilidad de estos.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 269

Página 270:  
EXP | Capítulo V  
  
  
  
  
  
 270 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 271:  
 EXP | Capítulo V  
  
  
  
  
  
CAPÍTULO VI: Administración de posbióticos para el control de  
tuberculosis en fauna silvestre  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 271

Página 272:  
EXP | Capítulo V  
  
  
  
  
  
 272 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 273:  
 EXP | Capítulo VI  
  
INTRODUCCIÓN  
  
  
  
Importancia de la tuberculosis en todo el mundo  
  
La tuberculosis (TB) es una enfermedad crónica que afecta a un gran número de  
  
mamíferos, incluida la especie humana, y está causada por bacterias pertenecientes al  
Complejo Mycobacterium tuberculosis (MTC, Mycobacterium tuberculosis Complex),  
  
conocidas de forma general como «micobacterias». En la especie humana, hasta el año  
2019, la TB figuraba entre las primeras 10 causas de muerte en todo el mundo.  
  
Actualmente, solo en África y Asia Sudoriental continúa siendo una de las principales  
causas de muerte, donde es la octava y quinta causa principal, respectivamente (WHO  
  
Methods and Data Sources for Country-Level Causes of Death 2000-2019, 2020).  
  
  
En animales, la TB está causada por otras micobacterias pertenecientes al MTC y puede  
afectar a una gran variedad de hospedadores, como bovinos, cérvidos, caprinos,  
  
camélidos y otras especies domésticas y silvestres (Corner, 2006). La especie de  
  
micobacteria más importante en el mundo animal es M. bovis, causante de la TB bovina,  
pero también existen otras de relevancia como M. caprae. La TB bovina causa  
  
importantes pérdidas económicas en toda la cabaña ganadera mundial debido a su  
carácter crónico, que produce disminución de las producciones, y también debido a los  
  
decomisos producidos en mataderos y a la restricción en el movimiento de animales  
vivos (Ayele et al., 2004; Naranjo et al., 2008). En el caso de especies silvestres, la TB  
  
supone un problema sanitario importante en especies caza mayor y una amenaza  
importante para la conservación de especies en peligro de extinción, como el lince  
  
ibérico (Briones et al., 2000). Asimismo, está considerada como un problema de Salud  
  
Pública, puesto que la posibilidad de transmisión al ser humano hace que esta  
enfermedad sea una zoonosis. La principal vía de contagio al hombre suele ser la  
  
respiratoria mediante aerosoles, pero también se ha descrito la ingesta de material  
contaminado como vía de transmisión (De la Rua-Domenech, 2006; Luciano y Roess,  
  
2020).  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 273

Página 274:  
EXP | Capítulo VI  
  
Situación de la tuberculosis bovina en España  
  
Gracias a los programas de erradicación de la TB bovina que se han llevado a cabo en  
  
España durante las últimas décadas, el porcentaje de rebaños positivos se ha reducido  
del 20 % en los años 70 a menos del 2 % en los últimos años (Plan de Actuación Sobre  
  
Tuberculosis En Especies Silvestres, 2017). No obstante, España es el tercer país de la UE,  
por detrás de Reino Unido e Irlanda, en prevalencia de esta enfermedad en la cabaña  
  
ganadera. Además, la situación epidemiológica de la TB bovina en España es variable  
entre las diferentes localizaciones geográficas: las regiones insulares se encuentran  
  
prácticamente libres, la zona norte y este tienen prevalencias relativamente bajas y las  
regiones del suroeste son las más problemáticas, con zonas de alta prevalencia (Informe  
  
Final Técnico-Financiero Programa Nacional de La Tuberculosis Bovina Año 2019, 2019)  
(Figura 6.1). Estos datos y algunos estudios realizados en España y en otros países  
  
demuestran que la TB bovina continúa siendo muy prevalentes en zonas con alta  
  
densidad de hospedadores silvestres (Corner, 2006; Naranjo et al., 2008).  
  
  
  
  
  
 Figura 6.1. Mapa epidemiológico de la tuberculosis bovina en España, prevalencia por comarcas, año  
  
 2019. Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España.  
  
  
  
 274 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 275:  
 EXP | Capítulo VI  
  
El jabalí como reservorio silvestre principal de M. bovis en el suroeste de la Península  
  
Ibérica  
  
En la Península Ibérica, los jabalíes; los cérvidos, como los ciervos o los gamos; y los  
tejones, actúan como reservorios silvestres de M. bovis y complican los programas de  
  
erradicación de la enfermedad en zonas con altas prevalencias. De hecho, el Ministerio  
de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España también clasifica las  
  
diferentes comarcas o unidades veterinarias en función del riesgo en fauna silvestre,  
considerando como especial riesgo (alto) la zona suroeste de la Península Ibérica (Real  
  
Decreto 138/2020, de 28 de Enero, por el que se establece la normativa básica en  
materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio  
  
de la tuberculosis (Complejo Mycobacterium Tuberculosis)., 2020) .  
  
  
El jabalí es el reservorio principal de la TB en ecosistemas mediterráneos del sur de  
  
Portugal y del suroeste de España, con prevalencias que pueden llegar a superar el 50%  
(Risco et al., 2019). Los factores de riesgo que pueden predisponer a los jabalíes a  
  
mostrar estas prevalencias tan altas han sido estudiados en profundidad durante los  
últimos años e incluyen las altas densidades poblacionales, la edad y las coinfecciones  
  
con otros patógenos (Gortázar et al., 2006; Risco et al., 2014; Vicente et al., 2007).  
  
  
El jabalí es una especie animal altamente susceptible a la TB, que presenta de forma  
frecuente lesiones generalizadas de curso crónico, pese a no mostrar signos clínicos de  
  
la enfermedad. Muchos de estos animales con lesiones generalizadas son  
  
«superexcretores», que excretan la bacteria por una o varias rutas (oronasal, fecal e  
incluso urinaria), aumentando su probabilidad de diseminación y manteniendo latente  
  
la enfermedad en el sistema multihospedador de estos ecosistemas (Risco et al., 2019;  
Santos et al., 2015).  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 275

Página 276:  
EXP | Capítulo VI  
  
Medidas de control de tuberculosis en animales silvestres  
  
La erradicación de una enfermedad multihospedador, es decir, que afecta como  
  
acabamos de ver a un gran número de hospedadores diferentes, requiere que se lleven  
a cabo medidas de manejo en todos los hospedadores que contribuyan  
  
significativamente a su mantenimiento (Byrne et al., 2019; García-Jiménez et al., 2013).  
Debido a la situación epidemiológica que existe en España con relación al  
  
mantenimiento de altas prevalencias de TB bovina en zonas con altas densidades de  
animales silvestres, es necesario llevar a cabo medidas de prevención y control en estos  
  
reservorios para lograr una eliminación completa de esta enfermedad (Byrne et al.,  
2019; Risco et al., 2018).  
  
  
El Plan de Actuación sobre TB en Especies Silvestres indica que, para las zonas con  
  
prevalencias bajas, no es necesaria una intervención más allá de la vigilancia poblacional  
  
y sanitaria. En cambio, en las zonas con riesgo especial, se requieren medidas de lucha  
encaminadas a controlar la enfermedad en la fauna silvestre que complementen el  
  
Programa Nacional de Erradicación de la TB en España (Plan de Actuación Sobre  
Tuberculosis En Especies Silvestres, 2017). Por otro lado, el Real Decreto 138/2020  
  
establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies  
cinegéticas que puedan actuar como reservorios de la TB y establece una clasificación  
  
administrativa de las explotaciones y los terrenos cinegéticos, que se muestra en la  
Figura 6.2.  
  
  
  
  
  
Figura 6.2. Categorización administrativa de las explotaciones y los terrenos cinegéticos. Fuente: Guía de  
Aplicación para el sector cinegético del Real Decreto 138/2020, por el que se establece la normativa básica  
en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la  
tuberculosis.  
  
 276 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 277:  
 EXP | Capítulo VI  
  
  
Las medidas de control de TB en reservorios silvestres incluyen, primer lugar, las  
  
acciones preventivas y las medidas de bioseguridad como las medidas de gestión en  
granjas cinegéticas y de traslado de los animales, así como la utilización de barreras  
  
como vallados y la gestión de los residuos de caza, entre otros (Aranaz et al., 2004;  
Gortazar et al., 2015; Plan de Actuación Sobre Tuberculosis En Especies Silvestres, 2017).  
  
Una de las principales medidas de lucha es el control poblacional mediante reducción  
  
del aporte de alimento o mediante sacrificios aleatorios o eliminación selectiva de  
jabalíes (Aranaz et al., 2004; García-Jiménez et al., 2013; Gortazar et al., 2015; Naranjo  
  
et al., 2008). En cuanto a la inmunización de los animales que pueden actuar como  
reservorios, existen diversos estudios en jabalíes sobre la vacunación oral o parenteral  
  
con M. bovis inactivado y con M. bovis BCG (Beltrán-Beck et al., 2012; Buddle et al.,  
2018; Díez-Delgado et al., 2018). Por otro lado, otras alternativas más recientes e  
  
innovadoras incluyen la potenciación del sistema inmunitario mediante suplementación  
con vitamina D3 (Risco et al., 2016) y la estrategia de actuar frente a las infecciones  
  
concomitantes, como la vacunación de circovirus porcino (Risco et al., 2018).  
  
  
En la mayoría de los casos, además de ser técnica y económicamente inviable, la  
  
intervención en un ecosistema natural, en especial cuando se trata de control  
poblacional, puede resultar controvertida para algunos sectores (Aranaz et al., 2004;  
  
Gortazar et al., 2015; Naranjo et al., 2008). Por ello, las estrategias disponibles en la  
actualidad son cada vez más limitadas y son necesarias medidas alternativas que sean  
  
económicas, factibles y lo suficientemente efectivas.  
  
  
  
Suplementación con posbióticos como una alternativa novedosa para el control de la  
  
TB  
  
En este sentido, las bacterias beneficiosas como las BAL surgen como una alternativa  
ecológica y sostenible en la prevención de la transmisión y diseminación de  
  
enfermedades, incluida la TB en poblaciones silvestres (Sivaraj et al., 2018; Stedman et  
al., 2018). Como se ha comentado previamente a lo largo de esta tesis doctoral, el  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 277

Página 278:  
EXP | Capítulo VI  
  
proceso de elaboración de los posbióticos consiste en la optimización de la producción  
  
de subproductos metabólicos en condiciones controladas de cultivo y fermentación de  
  
microorganismos beneficiosos, incluyendo tanto los compuestos secretados como los  
componentes de la pared celular liberados después de la lisis bacteriana (Salminen et  
  
al., 2021). Estas moléculas pueden mejorar la salud del hospedador debido a su actividad  
antiinflamatoria, inmunomoduladora y antimicrobiana (Aguilar-Toalá et al., 2018; Wegh  
  
et al., 2019).  
  
  
En los ensayos in vitro descritos en el bloque I de esta tesis doctoral se describen  
diferentes moléculas de BAL con capacidad para antagonizar la supervivencia de las  
  
micobacterias mediante mecanismos sinérgicos que incluyen la producción de  
metabolitos antimicrobianos y acidificación del pH, y también mediante su influencia en  
  
el proceso de fagocitosis por las células sanguíneas. Algunos aislados de BAL tienen  
  
capacidad para producir diferentes tipos de bacteriocinas y otros metabolitos  
antimicrobianos como ácidos orgánicos, etanol o dióxido de carbono, además de varios  
  
compuestos solubles y componentes de la pared celular, como exopolisacáridos o los  
ácidos teicoico y lipoteicoico (WTA, LTA), que podrían actuar como agentes  
  
antimicobacterianos e inmunomoduladores, respectivamente, protegiendo al  
hospedador frente a la diseminación de la micobacteria por el organismo.  
  
  
Por otro lado, algunos estudios sugieren que la utilización de otras moléculas derivadas  
  
de bacterias diferentes a las BAL, como las micobacterias no productoras de TB, pueden  
  
inducir una respuesta inmunitaria beneficiosa confiriendo protección contra la  
diseminación de la enfermedad (Cardona et al., 2016; Shah et al., 2019; Von Reyn et al.,  
  
2010).  
  
  
En fauna silvestre, las estrategias basadas en el manejo y la modulación de la microbiota,  
así como la utilización de los microorganismos que forman parte de ella, por ejemplo  
  
mediante la administración de productos posbióticos, se han propuesto recientemente  
como un método relativamente natural y sostenible para hacer frente a algunas  
  
enfermedades que afectan a las poblaciones silvestres de todo el mundo, incluida la TB  
  
  
 278 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 279:  
 EXP | Capítulo VI  
  
(Harrison et al., 2020; McKenzie et al., 2018; Stedman et al., 2020). Sin embargo y pese  
  
a la importancia de la TB en estas poblaciones, no se dispone de estudios realizados  
  
directamente en poblaciones silvestres que confirmen la utilidad real de estas nuevas  
alternativas.  
  
  
Por ello, el objetivo general de este capítulo fue evaluar el efecto de la suplementación  
  
oral con metabolitos antimicobacterianos posbióticos producidos por bacterias  
beneficiosas sobre el desarrollo de la TB en poblaciones de jabalíes.  
  
  
Los objetivos específicos son los siguientes:  
  
  
 - Diseñar y elaborar un producto posbiótico a partir de los compuestos bioactivos  
  
 de una selección de bacterias beneficiosas que pueda contribuir al control de la  
  
 TB.  
  
  
 - Analizar el efecto de la administración del producto añadido al pienso durante la  
 época de suplementación llevada a cabo en poblaciones de jabalíes sobre la  
  
 situación epidemiológica de la TB  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 279

Página 280:  
 EXP | Capítulo VI  
  
 MÉTODO  
  
  
  
1. Elaboración del producto posbiótico  
  
 En función de la caracterización de las BAL descrita a lo largo de esta tesis doctoral, se  
  
 seleccionó una combinación de moléculas derivadas de estas que pueda contribuir al  
 control de la TB en diferentes poblaciones de jabalíes. Las BAL seleccionadas están  
  
 depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y fueron utilizada para  
  
 desarrollar un producto posbiótico cuya composición está protegida por secreto  
 industrial.  
  
  
 Además, el proceso de selección y caracterización de bacterias que potencialmente  
  
 tienen utilidad como posbióticos y que está descrito en esta tesis doctoral, permitió  
 extenderEl contenidolos procedimientosdea otrasestabacteriasseccióndiferentesestáde BAL, cuyas moléculas  
  
 pueden actuar en sinergia con las ya mencionadas. Se incluyeron en este nuevo sujeto a protección.  
 producto posbiótico los extractos proteicos derivados de otras bacterias diferentes a  
  
 estas y que están protegidos mediante la patente (OEP/202030658).  
  
  
 El producto final, presentado como gránulos desecados que se añaden al pienso animal  
  
 sin alterar los patrones dietéticos, está obtenido a partir de los metabolitos generados  
 mediante la fermentación de los cultivos de los microorganismos seleccionados. Estos  
  
 procedimientos han sido descritos en el capítulo V de esta tesis doctoral y su fabricación  
 se realiza conforme al reglamento (UE) 2017/1017 (European Commission, 2017).  
  
  
  
2. Diseño del estudio experimental: selección de las fincas y elaboración de los grupos  
 de estudio  
  
 Se seleccionaron 20 fincas cinegéticas, ubicadas en el centro-oeste de España (Figura  
 6.3), que están dedicadas principalmente a la gestión y al manejo de las poblaciones  
  
 cinegéticas y que disponen de vallado perimetral para evitar tanto la dispersión de los  
  
 jabalíes como la entrada de otros animales, por lo que estas fincas están categorizadas  
  
 280 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 281:  
 EXP | Capítulo VI  
  
como tipo II según el RD 138/2020. En todas estas fincas se dispone de información  
  
detallada sobre el historial epidemiológico de la TB, incluyendo prevalencia de lesiones  
  
compatibles con TB y serologías de anticuerpos frente a esta, prevalencia de la infección  
en otros ungulados como ciervos, así como datos relativos a la densidad de jabalíes y  
  
otros ungulados.  
  
  
La suplementación llevada a cabo en todas las fincas se realiza de la misma manera,  
aportando el alimento durante al menos 6 meses al año mediante comederos selectivos  
  
que solo permiten la entrada de jabalíes. La realización del estudio se llevó a cabo  
durante el periodo comprendido entre el 1 de julio y el 1 de septiembre, debido a que  
  
el verano es la época del año en la que existe una mayor escasez de alimento natural en  
estas zonas de España, lo que hace necesario el aporte de alimento suplementario y  
  
asegura que el porcentaje de jabalíes que acuden a los comederos es máximo.  
  
  
  
  
  
 Figura 6.3. Localización geográfica de las 20 fincas incluidas en el estudio  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 281

Página 282:  
 EXP | Capítulo VI  
  
 Elaboración de los grupos  
  
  
 En todos los casos se administró el mismo pienso estándar (Jabalíes Mantenimiento  
 Reforzado, INALSA S.A.) y los jabalíes no tuvieron acceso a otra fuente de alimentación  
  
 complementaria durante el periodo de realización del estudio. Los animales de las 15  
 fincas suplementadas que conformaron el grupo «posbiótico» recibieron el pienso  
  
 mencionado con la adición de 3 gramos por kilogramo del producto posbiótico durante  
 30 días consecutivos, mientras que las 5 fincas del grupo «control» recibieron la misma  
  
 pauta con el mismo pienso, pero sin la adición del producto.  
  
  
  
3. Recogida de datos y muestras para la valoración de la situación epidemiológica con  
  
 relación a la TB  
  
 Se llevó a cabo una valoración de la situación epidemiológica de la TB en las poblaciones  
  
 de jabalíes de todas las fincas incluidas en el estudio, tanto antes del comienzo de este,  
  
 para evaluar la homogeneidad de las fincas; como después de la suplementación, para  
 valorar el efecto del producto. La recogida de datos se llevó a cabo durante las acciones  
  
 cinegéticas llevadas a cabo en la temporada de octubre de 2017 a febrero de 2018, antes  
 de la suplementación; y de octubre de 2018 a febrero de 2019, después de la  
  
 suplementación.  
  
  
 Estimación de edad y evaluación macroscópica de las lesiones  
  
  
 Para evitar sesgos en la recopilación de los datos, se seleccionaron aleatoriamente al  
  
 menos 10 jabalíes por montería, si el número total de animales abatidos lo permitía. Los  
 jabalíes se categorizaron por edad en función de su patrón de erupción dental,  
  
 considerando jóvenes los animales de edades comprendidas entre 6 a 12 meses y  
 adultos los jabalíes de más de 12 meses (Boitani, 1992; Risco et al., 2018). Se realizó  
  
 una inspección post-mortem completa de los jabalíes, que consistió en la valoración  
 macroscópica de los nódulos linfáticos submandibulares, retrofaríngeos,  
  
 traqueobronquiales, mediastínicos, gastrohepáticos y mesentéricos; así como las  
  
  
 282 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 283:  
 EXP | Capítulo VI  
  
cavidades y órganos torácicos y abdominales, pulmones, hígado, bazo y aparato  
  
digestivo, principalmente. Los jabalíes con lesiones compatibles con TB se clasificaron  
  
según la gravedad de estas en dos tipos de patrones, denominando «localizado» cuando  
afecte solo a los ganglios linfáticos cefálicos o mesentéricos y «generalizado» al que  
  
afecta al menos a dos órganos o ganglios linfáticos diferentes. El diagnóstico de TB  
basado en la presencia de lesiones macroscópicas post-mortem en las canales es la  
  
inspección oficial reconocida por las Autoridades Sanitarias españolas y se considera un  
método adecuado para estimar la prevalencia de TB (García-Jiménez et al., 2013).  
  
  
Toma de muestras sanguíneas y análisis serológico  
  
  
Además, se realizó un estudio serológico en 14 fincas suplementadas y 4 fincas control  
  
incluidas en el estudio con el fin de detectar anticuerpos contra M. bovis. La sangre de  
  
los jabalíes seleccionados fue obtenida mediante punción del seno cavernoso  
retroorbital, y fue inmediatamente refrigerada a 4 ºC y transportada al laboratorio,  
  
donde se extrajeron los sueros por centrifugación a 3000 r.p.m. durante cinco minutos  
y se mantuvieron a -21 ºC hasta su procesamiento. Para detectar la presencia de  
  
anticuerpos contra M. bovis en los sueros sanguíneos se utilizó un kit ELISA comercial  
que se encuentra validado para muestras de jabalí (INGEZIM TB PORCINA, INGENASA,  
  
Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.  
  
  
El diseño experimental descrito permite monitorizar la situación epidemiológica de la  
  
TB mediante la evaluación de la presencia y la gravedad de lesiones macroscópicas  
compatibles con TB y seropositividad frente a M. bovis, en fincas control y  
  
suplementadas, antes y después de la adición del posbiótico. Por este motivo, este  
diseño se considera útil para valorar el efecto del producto sobre la situación  
  
epidemiológica con relación a la TB en estas poblaciones de jabalíes.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 283

Página 284:  
 EXP | Capítulo VI  
  
4. Análisis estadístico  
  
 Los parámetros utilizados para monitorizar la evolución de la TB en los dos grupos de  
  
 estudio son los comentados anteriormente e incluyen el porcentaje de jabalíes con  
 lesiones compatibles con TB, el porcentaje de animales con lesiones generalizadas y la  
  
 seroprevalencia de TB. Todos los parámetros se compararon entre las poblaciones de  
 control y suplementadas entre las dos temporadas de caza muestreadas, para evaluar  
  
 las diferencias antes y después de la suplementación con el posbiótico. También se  
 analizaron las diferencias dentro de cada grupo para evaluar el efecto de los posbióticos  
  
 en las poblaciones suplementadas y para detectar posibles variaciones de la situación  
 de la TB en las poblaciones de control. Las comparaciones se realizaron utilizando la  
  
 prueba de Chi-cuadrado considerando un 5% de significancia.  
  
  
 Por otro lado, las diferencias dentro de cada grupo se analizaron más a fondo dividiendo  
  
 la población suplementada en dos subconjuntos cribados por edad. Esto nos permitió  
 distinguir entre animales con infecciones relativamente recientes, es decir, los animales  
  
 jóvenes de entre 6 y 12 meses, y evitar el sesgo por la presencia de lesiones crónicas y  
 la seropositividad en animales que puedan llevar desarrollando la enfermedad durante  
  
 mucho tiempo, que es más probable que ocurra en animales adultos mayores de 12  
 meses. Este parámetro permite el cálculo de la incidencia de la enfermedad, es decir, la  
  
 tasa de nuevos contagios, un parámetro muy interesante cuando se trata de valorar el  
 efecto del producto sobre una enfermedad crónica que ya estaba presente en la  
  
 población antes de la realización del estudio.  
  
  
  
  
  
 284 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 285:  
 EXP | Capítulo VI  
  
Figura resumen del método  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 285

Página 286:  
EXP | Capítulo VI  
  
RESULTADOS  
  
  
  
El porcentaje de lesiones compatibles con TB fue similar en ambos grupos antes de la  
suplementación y disminuyó en las poblaciones de jabalíes suplementadas con el  
  
posbiótico  
  
El número final de jabalíes analizados y el resultado de las evaluaciones patológicas  
  
durante las dos temporadas del estudio se puede encontrar en el Apéndice IV.  
  
  
Durante el periodo de realización del estudio, un total de 3449 jabalíes fueron abatidos  
  
en monterías durante las 51 acciones cinegéticas realizadas en las 20 fincas del estudio.  
Se observaron lesiones macroscópicas compatibles con TB en el 35,69 % de los 409  
  
jabalíes inspeccionados. Entre los animales afectados con lesiones compatibles con TB,  
32 jabalíes mostraron lesiones en múltiples órganos, lo que se corresponde con un 27,82  
  
% de patrones generalizados de TB. No obstante, no fue posible la realización de una  
evaluación patológica completa en 31 jabalíes que presentaban lesiones por falta de  
  
ciertos órganos en el momento de la inspección, debido a disparos, mordeduras de  
perro, etc; o porque no fueron eviscerados, debido a la decisión de decomiso total por  
  
parte del veterinario oficial por presentar lesiones en nódulos linfáticos cefálicos.  
  
  
Los resultados obtenidos en el estudio anatomopatológico de los dos grupos del estudio  
  
se resumen en la Tabla 6.1. El porcentaje de lesiones compatibles con TB en la  
temporada previa a la suplementación fue similar en ambos grupos (47,45 % vs 39,35  
  
%, χ2 = 0,84, P = 0,35). Sin embargo, en la temporada posterior a la suplementación,  
este porcentaje fue significativamente mayor en los jabalíes del grupo control que en  
  
los jabalíes que fueron suplementados (45,23 % vs 24,84 %, χ2 = 5,68, P = 0,017). La  
proporción de patrones generalizados no mostró diferencias estadísticamente  
  
significativas entre los grupos a lo largo de la experiencia (25 % vs 26,41 % en la  
  
temporada previa a la suplementación, χ2 = 0,40, P = 0,52 y 16,67 % vs 50 % en la  
temporada posterior a la suplementación, χ2 = 1,99, P = 0,32).  
  
  
 286 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 287:  
 EXP | Capítulo VI  
  
En cuanto a las comparaciones intragrupo, los animales pertenecientes al grupo control  
  
no mostraron diferencias significativas entre las dos temporadas cinegéticas, ni en el  
  
porcentaje de lesiones, ni en la proporción de patrones generalizados. Por el contrario,  
se observó un menor porcentaje de lesiones compatibles con TB en los jabalíes  
  
suplementados tras la administración del posbiótico en comparación con la temporada  
previa a la suplementación (24,84 % Vs 39,35 %, χ2 = 6,7 / 96, P = 0,01), pero no se  
  
detectaron diferencias en el porcentaje de patrones generalizados (41,18% vs 29,51%,  
χ2 = 0,38, valor de p = 0,53) entre el mismo grupo de animales.  
  
  
  
La seroprevalencia de TB fue similar en ambos grupos antes de la suplementación y  
disminuyó en el grupo suplementado  
  
Los resultados obtenidos en la prueba serológica revelaron que el 35,18 % de los sueros  
analizados contenían anticuerpos contra M. bovis. El porcentaje de jabalíes  
  
seropositivos fue similar en ambos grupos de estudio en la temporada previa a la  
  
suplementación (45,59 % vs 35,48 % χ2 = 1,63, P = 0,2). Sin embargo, después de la  
suplementación, la seropositividad fue significativamente inferior en el grupo  
suplementado (48,61 % vs 22,73 %, χ2 = 17,26, P = 3,24 x 10-5).  
  
  
Al igual que con el parámetro anterior, mientras que la seropositividad no cambió a lo  
largo de la experiencia en el grupo control (45,59 % vs 48,61 %, χ2 = 0,26, P = 0,6),  
  
observamos una reducción en el porcentaje de animales seropositivos en las fincas  
suplementadas (35,48 % vs 22,73 %, χ2 = 5,48, P = 0,019).  
  
  
Los resultados obtenidos en el estudio anatomopatológico de los dos grupos del estudio  
se resumen en la Tabla 6.1.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 287

Página 288:  
EXP | Capítulo VI  
  
 Tabla 6.1. Resultados de la evaluación patológica y del estudio serológico de los dos grupos de estudio  
  
 en las temporadas previa y posterior a la suplementación  
  
  
 Grupo Pre-suplementacióna Pos-suplementaciónb  
  
 Control Lesiones Jabalíes 28 19  
 compatibles positivos (%) (47,45 %) (45,23 %)  
 con TB Total  
 59 42  
 inspeccionado  
  
 Patrón Jabalíes 5 2  
  
 generalizado positivos (%) (25 %) (16,67 %)  
  
 Total  
 25 12  
 inspeccionado  
  
 Seropositividad Jabalíes 31 35  
 a TB positivos (%) (45,59 %) (48,61 %)  
  
 Total  
 68 72  
 inspeccionado  
  
 Suplementado Lesiones Jabalíes 61 38  
 compatibles positivos (%) (39,35 %) (24,84 %)  
 con TB Total  
 155 153  
 inspeccionado  
  
 Patrón Jabalíes 18 7  
  
 generalizado positivos (%) (29,51 %) (41,18 %) \*  
  
 Total  
 61 17  
 inspeccionado  
  
 Seropositividad Jabalíes 55 35  
 a TB positivos (%) (35,48 %) (22,73 %) \*\*  
  
 Total  
 155 154  
 inspeccionado  
  
 a Temporada pre-suplementación: de octubre 2017 a febrero 2018  
 b Temporada pos-suplementación: de octubre 2018 a febrero 2019  
 \*Diferencias significativas entre grupos (P = 0,017) e intragrupo (P = 0,01)  
 \*\*Diferencias significativas entre grupos (P = 3,24 x 10-5) e intragrupo (P = 0,019)  
  
  
  
  
  
 288 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 289:  
 EXP | Capítulo VI  
  
El porcentaje de lesiones compatibles y la seroprevalencia de TB correspondiente a las  
  
nuevas infecciones disminuyeron en el grupo suplementado  
  
Las comparaciones dentro de cada grupo se analizaron en función de la edad de los  
animales divididos en dos subclases de edad, para evitar malinterpretar la presencia de  
  
lesiones crónicas en animales adultos que pudieron infectarse antes del inicio de la  
experiencia. El porcentaje de animales jóvenes infectados se corresponde con la  
  
incidencia de la enfermedad o la tasa de nuevos contagios.  
  
  
Los parámetros de TB obtenidos en cada clase de edad (jóvenes y adultos) de la  
población suplementada se resumen en la Tabla 6.2. En los adultos, no se detectaron  
  
diferencias significativas al comparar los parámetros de TB en las temporadas de pre y  
pos-suplementación. Sin embargo, en los animales jóvenes del grupo suplementado, el  
  
porcentaje de lesiones compatibles con TB (χ2 = 9,9, P = 0,002) y la presencia de  
  
anticuerpos frente a M. bovis (χ2 = 6,64, P = 0,009) disminuyeron de forma significativa  
después de la suplementación.  
  
  
  
  
  
 Figura 6.4. Animal adulto junto a varios animales jóvenes (rayones)  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 289

Página 290:  
EXP | Capítulo VI  
  
  
  
 Tabla 6.2. Resultados por grupos de edad de la evaluación patológica y el estudio serológico del grupo  
 suplementado antes y después de la suplementación con el posbiótico  
  
  
 Pre-suplementación a Pos-suplementación b  
  
 Jabalíes Lesiones Jabalíes positivos 17 12  
 jóvenes compatibles con (%) (47,22 %) (16,66 %) \*  
 TB Total 36 72  
 (6-12 inspeccionado  
 meses) Patrón Jabalíes positivos 9 3  
 generalizado (%) (52,94 %) (37,50 %)  
  
 Total 17 8  
 inspeccionado  
  
 Seropositividad Jabalíes positivos 7 3  
  
 a TB (%) (26,92 %) (4,90 %) \*\*  
  
 Total 26 61  
 inspeccionado  
  
 Jabalíes Lesiones Jabalíes positivos 44 26  
 adultos compatibles con (%) (36,97 %) (32,09 %)  
 TB Total 119 81  
 (>12 inspeccionado  
 meses) Patrón Jabalíes positivos 9 4  
 generalizado (%) (20,45 %) (44,44 %)  
  
 Total 44 9  
 inspeccionado  
  
 Seropositividad Jabalíes positivos 45 25  
  
 a TB (%) (37,81 %) (33,78 %)  
  
 Total 119 74  
 inspeccionado  
  
 a Temporada pre-suplementación: de octubre 2017 a febrero 2018  
 b Temporada pos-suplementación: de octubre 2018 a febrero 2019  
 \*Diferencias significativas (P = 0,002)  
  
 \*\*Diferencias significativas (P = 0,009)  
  
  
  
  
  
 290 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 291:  
 EXP | Capítulo VI  
  
DISCUSIÓN  
  
  
La utilización de microorganismos beneficiosos se ha propuesto en los últimos años  
como una nueva herramienta para el control de enfermedades que afectan a la fauna  
  
silvestre, incluida la TB (Harrison et al., 2020; McKenzie et al., 2018). Existen diversas  
estrategias para elaborar productos a partir de microorganismos beneficiosos, que se  
  
denominan en función de las características del producto final y que se engloban de  
  
forma general bajo el término de «piensos funcionales» cuando se incorporan a la  
alimentación animal. Los piensos funcionales son aquellos que incorporan compuestos  
  
bioactivos para mejorar determinados parámetros más allá de lo que cabría esperar por  
su simple potencial nutricional (Velasco et al., 2006). Por otro lado, los compuestos  
  
bioactivos producidos a partir de microorganismos beneficiosos que se encuentran de  
forma más frecuente en el mercado son los probióticos y los simbióticos, cuyos términos  
  
han sido definidos en capítulos previos de esta tesis doctoral. Los posbióticos son  
productos novedosos cuya definición ha alcanzado un consenso en la comunidad  
  
científica muy recientemente (Salminen et al., 2021). Pese a que se han propuesto por  
algunos autores como una estrategia potencial para el control de enfermedades en  
  
humanos, animales de compañía y en ganadería, en el campo de la fauna silvestre es un  
  
concepto aún desconocido.  
  
  
Los resultados de las pruebas in vitro llevadas a cabo en el capítulo I de esta tesis  
doctoral, así como otros estudios, sugieren un potencial efecto saludable de los  
  
componentes de microorganismos, especialmente BAL, para el control de la bacteria M.  
bovis, el agente causal de la TB (Stedman et al., 2018). No obstante, este es el primer  
  
estudio que diseña y evalúa la eficacia de un producto de estas características. Los  
resultados de este capítulo sugieren un efecto beneficioso del producto posbiótico  
  
sobre el desarrollo de la TB en poblaciones de jabalíes expuestos de forma natural a la  
  
infección.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 291

Página 292:  
EXP | Capítulo VI  
  
Este estudio de campo se considera correctamente validado para el objetivo propuesto,  
  
ya que se han cumplido los requisitos para su justificación. En primer lugar, al tratarse  
  
de infecciones naturales, es importante garantizar que todos los grupos de fincas parten  
de la misma situación epidemiológica. En ese sentido, no se encontraron diferencias  
  
entre grupos antes de la experiencia. Por el contrario, mientras que la situación  
epidemiológica con relación a la TB en el grupo control permaneció estable, se  
  
obtuvieron diferencias en los parámetros analizados después de la realización del  
estudio en el grupo suplementado. Concretamente, el porcentaje de lesiones  
  
compatibles con TB y la presencia de anticuerpos frente a M. bovis disminuyeron  
respectivamente en un 36,87 % y 35,94 % después de la suplementación oral con el  
  
producto posbiótico en las poblaciones suplementadas. Además, estos parámetros  
fueron significativamente más bajos en las fincas suplementadas en comparación con  
  
las fincas control después de la suplementación, lo que supone una reducción del 45,08  
  
% y 53,24 %, respectivamente. Estos hallazgos sugieren un efecto positivo de la  
suplementación sobre la situación de la TB con resultados comparables a otras medidas  
  
de control que han sido utilizadas previamente.  
  
  
  
Las principales estrategias para controlar la transmisión de TB entre la fauna silvestre y  
la cabaña ganadera incluyen medidas preventivas y de bioseguridad, control poblacional  
  
y la inmunización mediante vacunación (Che’Amat et al., 2016). Algunas de las  
estrategias de vacunación en poblaciones de jabalíes llevadas a cabo en condiciones  
  
similares a las de este estudio arrojaron resultados comparables. Las vacunas  
  
inactivadas por calor redujeron las lesiones compatibles con TB en un 34 % (Díez-  
Delgado et al., 2018) y en un 43,3 % (Garrido et al., 2011) cuando se administraron por  
  
vía oral y en un 43,3 % (Garrido et al., 2011) y en un 66 % (Díez-Delgado et al., 2017)  
cuando se administraron por vía parenteral. Por otro lado, la vacunación oral con BCG  
  
confiere una protección variable (Díez-Delgado et al., 2018, 2019; Garrido et al., 2011).  
Otros estudios que tenían un enfoque similar arrojaron resultados muy diferentes entre  
  
sí. Mientras que el control poblacional mediante eliminación no selectiva de jabalíes  
disminuyó el porcentaje de lesiones compatibles con TB y los anticuerpos frente a M.  
  
bovis en un 21-48% (Boadella et al., 2012), la eliminación selectiva de animales no logró  
  
 292 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 293:  
 EXP | Capítulo VI  
  
reducir la seroprevalencia de TB (Che’Amat et al., 2016). De hecho, algunos estudios  
  
sugieren que las estrategias de eliminación deben implementarse conjuntamente con  
  
otras medidas complementarias para observar un efecto significativo sobre la  
prevalencia de la TB (García-Jiménez et al., 2013; Mentaberre et al., 2014). En esta  
  
experiencia, el porcentaje de lesiones generalizadas se mantuvo estable en ambos  
grupos antes y después de la suplementación, a diferencia de otros estudios similares  
  
(Risco et al., 2016, 2018).  
  
  
  
Al explorar el efecto de los posbióticos en animales jóvenes para distinguir entre  
infecciones relativamente recientes con respecto a infecciones crónicas, observamos  
  
que el porcentaje de lesiones compatibles con TB y de anticuerpos frente a M. bovis en  
las nuevas infecciones disminuyó en un 64,72 % y un 81,80 % respectivamente después  
  
de la suplementación. Esto sugiere que la administración de posbióticos podría  
  
contribuir a una disminución en el número de nuevos contagios, es decir, la reducir la  
incidencia de la enfermedad. Curiosamente, estas diferencias no se detectaron en  
  
adultos, posiblemente debido al carácter crónico de la TB, ya que estos animales podrían  
haberse infectado antes del inicio de la experiencia y continuar desarrollando la  
  
enfermedad en el momento de la recogida de muestras y datos. Para evaluar si puede  
alcanzarse un efecto similar sobre los animales adultos, habría que repetir esta pauta de  
  
administración en los periodos de suplementación de los próximos años.  
  
  
  
El suplemento diseñado en este estudio contiene una combinación de metabolitos y  
  
componentes de la pared microbiana de microorganismos beneficiosos que han sido  
transformados durante el propio proceso de producción y que se han descrito en  
  
capítulos previos de esta tesis doctoral, aunque la composición exacta del mismo está  
protegida por secreto industrial. Por tanto, el mecanismo de acción del posbiótico que  
  
se propone es complejo y requiere de la actuación sinérgica de las moléculas que se  
incluyen en el producto, lo que lo hace más completo y efectivo. Los metabolitos  
  
posbióticos podrían contener la propagación de la enfermedad en los animales  
infectados por M. bovis a través de dos efectos principalmente: por un lado, su efecto  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 293

Página 294:  
EXP | Capítulo VI  
  
antimicobacteriano reduciría la viabilidad de la bacteria y, por otro, su interacción con  
  
el sistema inmunitario de los animales potenciaría sus propios mecanismos de defensa.  
  
Debido a sus propiedades antimicrobianas, los posbióticos administrados por vía oral  
podrían disminuir la carga micobacteriana en el tracto gastrointestinal (Sosunov et al.,  
  
2007; Stedman et al., 2018), reduciendo así la transmisión del contagio indirecto fecal-  
oral, lo que se considera de gran importancia epidemiológica en jabalíes puesto que la  
  
excreción fecal es una de las principales vías de diseminación de M. bovis en esta especie  
(Barasona et al., 2017; Santos et al., 2015). Por otro lado, la interacción de las moléculas  
  
de las BAL con las células inmunitarias del hospedador, pueden desencadenar una  
respuesta inmunitaria favorable para que el animal pueda hacer frente a la infección por  
  
M. bovis. La respuesta fagocítica del hospedador frente a las micobacterias es crucial  
para la supervivencia de las bacterias en el organismo y el desarrollo de la enfermedad  
  
(de Martino et al., 2019), por lo que la utilización de moléculas de BAL que influyan en  
  
la capacidad de los fagocitos podría estar contribuyendo al control de la TB en estas  
poblaciones. Los metabolitos antimicobacterianos y las moléculas inmunomoduladoras  
  
de las BAL aisladas, han sido descritos en profundidad en el bloque I de esta tesis  
doctoral. Por último, algunos metabolitos de las BAL y los extractos proteicos de otras  
  
bacterias que pueden utilizarse como posbióticos pueden aumentan los niveles de  
citoquinas Th1 y disminuir las citoquinas asociadas a Th2 (Aguilar-Toalá et al., 2018;  
  
Wegh et al., 2019), lo que también podría ser positivo para un mayor control del  
desarrollo de la TB bovina en los jabalíes infectados, ya que la respuesta Th1 es  
  
fundamental para este propósito (de Martino et al., 2019; Welsh et al., 2005). No  
  
obstante, estos mecanismos no han sido evaluados de forma directa en este estudio por  
la dificultad del diseño adecuado para este planteamiento en infecciones naturales y,  
  
más concretamente, en poblaciones silvestres. Por ello, en estudios futuros en modelos  
experimentales se llevará a cabo una caracterización completa del perfil  
  
inmunomodulador y de citoquinas de la suplementación con el producto posbiótico para  
dilucidar estas cuestiones, que permitirá optimizar el desarrollo de nuevos productos.  
  
La erradicación de una enfermedad transmisible en un complejo multihospedador  
requiere que se lleven a cabo medidas de control en todos sus reservorios (Byrne et al.,  
  
2019; García-Jiménez et al., 2013). Debido a la situación epidemiológica que existe en  
  
 294 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 295:  
 EXP | Capítulo VI  
  
España con relación al mantenimiento de altas prevalencias de TB bovina en zonas con  
  
altas densidades de animales silvestres, es necesario llevar a cabo medidas de  
  
prevención y control en estos reservorios de M. bovis para lograr una eliminación  
completa de esta enfermedad (Byrne et al., 2019; Risco et al., 2018). El producto  
  
posbiótico elaborado podría ser útil para el control de la TB en poblaciones de jabalíes  
silvestres que complican los programas de erradicación de esta enfermedad en la  
  
cabaña ganadera. Esta medida es particularmente factible en aquellos terrenos  
cinegéticos o explotaciones en los que la normativa actual requiera la implantación de  
  
actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la TB,  
entre las que se incluye el jabalí (RD 138/2020). La normativa española permite la  
  
suplementación sistemática en las categorías I y II, que son granjas o núcleos zoológicos  
y explotaciones valladas perimetralmente, respectivamente. En la categoría III,  
  
explotaciones valladas sin aporte sistemático de suplementación y la categoría IV, cotos  
  
abiertos o Parques Nacionales, solo se permiten estas actuaciones sanitarias de forma  
puntual, previamente autorizada, cuando se den condiciones muy particulares, como  
  
una incidencia especialmente elevada de TB o cuando exista carencia de alimentación  
natural en periodos determinados.  
  
  
  
El uso de suplementos posbióticos en fauna silvestre se plantea como alternativa a otras  
  
medidas que podrían ser controvertidas, como el control poblacional mediante  
eliminación de animales, ya que el jabalí es una especie con gran un valor económico y  
  
cultural en España; y medidas que requieren un manejo considerable de los animales,  
  
como la vacunación parenteral, que podría ser técnicamente complicada en la mayoría  
de las poblaciones silvestres (Gortazar et al., 2015; O’Connor et al., 2012; Stedman et  
  
al., 2020). No obstante, esta medida podría considerarse una herramienta  
complementaria en los programas de erradicación de la enfermedad a gran escala y  
  
podría extenderse a otros reservorios que limitan la eficacia de estos programas en  
España y otros países. Así, podría ensayarse en poblaciones de ciervo rojo (Cervus  
  
elaphus) y gamo (Dama dama) en España, tejón euroasiático (Meles meles) en el Reino  
Unido, el venado de cola blanca (Odocoileus virginianus) en América del Norte, en la  
  
zarigüeyas australiana (Trichosurus vulpecula) en Nueva Zelanda o búfalo africano  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 295

Página 296:  
EXP | Capítulo VI  
  
(Syncerus caffer) en Sudáfrica (Corner, 2006), e introducirse en los programas para la  
  
conservación de especies en peligro de extinción, como el lince ibérico (Briones et al.,  
  
2000).  
  
  
  
La utilización de posbióticos se propone como una estrategia factible, económicamente  
viable, con una intervención mínima y basada en productos naturales, que están  
  
demostrando ser eficaces en los últimos años y que se postulan como una novedosa  
alternativa para el control de enfermedades infecciosas en medicina humana y animal  
  
(Salminen et al., 2021). En el caso concreto de la TB, debido a la necesidad de  
introducción de nuevas herramientas de control de la enfermedad, estos resultados  
  
arrojan prospectivas de futuro con enormes posibilidades, no solo sobre la fauna  
doméstica y silvestre, sino también sobre la salud humana bajo el enfoque One Health,  
  
pudiendo contribuir de forma significativa a la Salud Pública mundial, debido a que TB  
  
humana continúa siendo una de las principales causas de muerte las zonas del mundo  
con menores posibilidades económicas.  
  
  
  
  
  
 296 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 297:  
 EXP | Capítulo VI  
  
BLOQUE III: TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA Y  
CONOCIMIENTO CIENTÍFICO  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 297

Página 298:  
298 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 299:  
 TEC | Índice  
  
ÍNDICE BLOQUE III  
  
  
  
  
  
CAPÍTULO VII: Difusión e impacto del conocimiento científico generado en la transferencia tecnológica  
  
 301  
  
 INTRODUCCIÓN 303  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 299

Página 300:  
300 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 301:  
 TEC | Capítulo VII  
  
  
  
  
CAPÍTULO VII: Difusión e impacto del conocimiento científico  
generado en la transferencia tecnológica  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 301

Página 302:  
TEC | Capítulo VII  
  
  
  
  
  
 302 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 303:  
 TEC | Capítulo VII  
  
INTRODUCCIÓN  
  
  
La modalidad de «doctorado industrial» incluye un concepto relativamente nuevo que  
está cobrando cada vez más relevancia en España durante los últimos años. El RD  
  
195/2016 introduce los doctorados industriales, que son aquellos en los que el  
doctorando participa en un proyecto de investigación industrial o de desarrollo  
  
experimental directamente relacionado con su tesis, desarrollado en una empresa o  
  
Administración Pública distinta a la universidad. Esta legislación propone por primera  
vez en nuestro país la Mención Industrial al título de Doctor, a la que opta la presente  
  
tesis doctoral, cuyo fin es estimular la participación de las empresas en los programas  
de Doctorado. Este tipo de proyectos doctorales se realizarían con la colaboración del  
  
tejido industrial para garantizar los lazos entre el mundo académico y el mundo  
empresarial, lo que aporta numerosas ventajas, como veremos a continuación (RD  
  
99/2011, RD 195/2016).  
  
  
Uno de los retos del sistema público de investigación en España, que se propuso hace  
un par de décadas y se está llevando a cabo de forma más fehaciente en los últimos  
  
años, es la creación de un mercado tecnológico más competitivo mediante la  
  
transferencia de la tecnología y los conocimientos generados en el entorno de la  
investigación pública para su transformación en el sector empresarial. La transferencia  
  
de conocimiento y tecnología se refiere normalmente a la transmisión del conocimiento  
científico y tecnológico generado en las universidades y centros de investigación al tejido  
  
social y productivo, esto es, persigue incorporar el conocimiento a una cadena de valor  
para que genere un retorno económico. El proceso de transferencia resulta  
  
enriquecedor tanto para las empresas, los centros de generación de conocimiento, si  
son distintas a estas, y para la sociedad en general. Por tanto, los beneficios de este  
  
sistema suponen la generación de una mayor competitividad empresarial y, con ello, un  
  
mayor crecimiento económico, mayor bienestar social y pleno empleo (Rubiralta y  
Bellavista, 2003).  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 303

Página 304:  
TEC | Capítulo VII  
  
Por otro lado, el conocimiento generado de una investigación puede difundirse a través  
  
de diferentes canales. La difusión per se es la propagación del conocimiento científico  
  
entre especialistas de un área en cuestión y puede realizarse mediante la publicación de  
la investigación en revistas científicas o mediante la comunicación de los resultados en  
  
congresos, seminarios o foros especializados, entre otros. Por otro lado, la divulgación  
hace referencia a la comunicación de los resultados a la comunidad mediante un  
  
lenguaje y diferentes canales que sean más accesibles a la sociedad en general  
(Espinosa-Santos, 2010).  
  
  
El objetivo general de este bloque es transferir la tecnología y el conocimiento científico  
  
derivado del desarrollo de la presente tesis doctoral.  
  
  
Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:  
  
  
 - La protección de las invenciones que sean sujetas a explotación comercial por  
  
 parte de la empresa, mediante la solicitud de patentes.  
  
  
 - La incorporación de la tecnología a una cadena de valor que genere retorno  
 económico y la aplicación de los conocimientos al desarrollo de procesos como  
  
 parte de la actividad productiva de la empresa.  
  
  
 - La publicación en revistas científicas de impacto de aquellos contenidos que se  
  
 consideren relevantes para la comunidad científica en general, así como la  
 difusión de los hallazgos en seminarios y congresos específicos del área.  
  
  
 - La publicación en revistas de divulgación científica, bien destinada a sectores  
  
 específicos del área de sanidad animal, como a revistas para la sociedad en  
 general.  
  
  
  
  
  
 304 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 305:  
 TEC | Capítulo VII  
  
1. Materialización de la transferencia tecnológica de la presente tesis doctoral  
  
 El conjunto de las técnicas diseñadas y los procedimientos descritos en los bloques  
  
 anteriores de este documento, así como el conocimiento científico generado a partir del  
 desarrollo de esta tesis doctoral, han sido aplicados en contextos muy similares para la  
  
 materialización de la transferencia tecnológica en forma de patentes. Todos estos  
 conocimientos se conocen en el mundo empresarial como know how y forman parte del  
  
 conjunto de procesos que conforman la estrategia competitiva de una empresa con  
 respecto a sus competidores dentro del mismo sector productivo. Para la protección de  
  
 las invenciones industriales, la Ley 24/2015 de Patentes concede el título de «patente  
 de invención» a aquellos productos y procedimientos que impliquen una actividad  
  
 inventiva y sean susceptibles de reproducción y reiteración industrial, incluidos los  
 productos obtenidos mediante un procedimiento microbiológico. Por otro lado, las  
  
 patentes pueden conllevar una extensión internacional a través del Tratado de  
  
 Cooperación en materia de Patentes (PCT, Patent Cooperation Treaty) para proteger la  
 invención en un gran número de países.  
  
  
 Los aislados y las cepas mencionadas a lo largo de todo este documento son objeto de  
  
 publicación científica como parte del proceso de la aplicación del método científico y es  
 una parte relevante en el desarrollo de una tesis doctoral. Sin embargo, dos aislados  
  
 bacterianos que han sido seleccionados y caracterizados mediante procedimientos  
 similares a los descritos anteriormente, así como los productos generados por las  
  
 mismas, constan de actividad inventiva suficiente como para ser candidatos a la  
  
 protección mediante patente de invención.  
  
  
 Solicitud de patente internacional mediante PCT: Novel Lactococcus lactis strain for  
 the production of bioactive compounds having antimicrobial effect  
 El contenido de esta sección está  
 Las técnicas experimentales diseñadas y descritas en esta tesis doctoral han permitido sujeto a protección.  
 extender los procedimientos validados de aislamiento, selección y caracterización de  
 BAL para lograr el descubrimiento de una cepa aislada de la microbiota nasal de jabalí  
  
 con propiedades muy particulares nunca antes descritas. La nueva cepa de BAL se ha  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 305

Página 306:  
TEC | Capítulo VII  
  
identificado como Lactococcus lactis subespecie lactis y ha sido depositada en la  
  
colección alemana de microorganismos y cultivos celulares de Leibniz-Institute (DSM  
  
33521). La actividad inventiva está relacionada no solo con la cepa en cuestión, sino  
también con las composiciones alimentarias, farmacéuticas o veterinarias que  
  
comprenden los compuestos bioactivos producidos por esta.  
  
  
La cepa de Lactococcus lactis C11JN tiene capacidad para producir compuestos  
bioactivos eficaces contra una amplia gama de bacterias patógenas Gram+ y Gram-, que  
  
incluyen diferentes serotipos de Pasteurella multocida, Listeria monocytogenes,  
Streptococcus suis, Staphylococcus aureus y Enterococcus faecium, mediante diferentes  
  
mecanismos de acción en función del patógeno. Los compuestos bioactivos son  
fundamentalmente metabolitos antimicrobianos de fermentación y bacteriocinas, que El contenido de esta sección está  
han sujetosido detectadasa protección.mediante análisis bioinformático y purificadas mediante los  
métodos de ultracentrifugación y filtrado. Todos los procedimientos han sido descritos  
en capítulos previos de este documento.  
  
  
La principal utilidad de dichos compuestos bioactivos radica en su actividad  
  
antimicrobiana. Estos compuestos podrían incluirse en el desarrollo de biofármacos  
sustitución de los tratamientos actuales o en conjunto con estos para mejorar el  
  
resultado en la terapia frente a un amplio espectro de bacterias patógenas, incluso en  
el caso de bacterias con resistencia a los antibióticos actuales, tanto en humanos como  
  
en animales.  
  
  
La solicitud de esta patente presenta un total de 15 reivindicaciones que fueron  
  
tramitadas el 12 de junio de 2020 (EP20382508.8) y cuya protección se extendió a PCT  
el 12 de junio de 2021. Los documentos que certifican la solicitud de la mencionada  
  
patente se presentaron para la solicitud de protección de esta tesis doctoral y se  
corresponden con el comprobante de presentación y la designación de inventores.  
  
  
  
  
  
 306 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 307:  
 TEC | Capítulo VII  
  
Solicitud de patente española: Cepa de Mycobacterium chelonae y composiciones  
  
farmacéuticas, veterinarias y alimenticias que la contienen para la prevención y/o  
  
control de tuberculosis  
  
  
Por otro lado, el conocimiento científico generado a partir del desarrollo de esta tesis  
doctoral ha permitido extrapolar estos procedimientos para el aislamiento de una  
  
bacteria que no pertenece al grupo de las BAL pero que tiene propiedades beneficiosas  
que actúan en sinergia con estas. Este hecho pone de manifiesto la prospectiva  
  
estratégica de la utilización de bacterias beneficiosas para el control de enfermedades  
infecciosas y plasma las posibilidades de aplicar este conocimiento en líneas futuras de  
  
investigación, abriendo un importante campo en el desarrollo de las alternativas al  
tratamiento de muchas enfermedades. El contenido de esta sección está  
 sujeto a protección.  
En este caso, la nueva cepa de Mycobacterium chelonae CAR47 (Número de depósito  
DSM 33522) tiene la capacidad de modular la respuesta inmunitaria frente a otras  
  
micobacterias patógenas y ayuda a controlar la diseminación de la tuberculosis en los  
organismos infectados. Los mecanismos de la actividad inmunomoduladora incluyen la  
  
interacción de la mencionada cepa con las células inmunitarias del hospedador para el  
desencadenamiento de una cascada de señalización que activa las rutas inmunitarias y  
  
controlan la producción de diferentes tipos de citoquinas. La actividad inventiva de la  
solicitud de patente se refiere a la utilización de esta cepa y sus composiciones derivadas  
  
que comprenden la bacteria inactivada para su uso en la prevención y/o control de la  
  
tuberculosis mediante su administración por vía oral en animales.  
  
  
En este caso, se presentó una solicitud de patente española con un total de 14  
reivindicaciones el 30 de junio de 2020 (P202030658). Los documentos que certifican la  
  
solicitud de la mencionada patente se presentaron para la solicitud de protección de  
esta tesis doctoral y se corresponden con el comprobante de presentación y la  
  
designación de inventores.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 307

Página 308:  
 TEC | Capítulo VII  
  
2. Impacto industrial de la tesis doctoral para la empresa  
  
 Se entiende como «investigación industrial» a los estudios planificados cuyo objetivo es  
  
 la adquisición de nuevos conocimientos y aptitudes que puedan resultar de utilidad para  
 desarrollar nuevos productos, procesos o servicios, o permitan mejorar  
  
 considerablemente los ya existentes, especialmente en el entorno empresarial  
 (ECC/1402/2013).  
  
  
 El Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación (Plan Estatal I+D)  
  
 recoge en su estructura los objetivos de la Estrategia Española de Ciencia y Tecnología y  
 de Innovación. Dentro de este plan, el Programa Estatal de Promoción del Talento y su  
  
 Empleabilidad convoca las ayudas para contratos para la formación de doctores en  
 empresa «Doctorados Industriales» mediante un sistema de concurrencia competitiva.  
  
 La finalidad de estas ayudas es promover la realización de proyectos de investigación  
  
 industrial en empresas para favorecer la inserción laboral de personal investigador en  
 estas, contribuir a la empleabilidad de estos investigadores y promover la incorporación  
  
 de talento en el tejido productivo para elevar la competitividad del mismo.  
  
  
 El impacto que ha tenido el proyecto de investigación industrial para la empresa  
 INGULADOS se ha materializado en tres hitos fundamentalmente. Por un lado, el  
  
 método científico y los procesos tecnológicos descritos en esta tesis doctoral han  
 desembocado en la creación de la línea de Desarrollo de Productos Alternativos a  
  
 Antibióticos, dentro del departamento de «Desarrollo de Productos» para centralizar los  
  
 procedimientos encaminados a la elaboración de productos innovadores que den una  
 respuesta eficaz a los problemas planteados por los clientes de la empresa, y  
  
 complementar otras líneas de productos de la empresa como son las Fórmulas  
 nutricionales y Autovacunas. Por otro lado, el lanzamiento al mercado de una gama de  
  
 productos posbióticos ha tenido un impacto significativo sobre la actividad económica  
 de la empresa. Por último, para favorecer la empleabilidad de los investigadores y su  
  
 incorporación a las empresas, y así responder a la finalidad de la ayuda recibida por parte  
 del Ministerio de Ciencia e Innovación, se crea en INGULADOS el puesto de  
  
  
  
 308 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 309:  
 TEC | Capítulo VII  
  
«Responsable de Calidad» para asegurar la excelencia en todos estos procedimientos  
  
descritos y lograr la implantación de un sistema de gestión de la calidad.  
  
  
Instauración de la línea de productos alternativos a los antibióticos  
  
  
Esta línea de Productos en INGULADOS pretende aportar soluciones innovadoras a las  
  
necesidades planteadas por los clientes de la empresa, que pueden ser los ganaderos,  
los veterinarios o los propios propietarios de las fincas que la entidad gestiona y asesora.  
  
Dentro de este departamento, los conocimientos generados del desarrollo de esta tesis  
doctoral se establecen dentro de una línea propia mediante un conjunto de procesos,  
  
que se describen en la Figura 7.1 y cuyo fin es prestar este servicio a los clientes. Las  
bacterias beneficiosas aisladas y caracterizadas en esta tesis doctoral, que son  
  
candidatas a ser incluidas en los productos innovadores, constituyen la colección de  
  
bacterias de INGULADOS.  
  
  
Las fases de este procedimiento se muestran en el diagrama de flujo de la Figura 7.1 y  
son las siguientes:  
  
  
Identificación del problema o necesidad  
  
El proceso comienza cuando se detecta un problema o una necesidad en una finca, bien  
por parte de los veterinarios o asesores de INGULADOS, o bien a petición del cliente,  
  
que pueden ser los ganaderos, los veterinarios de las granjas de animales de producción  
  
o cinegéticas o los propietarios de las fincas.  
  
  
Caracterización microbiológica  
En la mayoría de las ocasiones, los problemas responden a una casuística infecciosa de  
  
base, esto es, un problema que requiere el aislamiento y la caracterización del agente  
patógeno mediante la aplicación de procedimientos microbiológicos que incluyen  
  
cultivo e identificación por pruebas bioquímicas y moleculares.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 309

Página 310:  
TEC | Capítulo VII  
  
  
  
Preselección de bacterias candidatas  
  
Para el diseño de una estrategia que pueda ser favorable para la resolución del  
problema, se realiza una preselección de bacterias beneficiosas en función de estudios  
  
previos. En primer lugar, se seleccionan las bacterias que pueden ser candidatas incluirse  
en el producto. Estas pueden pertenecer a la colección de INGULADOS, las cuales ya se  
  
encuentran caracterizadas; o bien se puede realizar una búsqueda de nuevas bacterias  
en función de las necesidades, que deberán seguir procedimientos más complejos de  
  
para asegurar su viabilidad e inocuidad.  
  
  
Selección final de bacterias beneficiosas  
La selección final de bacterias candidatas se realizará en tres fases:  
  
  
 - Estudio de seguridad de los candidatos: solo en el caso de que las bacterias  
 seleccionadas sean nuevas y no pertenezcan a la colección de INGULADOS. Dicho  
  
 estudio consiste en la detección fenotípica y genotípica de resistencias  
 antimicrobianas, factores de virulencia y marcadores de patogenicidad.  
  
  
 - Actividad antimicrobiana: se realiza la detección genotípica y fenotípica de  
  
 metabolitos antibacterianos producidos por las bacterias que inhiban el  
 patógeno concreto caracterizado en las primeras fases del procedimiento. La  
  
 detección genotípica se realiza mediante análisis bioinformático y la detección  
  
 fenotípica mediante técnicas que incluyen los cocultivos, ensayo de  
 microdilución en caldo y difusión de sobrenadantes.  
  
  
 - Capacidad inmunomoduladora: se realizan estudios genotípicos y fenotípicos de  
  
 interacción con células inmunitarias y activación de rutas de señalización  
 mediante diferentes marcadores.  
  
  
  
 En función de estos tres parámetros se seleccionarían las bacterias que  
  
 potencialmente pueden aportar una solución al problema planteado.  
  
 310 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 311:  
 TEC | Capítulo VII  
  
Elaboración del producto  
  
Las bacterias seleccionadas se envían a un proveedor subcontratado (PENTA SL), que  
  
realiza la fabricación del suplemento alimentario mediante procedimientos que incluyen  
unas etapas que ya han sido descritas previamente.  
  
  
Validación del producto  
  
La validación se realiza a través de diseño experimental, en el caso de nuevos productos  
desarrollados, o mediante la valoración del cumplimiento de la necesidad detectada. En  
  
el caso de que la validación sea positiva y se dé respuesta de forma satisfactoria a la  
necesidad, se establecerán diferentes pautas de administración. En el caso de que el  
  
resultado de la validación sea negativo, se realizarían las acciones para volver a las fases  
anteriores de preselección/selección, continuando el proceso definido con anterioridad.  
  
  
  
  
  
 Figura 7.1. Diagrama de flujo de los procesos del Departamento de Desarrollo de Productos  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 311

Página 312:  
TEC | Capítulo VII  
  
  
  
Lanzamiento al mercado de la gama de productos INGUBAL  
  
  
El proyecto de investigación industrial descrito en esta tesis doctoral ha tenido un  
  
impacto muy significativo en la empresa INGULADOS, permitiendo incorporar la  
investigación desarrollada a una cadena de valor mediante su materialización en el  
  
lanzamiento al mercado de una gama de productos denominada INGUBAL (Figura 7.2).  
Estos productos son posbióticos que incluyen una combinación de metabolitos  
  
producidos por bacterias beneficiosas cuya composición está protegida por secreto  
industrial. La gama de productos está registrada como piensos suplementarios y se  
  
comercializa para el control de determinados procesos en diferentes especies animales,  
una vez han sido validados por los procedimientos descritos anteriormente, generando  
  
un retorno económico de gran impacto para la empresa.  
  
  
  
  
  
 Figura 7.2. Ejemplo de productos de la gama INGUBAL en las instalaciones de INGULADOS.  
  
  
 312 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 313:  
 TEC | Capítulo VII  
  
 Implantación de un sistema de gestión de la calidad y creación de un nuevo perfil de  
  
 puesto de trabajo  
  
  
 Uno de los objetivos del Plan Estatal I+D, en concreto del Programa de Promoción del  
  
 Talento y Empleabilidad en el que se enmarca el programa de Doctorados Industriales  
 del Ministerio de Ciencia e Innovación, es favorecer la inserción laboral de los jóvenes  
  
 investigadores para elevar la competitividad del sector productivo de las empresas.  
 Como parte del proceso de generación de empleo de este Programa, la investigadora en  
  
 formación se incorporará a la empresa en un nuevo perfil de puesto de trabajo creado  
 para este fin, que es el denominado como «Responsable de Calidad». En la actualidad,  
  
 los procedimientos descritos en esta tesis doctoral se encuentran enmarcados en un  
 Sistema de Gestión de la Calidad que afecta de forma directa al procedimiento de  
  
 desarrollo de productos y que está diseñado en conformidad con los requisitos de la  
  
 Norma UNE-ENE ISO 9001:2015 para incrementar y consolidar la investigación, el  
 desarrollo tecnológico y la innovación en la empresa. En INGULADOS la I+D+i constituye  
  
 una actividad diferenciadora en el sector, aportando prestigio y reconocimiento a toda  
 la organización, acorde también a los requisitos de la Norma UNE 166002 de Gestión de  
  
 la I+D+I.  
  
  
  
3. Difusión del contenido científico y divulgativo  
  
 La difusión de los conocimientos científicos generados a raíz de esta tesis doctoral se ha  
 realizado mediante la publicación de artículos científicos y divulgativos y mediante la  
  
 asistencia a congresos y seminarios especializados. Además, se incluyen varias estancias  
  
 de formación que se realizaron durante la etapa predoctoral en otros centros de  
 investigación, concretamente en universidades.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 313

Página 314:  
TEC | Capítulo VII  
  
Publicaciones científicas  
  
  
 1. María Bravo; Theo Combes; Fernando O Martínez; Rosario Cerrato; Joaquín Rey;  
 Waldo García-Jiménez; Pedro Fernández-Llario; David Risco; Jorge Gutiérrez  
  
 Merino. Lactobacilli isolated from wild boar (Sus scrofa) antagonize  
 Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin (BCG) in a species-dependent  
  
 manner. Frontiers in Microbiology. 10 - 1663, 30/07/2019. Disponible en  
 Internet en: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01663/full  
  
  
 2. María Bravo; Theo Combes; Fernando O Martínez; David Risco; Pilar Gonçalves;  
  
 Waldo García-Jiménez; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario; Jorge Gutiérrez  
 Merino. Wildlife symbiont bacteria are indicators of the health status of the host  
  
 and its ecosystem. Applied and Environmental Microbiology. En revisión.  
 13/07/2021.  
  
  
 3. María Bravo; David Risco; Pilar Gonçalves; Waldo García-Jiménez; Jorge  
  
 Gutiérrez-Merino; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Bacteria-derived  
 postbiotic supplementation improved tuberculosis epidemiological situation in  
  
 wild boar populations. Pendiente de publicación.  
  
  
 4. María Bravo; Waldo García-Jiménez; María José Montero; David Risco; Pilar  
  
 Gonçalves; Verónica Arenas; Carlos Martínez; Javier Blanco; Rosario Cerrato;  
 Pedro Fernández-Llario. Postbiotic supplementation in fattened lamb improved  
  
 health indicators and productive parameters. En preparación.  
  
  
 5. María Bravo; Waldo García-Jiménez; David Risco; Javier Blanco; Pilar Gonçalves;  
 Verónica Arenas; María José Montero; Carlos Martínez; Rosario Cerrato; Pedro  
  
 Fernández-Llario. Synergistic effect of bacteria-derived metabolites on antibiotic  
  
 therapy in an experimental pneumonia in a mouse model. En preparación.  
  
  
  
  
Asistencia a congresos y seminarios  
 314 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 315:  
 TEC | Capítulo VII  
  
  
  
1. María Bravo. Monitorización de resistencias antimicrobianas en poblaciones de  
  
 jabalí. V Jornadas Veterinarias de Estudiantes y IV Jornadas de Ciencias de la  
 Salud. Universidad de Extremadura (Cáceres, España). 30/03/2017  
  
  
2. Almudena Torres; María Bravo. Descripción de una técnica para el estudio de la  
  
 actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. V Jornadas Veterinarias de  
 Estudiantes y IV Jornadas de Ciencias de la Salud, Universidad de Extremadura  
  
 (Cáceres, España). 30/03/2017  
  
  
3. María Bravo. Overview of Probiotics in Wildlife. Applied Microbiology Group  
 Seminar. University of Surrey (Guildford, Reino Unido). 12/06/2017  
  
4. Pedro Fernández-Llario; María Bravo; Rosario Cerrato; David Risco; Waldo  
  
 García-Jiménez; Pilar Gonçalves; Joaquín Rey; Jorge Gutiérrez-Merino. Potential  
 use of lactic acid bacteria as probiotics to control TB in wildlife. International  
  
 Scientific Conference of Probiotics and Prebiotics. Pamida Internacional  
  
 (Budapest, Hungría). 22/06/2017  
  
  
5. María Bravo. Isolation of Lactic Acid Bacteria with probiotic properties. Annual  
  
 meeting of the Association for Veterinary Teaching and Research Work, AVTRW  
 (Guildforf, Reino Unido). 12/09/2017  
  
  
6. María Bravo; Jorge Gutierrez-Merino; Rosario Cerrato; David Risco; Waldo  
  
 García; Pilar Gonçalves; Joaquín Rey; Pedro Fernández-Llario. Potential use of  
 lactic acid bacteria as probiotics to control TB in wildlife. Xth International  
  
 Symposium on WILD FAUNA - ISoWIF 2017. Universidade de Trás-os-Montes e  
  
 Alto Douro (Vila Real, Portugal). 21/09/2017  
  
  
7. Waldo Luis García-Jiménez; David Risco; María Bravo; Caridad Pinilla; Pilar  
  
 Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Francisco Javier Salguero; Pedro  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 315

Página 316:  
TEC | Capítulo VII  
  
 Fernández-Llario. El tratamiento con postbióticos reduce la morbilidad y la  
  
 mortalidad provocada por Lawsonia intracellularis en porcino ibérico. X Foro  
  
 Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino Ibérico. Asociación Nacional de  
 Veterinarios de Porcino Ibérico (Badajoz, España). 14/03/2018  
  
  
 8. David Risco; Waldo Luis García-Jiménez; María Bravo; Caridad Pinilla; Pilar  
 Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Francisco Javier Salguero; Pedro  
  
 Fernández-Llario. Efecto de la aplicación de postbióticos en la flora intestinal,  
  
 índices productivos y respuesta inmune del lechón ibérico durante la lactación.  
 X Foro Asociación Nacional de Veterinarios de Porcino Ibérico. Asociación  
  
 Nacional de Veterinarios de Porcino Ibérico (Badajoz, España). 14/03/2018  
  
  
 9. María Bravo. Métodos de control de enfermedades infecciosas alternativos al  
 uso de antibióticos en especies cinegéticas. II Jornada Anual de Becarios de la  
  
 Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. Fundación Tatiana Pérez de  
 Guzmán el Bueno (Madrid, España). 13/04/2018  
  
  
 10. Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario; María Bravo; David Risco; Waldo  
  
 García-Jiménez; Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Javier Salguero; Joaquín Rey;  
 Jorge Gutiérrez. Potential immunomodulatory role of LAB inducing NK-KB and  
  
 IRF-3 activation and phagocytosis under experimental conditions. Microbial food  
 and feed ingredients. The Danish Microbiological society (Copenhagen,  
  
 Dinamarca). 02/05/2018  
  
  
 11. María Bravo. Alternativas al uso de antibióticos en producción animal: los  
 probióticos. IV Congreso Multidisciplinar de Jóvenes Investigadores Extremeños.  
  
 Universidad de Extremadura (Cáceres, España). 28/05/2018  
  
  
 12. María Bravo. Probióticos como estrategia para el control de enfermedades y la  
 mejora de la productividad en ganadería. II Jornadas Doctorales de la  
  
 Universidad de Extremadura. Universidad de Extremadura (Cáceres, España).  
  
 316 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 317:  
 TEC | Capítulo VII  
  
 23/11/2018  
  
  
13. María Bravo; Waldo García-Jiménez; David Risco; Alfredo García; Fermín López;  
  
 Pilar Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Joaquín Rey; Pedro  
 Fernández-Llario. Reduction in the incidence of diarrhoea and improved growth  
  
 performance in lambs supplemented with Ingubal®. 7th Beneficial Microbes  
 Conference. Pre- and Probiotics for Lifelong Human and Animal Health.  
  
 Bastiaanse Communication (Amsterdam, Holanda). 26/11/2018  
  
  
14. Carlos Martínez; María Bravo; Rosario Cerrato. Bacteriocinas: una alternativa a  
 los antibióticos para el control de enfermedades. VI Jornadas Veterinarias para  
  
 Estudiantes y V Jornadas de Ciencias de la Salud. Universidad de Extremadura  
 (Cáceres, España). 28/03/2019  
  
  
15. María José Montero; María Bravo; Pilar Gonçalves; Waldo García-Jiménez;  
 Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario; David Risco. Efecto de  
 la administración de piensos fermentados en perdices. VI Jornadas Veterinarias  
  
 para Estudiantes y V Jornadas de Ciencias de la Salud. Universidad de  
  
 Extremadura (Cáceres, España). 28/03/2019  
  
  
16. Carlos Martínez; María Bravo. Actividad antimicrobiana de bacteriocinas  
 producidas por bacterias ácido-lácticas. V Congreso Multidisciplinar de Jóvenes  
  
 Investigadores Extremeños. Universidad de Extremadura (Cáceres, España).  
 28/05/2019  
  
  
17. María Bravo; María José Montero. Reducción del uso de antibióticos en cerdos  
  
 blancos suplementados con piensos posbióticos. V Congreso Multidisciplinar de  
 Jóvenes Investigadores Extremeños. Universidad de Extremadura (Cáceres,  
  
 España). 28/05/2019  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 317

Página 318:  
TEC | Capítulo VII  
  
 18. María Bravo; Rosario Cerrato; Waldo García-Jiménez; David Risco; Pilar  
 Gonçalves; Verónica Arenas; Jesús Femia; Joaquín Rey; Pedro Fernández-Llario.  
  
 Improvement in productive and health indicators in Iberian pigs supplemented  
 with Ingubal. Workshop Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos. SEPyP  
  
 (Las Palmas de Gran Canaria, España). 06/02/2019  
  
  
 19. María Bravo. Moduladores de la microbiota como alternativa a los antibióticos  
 en ganadería. V Jornadas Doctorales de la Universidad de Extremadura.  
  
 Asociación de Doctorandos de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España).  
 29/11/2019  
  
  
 20. María Bravo. Moduladores de la microbiota como alternativa a los antibióticos  
  
 en ganadería. VIII Jornadas Doctorales del grupo G9 Universidades. Universidad  
 de Zaragoza (virtual). 23/11/2020  
  
  
 21. María Bravo. Wildlife microbiota: a promising source for probiotics  
 development. Vet School Research Symposium. University of Surrey (virtual).  
  
 01/07/2021  
  
  
 22. María Bravo; Waldo García-Jiménez; David Risco; Javier Blanco; Pilar Gonçalves;  
 Verónica Arenas; María José Montero; Carlos Martínez; Rosario Cerrato; Pedro  
  
 Fernández-Llario. Efecto sinérgico de posbióticos sobre la terapia antibiótica en  
  
 una neumonía experimental en modelo ratón. XII Workshop de la Sociedad  
 Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos, SEMiPyP (virtual). 15/09/2021  
  
  
Publicaciones divulgativas  
  
  
 1. María Bravo; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pedro Fernández-Llario;  
  
 Joaquín Rey. Nuevas alternativas a los antibióticos: cómo actúan los probióticos  
  
 en producción animal. Producción Animal. 310 - septiembre-octubre, pp. 32 - 38.  
 31/10/2018.  
  
 318 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 319:  
 TEC | Capítulo VII  
  
  
  
2. David Risco; Julio Fernández; Waldo García-Jiménez; María Bravo; Pilar  
  
 Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Mejora de  
 signos clínicos de paratuberculosis en bovino mediante la aplicación de  
  
 suplementos alimenticios. Ganadería. 120 - marzo-abril, pp. 40 - 44. Editorial  
 Agrícola, 30/04/2019.  
  
  
3. María Bravo; Waldo García-Jiménez; David Risco; Pilar Gonçalves; Alfredo García;  
  
 Joaquín Sánchez-Peinado; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario.  
 Administración de piensos fermentados (Ingubal Ruminant) en cebo de  
  
 corderos: mejora de parámetros productivos e indicadores de salud. Producción  
 Animal. 314 - mayo-junio, pp. 54 - 60. 28/06/2019.  
  
  
4. María Bravo; Carlos Martínez; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pilar  
 Gonçalves; María José Montero; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro  
  
 Fernández-Llario; Joaquín Rey. Efecto inmunomodulador de las bacterias ácido-  
 lácticas. Ganadería. 122 - julio-agosto, pp. 52 - 54. Editorial Agrícola, 26/07/2019.  
  
  
5. Waldo García-Jiménez; María Bravo; David Risco; Pilar Gonçalves; Verónica  
 Arenas; Francisco J Salguero; Jesús V Díaz; Paula Sánchez-Jiménez; Rosario  
  
 Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Empleo de suplementos posbióticos (INGUBAL)  
 para la reducción del uso de antibióticos y mejora de parámetros de salud en  
  
 porcino. Producción animal. 315 - Julio/agosto, pp. 54 - 63. 30/08/2019.  
  
  
6. María Bravo; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pilar Gonçalves; Verónica  
 Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Modulación de la microbiota  
  
 intestinal y su importancia en los animales de producción. Badajoz Veterinaria.  
 17- diciembre 2020. Colegio de Veterinarios de Badajoz, 1/12/2019.  
  
  
7. María Bravo; María José Montero; David Risco; Waldo García-Jiménez; Pilar  
 Gonçalves; Verónica Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario.  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 319

Página 320:  
TEC | Capítulo VII  
  
 Suplementación con posbióticos en caballos con piroplasmosis. Extremadura  
  
 PRE. 35 - abril 2020, pp. 18 - 25. AECCPRE, 30/04/2020.  
  
  
 8. María Bravo; David Risco; Pilar Gonçalves; Waldo García-Jiménez; Verónica  
  
 Arenas; Rosario Cerrato; Pedro Fernández-Llario. Posbióticos, la alternativa a la  
 utilización de antibióticos. Mundo Ganadero. julio/agosto 2020, pp. 22 - 25.  
  
 Eumedia, 30/07/2020.  
  
  
 9. María Bravo. Posbióticos, un concepto innovador en nutrición animal. Albeitar.  
 236/237 - junio/julio 2020, pp. 16 - 19. Grupo Asís, 30/07/2020.  
  
  
 10. María Bravo. Moduladores de la microbiota intestinal en veterinaria. En Catálogo  
  
 de Investigación Joven en Extremadura, volumen III. Servicio de Publicaciones de  
  
 la Universidad de Extremadura. ISBN: 978-84-0925-221-3. 07/02/2021.  
  
  
Estancias de formación en centros de I+D+i  
  
  
 1. Estancia de doctorado en la School of Biosciences and Medicina de la Faculty of  
 Health and Medical Sciences de la University of Surrey (Guildford, Reino Unido)  
  
 en el periodo de tiempo comprendido entre las fechas 20/04/2017 a 30/06/2017  
 (3 meses de duración)  
  
  
 2. Estancia de doctorado en la School of Biosciences and Medicina de la Faculty of  
 Health and Medical Sciences de la University of Surrey (Guildford, Reino Unido)  
  
 en el periodo de tiempo comprendido entre las fechas 06/09/2017 a 08/12/2017  
 (3 meses de duración)  
  
  
 3. Estancia complementaria de doctorado en el Departamento de Bioquímica y  
  
 Biología Molecular y Genética en el periodo de tiempo comprendido entre  
 03/06/2019 y 30/09/2019.  
  
  
  
  
 320 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 321:  
 CON | ES  
  
  
  
CONCLUSIONES  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 321

Página 322:  
CON | ES  
  
  
  
  
  
 322 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 323:  
 CON | ES  
  
Conclusiones del bloque I: Experimentos de laboratorio in vitro  
  
  
  
Capítulo I à objetivo I. Dilucidar si la microbiota de las poblaciones de jabalíes  
  
contribuye a mantener un estado libre de tuberculosis en fincas localizadas en zonas de  
alto riesgo de la enfermedad mediante el estudio de las propiedades antimicrobianas e  
  
inmunomoduladoras de su perfil de bacterias ácido-lácticas con capacidad para  
antagonizar Mycobacterium bovis, el agente causal de la tuberculosis.  
  
  
  
  
Las poblaciones de jabalíes libres de tuberculosis, que están localizadas en zonas  
  
catalogadas como de alto riesgo de la enfermedad, presentan un perfil predominante  
de lactobacilos en su microbiota, cuyo fenotipo se manifiesta como antagonista de  
  
Mycobacterium bovis, corroborado por un genotipo marcado por clústeres de  
bacteriocinas que se sobreexpresan en presencia del patógeno. Tanto las propiedades  
  
antimicrobianas frente a la micobacteria como la estimulación de respuestas  
inmunitarias frente a patógenos intracelulares indican que la microbiota podría conferir  
  
protección a estos jabalíes frente al desarrollo de la enfermedad. De hecho, un perfil  
completamente diferente, con abundancia de enterococos que carecen de esas  
  
propiedades antagonistas, fue encontrado en jabalíes que habitan en zonas con una  
  
prevalencia alta de tuberculosis. Los pediococos fueron encontrados en ambos grupos  
de estudio, pero solo el pediococo encontrado en el grupo de fincas libres de  
  
tuberculosis mostró propiedades inhibitorias frente a M. bovis, lo que refuerza la  
hipótesis de que la microbiota juega un papel fundamental en la protección frente al  
  
desarrollo de la tuberculosis.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 323

Página 324:  
CON | ES  
  
  
Capítulo II à objetivo II. Estudiar las propiedades potencialmente beneficiosas de  
  
las bacterias ácido-lácticas aisladas de la microbiota de jabalíes mediante un análisis  
genotípico y fenotípico completo del perfil de seguridad de los aislados, de su actividad  
  
antimicrobiana frente a patógenos del jabalí y de sus propiedades inmunomoduladoras.  
  
  
Un total de 11 aislados de la microbiota de jabalí poseen genes que codifican para la  
  
producción de metabolitos antimicrobianos, incluidas las bacteriocinas, y otras  
moléculas que pueden actuar como inmunomoduladoras. Los lactobacilos son los  
  
aislados que disponen de un mayor potencial beneficioso, debido a que gozan del  
estado de Presunción Cualificada de Seguridad y muestran proximidad filogenética con  
  
cepas de diverso origen, tanto alimentario como medioambiental e individuos sanos,  
muchas de ellas utilizadas en productos probióticos. Las propiedades beneficiosas de  
  
este grupo de microorganismos dependen de la especie, así, mientras que los aislados  
de Ligilactobacillus salivarius tienen potencial para el control de infecciones bacterianas  
  
con una actividad antimicrobiana potente frente a Pasteurella multocida activando,  
  
además, la cascada de señalización mediada por NF-kB en macrófagos, los aislados de  
Lactiplantibacillus plantarum y Lacticaseibacillus paracasei promueven la activación de  
  
la ruta antiviral del interferón. Los pediococos muestran un gran potencial beneficioso,  
en especial un aislado de Pediococcus acidilactici productor de pediocina que muestra  
  
una actividad antimicrobiana muy potente frente a Listeria monocytogenes y su origen  
filogenético está relacionado con cepas seguras para los hospedadores. Los enterococos  
  
producen varias bacteriocinas como sactipéptidos y lantipéptidos que inhiben al  
patógeno Escherichia coli, pero su origen filogenético se relaciona con cepas patógenas  
  
y además contienen en el genoma varios genes de resistencia antimicrobiana, que  
correlacionan con su fenotipo, y determinantes de virulencia. Por esto, el potencial  
  
perjudicial de los enterococos supera al beneficioso.  
  
  
  
  
  
 324 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 325:  
 CON | ES  
  
  
  
Capítulo III à objetivo III. Determinar la naturaleza de la fracción antimicrobiana y  
  
estudiar la sinergia de los metabolitos secretados al sobrenadante de forma óptima con  
una selección de antibióticos frente a patógenos importantes en medicina veterinaria.  
  
  
La detección de la fase del crecimiento microbiano en la que se produce la máxima  
  
actividad antimicrobiana ha propiciado que se haya optimizado la producción de  
metabolitos, que actúan en sinergia con varios antibióticos de uso común en medicina  
  
veterinaria, fundamentalmente amoxicilina o doxiciclina, frente a los patógeno  
Escherichia coli y Pasteurella multocida, respectivamente. Dentro de estos metabolitos,  
  
la fracción de naturaleza proteica, entre las que se incluyen las bacteriocinas de  
  
diferentes clases, contribuye de forma significativa a la actividad antimicrobiana de las  
bacterias ácido-lácticas aisladas.  
  
  
Conclusiones del bloque II: Experimentación animal in vivo  
  
  
  
Capítulo IV à objetivo IV. Estudiar el efecto de la administración por vía oral de un  
  
suplemento elaborado a partir de los metabolitos producidos por las bacterias ácido-  
lácticas en combinación con la terapia antibiótica para el control de una neumonía  
  
experimental en modelo ratón.  
  
  
  
El suplemento elaborado para el control de una neumonía experimental producida por  
  
el patógeno Pasteurella multocida administrado por vía oral favorece la supervivencia  
de los ratones infectados con la dosis letal absoluta cuando se combina con la terapia  
  
antibiótica. Este modelo experimental valida los procedimientos de cribado y selección  
de bacterias ácido-lácticas beneficiosas y constituye el paso previo para la elaboración  
  
de un posbiótico y su aplicación en condiciones reales.  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 325

Página 326:  
CON | ES  
  
  
  
Capítulo V à objetivo V. Analizar el efecto de la administración de un producto  
  
posbiótico elaborado a partir de los aislados sobre los indicadores sanitarios y los  
  
parámetros productivos en un cebadero de corderos.  
  
  
La administración de posbióticos específicamente diseñados para el control de los  
procesos producidos por el patógeno Pasteurella multocida en cebadero de corderos  
  
mejora la prevalencia y gravedad de las lesiones neumónicas y se asocia a un mayor  
ritmo de crecimiento de los animales, lo que se traduce en una mejor eficiencia  
  
alimentaria. Esta aproximación sanitaria favorece de forma directa la resolución de una  
  
problemática infecciosa y tiene un impacto indirecto sobre los parámetros productivos,  
con la consiguiente mejora en la rentabilidad de los animales de producción. La  
  
utilización de posbióticos en ganadería podría constituir una herramienta para limitar la  
administración de antimicrobianos a situaciones terapéuticas y permitiría satisfacer el  
  
incremento en la demanda de productos de origen animal, sin comprometer la salud de  
estos y de las personas.  
  
  
Capítulo VI à objetivo VI. Evaluar el efecto de un producto posbiótico  
  
administrado durante la época de suplementación llevada a cabo en poblaciones de  
  
jabalíes sobre la situación epidemiológica de la tuberculosis.  
  
  
  
La suplementación con metabolitos antimicobacterianos e inmunomoduladores  
  
incluidos en un posbiótico específicamente elaborado para el control de la tuberculosis  
se asocia a una disminución en la incidencia, así como en la presencia de lesiones  
  
compatibles con esta enfermedad y en la seroprevalencia de anticuerpos frente a M.  
bovis, agente causal de la misma, en poblaciones de jabalíes expuestos de forma natural  
  
a la infección. La utilización de posbióticos puede ser considerada como una estrategia  
  
factible para el control de la tuberculosis y podría introducirse como herramienta  
complementaria en los programas de erradicación de la enfermedad a gran escala, tanto  
  
en fauna silvestre como en animales de producción y en medicina humana.  
  
  
 326 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 327:  
 CON | ES  
  
Conclusiones del bloque III: transferencia de tecnología y  
  
conocimiento científico  
  
  
  
Capítulo VII à objetivo VII. Transferir la tecnología y el conocimiento científico  
  
derivado del desarrollo de la presente tesis doctoral mediante la solicitud de patentes  
  
de invención, la aplicación de los conocimientos al desarrollo de procesos en la empresa  
  
y la difusión de los resultados mediante la asistencia a congresos y la publicación en  
revistas científicas y divulgativas.  
  
  
El conocimiento científico generado del desarrollo de la presente tesis de Doctorado  
  
Industrial ha tenido un impacto significativo sobre la actividad de la empresa  
INGULADOS, mejorando su competitividad en el sector. Se ha creado una nueva línea  
  
de trabajo, dentro del Departamento de Desarrollo de Productos, que ha propiciado el  
lanzamiento de una gama de productos posbióticos innovadora, así como a la  
  
instauración de un nuevo perfil laboral de Responsable de Calidad. La transferencia  
  
tecnológica se ha materializado en la solicitud de dos patentes de invención y el  
conocimiento científico generado se ha difundido mediante la publicación de varios  
  
artículos científicos en revistas de impacto, abundantes artículos de divulgación en  
revistas y canales destinados a profesionales del sector y la asistencia a numerosos  
  
congresos y seminarios.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 327

Página 328:  
CON | ENG  
  
  
  
  
  
 328 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 329:  
 CON | ENG  
  
Conclusions from block I: in vitro laboratory experiments  
  
  
  
Chapter I à objective I. To determine whether the microbiota of wild boar  
  
populations contributes to maintain a tuberculosis-free status in farms located in high-  
risk areas of the disease by studying the antimicrobial and immunomodulatory  
  
properties of their lactic acid bacteria profile with the ability to antagonize  
Mycobacterium bovis, the causative agent of tuberculosis.  
  
  
Wild boar tuberculosis-free populations, which are located in high-risk areas of the  
  
disease, harbor a predominant lactobacilli profile within their microbiota, whose  
  
phenotype displays an antagonism toward Mycobacterium bovis, corroborated by a  
genotype marked by clusters of bacteriocins that are overexpressed in the presence of  
  
the pathogen. Both the antimicrobial properties against mycobacteria and the  
stimulation of immune responses against intracellular pathogens indicate that the  
  
microbiota could confer protection against the development of the disease in the host.  
In fact, a completely different profile, with an abundance of enterococci lacking these  
  
antagonistic properties, was found in wild boar inhabiting areas with a high prevalence  
of tuberculosis. Pediococci were found in both study groups, but only the pediococcus  
  
found in the group of tuberculosis-free populations showed inhibitory properties  
  
against M. bovis, which reinforces the hypothesis that the microbiota plays an essential  
role on the protection against the development of tuberculosis.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 329

Página 330:  
CON | ENG  
  
  
Chapter II à objective II. To study the potentially beneficial properties of lactic acid  
  
bacteria isolated from the microbiota of wild boars through a complete genotypic and  
phenotypic analysis of the safety profile of the isolates, their antimicrobial activity  
  
against wild boar pathogens and their immunomodulatory properties.  
  
  
A total of 11 isolates from the wild boar microbiota possess genes that code for the  
  
production of antimicrobial metabolites, including bacteriocins, and other molecules  
that can act as immunomodulators. Lactobacilli are the isolates with the greatest  
  
beneficial potential, due to their status of Qualified Presumption of Safety and their  
phylogenetic proximity with strains of diverse origin, including food, environmental and  
  
healthy individuals, many of them used in probiotic products. The beneficial properties  
of this group of microorganisms depend on the species. Ligilactobacillus salivarius  
  
isolates have the potential to control bacterial infections due to their strong  
antimicrobial activity against Pasteurella multocida and their ability to activate the  
  
signaling cascade mediated by NF-kB in macrophages. On the other side,  
  
Lactiplantibacillus plantarum and Lacticaseibacillus paracasei isolates promote the  
activation of the interferon antiviral pathway. Pediococci show a great beneficial  
  
potential, especially the pediocin-producer Pediococcus acidilactici isolate that shows a  
very potent antimicrobial activity against Listeria monocytogenes and its phylogenetic  
  
origin is related to safe strains. Enterococci produce several bacteriocins such as  
sactipeptides and lanthipeptides that inhibit the pathogen Escherichia coli, but their  
  
phylogenetic origin is related to pathogenic strains and they also contain several  
virulence determinants and antimicrobial resistance genes in the genome, which  
  
correlate with their phenotype. Therefore, the harmful risk of enterococci outweighs  
the beneficial potential.  
  
  
  
  
  
 330 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 331:  
 CON | ENG  
  
  
  
Chapter III à objective III. To determine the nature of the antimicrobial fraction  
  
and to study the synergy of the metabolites optimally secreted to the supernatant with  
a selection of antibiotics against important pathogens in veterinary medicine.  
  
  
The detection of the microbial growth phase in which the maximum antimicrobial  
  
activity occurs has led to the optimization of the production of metabolites, which act  
in synergy with several antibiotics commonly used in veterinary medicine, mainly  
  
amoxicillin or doxycycline, against pathogens Escherichia coli and Pasteurella multocida,  
respectively. Within these metabolites, the protein fraction, including bacteriocins of  
  
different classes, contributes significantly to the antimicrobial activity displayed by the  
  
lactic acid bacteria.  
  
  
Conclusions from block II: in vivo animal experiments  
  
  
  
Chapter IV à objective IV. To study the effect of the oral administration of a  
  
supplement produced from lactic acid bacteria metabolites in combination with the  
  
antibiotic therapy for the control of an experimental pneumonia in a mouse model.  
  
  
  
The oral supplement developed for the control of an experimental pneumonia  
  
produced by the pathogen Pasteurella multocida favors the survival of infected mice  
with the absolute lethal dose when combined with antibiotic therapy. This  
  
experimental model validates the procedures of beneficial lactic acid bacteria screening  
  
and selection and constitutes the preliminary step for the postbiotic elaboration before  
its application in real conditions.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 331

Página 332:  
CON | ENG  
  
  
  
Chapter V à objective V. To analyze the effect of the administration of a lactic acid  
  
bacteria-derived postbiotic on the health indicators and the productive parameters in a  
  
lamb feedlot.  
  
  
The administration of postbiotics specifically designed to control the processes  
produced by the pathogen Pasteurella multocida in a lamb feedlot improves the  
  
prevalence and severity of pneumonic lesions and is associated with a higher growth  
rate of the animals, which translates into a better feed efficiency. This sanitary approach  
  
directly favors the resolution of an infectious problem and has an indirect impact on the  
  
productive parameters, with the consequent improvement in the profitability of  
production animals. The use of postbiotics in livestock could be a tool to limit the  
  
administration of antimicrobials to therapeutic situations and would allow meeting the  
increase in demand for products of animal origin without compromising animal or  
  
human health.  
  
  
  
Chapter VI à objective VI. To evaluate the effect of a postbiotic product  
  
administered during the supplementation period on the epidemiological situation of  
  
tuberculosis in wild boar populations.  
  
  
  
Supplementation with antimycobacterial and immunomodulatory metabolites included  
  
in a postbiotic specifically developed for the control of tuberculosis is associated with  
a decrease in the incidence, as well as in the presence of lesions compatible with this  
  
disease and in the seroprevalence of antibodies against M. bovis in populations of  
naturally exposed wild boar. The use of postbiotics can be considered as a feasible  
  
strategy for tuberculosis control and could be introduced as a complementary tool in  
  
large-scale eradication programs of the disease, not only in wildlife and livestock but  
also in human medicine.  
  
  
  
 332 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 333:  
 CON | ENG  
  
Conclusions from block III: technology and scientific knowledge  
  
transfer  
  
  
  
Chapter VII à objective VII. To transfer the technology and scientific knowledge  
  
derived from this doctoral thesis through the application of invention patents, the  
  
application of knowledge to the development of processes in the company and the  
  
dissemination of the results by attending congresses and publishing in scientific journals  
and popular press.  
  
  
The scientific knowledge generated from the development of this Industrial Doctorate  
  
thesis has had a significant impact on the activity of INGULADOS, improving the  
competitiveness of the company within its sector. A new line of work has been created,  
  
within the Product Development Department, which has led to the launch of an  
innovative range of postbiotic products, as well as the establishment of a new job profile  
  
for Quality Manager. The technology transfer has resulted in the application for two  
  
invention patents and the scientific knowledge generated has been communicated  
through the publication of several scientific articles in high-impact journals, abundant  
  
dissemination articles in magazines and channels aimed at target professionals and  
assistance to numerous conferences and seminars.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 333

Página 334:  
CON | ENG  
  
 great future prospects for the use of innovative elements in Animal Health and  
  
Production.  
  
  
  
  
  
 334 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 335:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
  
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 335

Página 336:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
  
  
  
 336 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 337:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Acevedo-Whitehouse, K., Vicente, J., Gortazar, C., Höfle, U., Fernández-de-Mera, I., y  
  
 Amos, W. (2005). Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild  
  
 boar. Molecular Ecology, 14(10), 3209–3217.  
  
Aderem, A. (2003). Phagocytosis and the inflammatory response. The Journal of  
  
 Infectious Diseases, 187(Supplement\_2), S340-5.  
  
Adesina, I., y Enerijiofi, K. (2016). Effect of pH and heat treatment on bacteriocin activity  
  
 of Pediococcus pentosaceus IO1, Tetragenococcus halophilus PO9 and  
  
 Lactobacillus cellobiosus BE1. SAU Science-Tech Journal, 1(1), 113-118.  
  
Afdora, P. T., Ardiyati, T., Sjofjan, O., y Kalsum, U. (2010). Potential antibacterials  
  
 compounds of lactic acid bacteria (LAB) from quail intestine (Coturnix japonica)  
  
 in inhibition growth of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Journal of  
  
 Tropical Life Science, 1(1), 28–31.  
  
Aguilar-Toalá, J., Garcia-Varela, R., Garcia, H., Mata-Haro, V., González-Córdova, A.,  
  
 Vallejo-Cordoba, B., y Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving  
  
 term within the functional foods field. Trends in Food Science y Technology, 75,  
  
 105–114.  
  
Ahern, P. P., y Maloy, K. J. (2020). Understanding immune–microbiota interactions in  
  
 the intestine. Immunology, 159(1), 4–14.  
  
Ai, L., Chen, C., Zhou, F., Wang, L., Zhang, H., Chen, W., y Guo, B. (2011). Complete  
  
 genome sequence of the probiotic strain Lactobacillus casei BD-II. Journal of  
  
 Bacteriology, 193(12), 3160-3161.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 337

Página 338:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Aktas, B., De Wolfe, T. J., Tandee, K., Safdar, N., Darien, B. J., y Steele, J. L. (2015). The  
  
 effect of Lactobacillus casei 32G on the mouse cecum microbiota and innate  
  
 immune response is dose and time dependent. PloS One, 10(12), e0145784.  
  
Akter, T., Rahman, M. M., Tay, A. C. Y., Ehsan, R., y Islam, M. T. (2020). Whole-Genome  
  
 Sequence of Fish-Pathogenic Enterococcus faecalis Strain BFFF11. Microbiology  
  
 Resource Announcements, 9(7), e01447-19.  
  
Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., y Helander, I.  
  
 (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer  
  
 membrane. Applied and Environmental Microbiology, 66(5), 2001–2005.  
  
Alam, A., y Neish, A. (2018). Role of gut microbiota in intestinal wound healing and  
  
 barrier function. Tissue Barriers, 6(3), 1539595.  
  
Alexandratos, N., y Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050: The 2012  
  
 revision. ESA Working paper No. 12-03. Rome, FAO.  
  
Ali, L., Goraya, M. U., Arafat, Y., Ajmal, M., Chen, J.-L., y Yu, D. (2017). Molecular  
  
 mechanism of quorum-sensing in Enterococcus faecalis: Its role in virulence and  
  
 therapeutic approaches. International Journal of Molecular Sciences, 18(5), 960.  
  
Al-Otaibi, H. S., Gashgari, R. M., Mohammed, A. E., Almojel, S. A., Elobeid, M. M., y Al  
  
 Abrahaim, J. S. (2016). Investigation of the growth ability of probiotic  
  
 (Lactobacillus and Bifidobacterium) in infant’s milk under different  
  
 environmental conditions. Biomedical and Pharmacology Journal, 9(2), 451–462.  
  
Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., y Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of  
  
 lactic acid bacteria: Extending the family. Applied Microbiology and  
  
 Biotechnology, 100(7), 2939–2951.  
  
  
  
 338 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 339:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Amado, I. R., Fuciños, C., Fajardo, P., y Pastrana, L. (2016). Pediocin SA-1: A selective  
  
 bacteriocin for controlling Listeria monocytogenes in maize silages. Journal of  
  
 Dairy Science, 99(10), 8070–8080.  
  
Amat, S., Timsit, E., Baines, D., Yanke, J., y Alexander, T. W. (2019). Development of  
  
 bacterial therapeutics against the bovine respiratory pathogen Mannheimia  
  
 haemolytica. Applied and Environmental Microbiology, 85(21), e01359-19.  
  
Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G., y Nissen-Meyer, J. (1998).  
  
 Antagonistic activity of Lactobacillus plantarum C11: Two new two-peptide  
  
 bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A.  
  
 Applied and Environmental Microbiology, 64(6), 2269–2272.  
  
Aranaz, A., De Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Alvarez, J., Romero,  
  
 B., Bezos, J., y Vela, A. I. (2004). Bovine tuberculosis (Mycobacterium bovis) in  
  
 wildlife in Spain. Journal of Clinical Microbiology, 42(6), 2602–2608.  
  
Ayele, W., Neill, S., Zinsstag, J., Weiss, M., y Pavlik, I. (2004). Bovine tuberculosis: An old  
  
 disease but a new threat to Africa. The International Journal of Tuberculosis and  
  
 Lung Disease, 8(8), 924–937.  
  
Bahrndorff, S., Alemu, T., Alemneh, T., y Lund Nielsen, J. (2016). The microbiome of  
  
 animals: Implications for conservation biology. International Journal of  
  
 Genomics, 2016.  
  
Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., y Bryden, W. L. (2016a). Probiotics in animal  
  
 nutrition: Production, impact and regulation. FAO.  
  
Baker, K. S. (2020). Microbe hunting in the modern era: Reflecting on a decade of  
  
 microbial genomic epidemiology. Current Biology, 30(19), R1124–R1130.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 339

Página 340:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V.  
  
 M., Nikolenko, S. I., Pham, S., y Prjibelski, A. D. (2012). SPAdes: A new genome  
  
 assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. Journal of  
  
 Computational Biology, 19(5), 455–477.  
  
Barasona, J. A., Torres, M. J., Aznar, J., Gortázar, C., y Vicente, J. (2017). DNA detection  
  
 reveals Mycobacterium tuberculosis complex shedding routes in its wildlife  
  
 reservoir the Eurasian wild boar. Transboundary and Emerging Diseases, 64(3),  
  
 906–915.  
  
Bárcena, J. B., Siñeriz, F., de Llano, D. G., Rodríguez, A., y Suárez, J. E. (1998). Chemostat  
  
 Production of Plantaricin C ByLactobacillus plantarum LL441. Applied and  
  
 Environmental Microbiology, 64(9), 3512–3514.  
  
Barragán, P. J., Sanchez, O. J., y Henao-Rojas, J. C. (2020). Evaluation of the Growth  
  
 Kinetics of Lactobacillus Plantarum ATCC 8014 on a Medium Based on  
  
 Hydrolyzed Bovine Blood Plasma at Laboratory and Bench-Scale Levels and Its  
  
 Application as a Starter Culture in a Meat Product. Fermentation, 6(2), 45.  
  
Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I., y Biron, E. (2018). Synthesis,  
  
 antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin  
  
 pediocin PA-1 and analogs thereof. Scientific Reports, 8(1), 1–13.  
  
Belkaid, Y., y Hand, T. W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation.  
  
 Cell, 157(1), 121–141.  
  
Beltrán-Beck, B., Ballesteros, C., Vicente, J., De la Fuente, J., y Gortázar, C. (2012).  
  
 Progress in oral vaccination against tuberculosis in its main wildlife reservoir in  
  
 Iberia, the Eurasian wild boar. Veterinary Medicine International, 2012.  
  
  
  
 340 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 341:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Braïek, O.B., y Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between emerging pathogens and  
  
 potential probiotics. BioMed Research International, 2019.  
  
Bene, K. P., Kavanaugh, D. W., Leclaire, C., Gunning, A. P., MacKenzie, D. A., Wittmann,  
  
 A., Young, I. D., Kawasaki, N., Rajnavolgyi, E., y Juge, N. (2017). Lactobacillus  
  
 reuteri surface mucus adhesins upregulate inflammatory responses through  
  
 interactions with innate C-type lectin receptors. Frontiers in Microbiology, 8,  
  
 321.  
  
Bizani, D., y Brandelli, A. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a newly  
  
 isolated Bacillus sp. Strain 8 A. Journal of Applied Microbiology, 93(3), 512–519.  
  
Blumenthal, D. K., y Garrison, J. C. (2011). Pharmacodynamics: Molecular mechanisms  
  
 of drug action. Goodman and Gilman’s the Pharmacological Basis of  
  
 Therapeutics. San Diego: The McGraw-Hill Companies, 41–71.  
  
Boadella, M., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., De la Fuente, J., y Gortázar, C. (2012). Effects of  
  
 culling Eurasian wild boar on the prevalence of Mycobacterium bovis and  
  
 Aujeszky’s disease virus. Preventive Veterinary Medicine, 107(3–4), 214–221.  
  
Boitani, L. (1992). Aging wild boar (Sus scrofa) by tooth eruption. Ongules/Ungulates,  
  
 91, 419–421.  
  
Borsuk, S., Mendum, T. A., Fagundes, M. Q., Michelon, M., Cunha, C. W., McFadden, J.,  
  
 y Dellagostin, O. A. (2007). Auxotrophic complementation as a selectable marker  
  
 for stable expression of foreign antigens in Mycobacterium bovis BCG.  
  
 Tuberculosis, 87(6), 474–480.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 341

Página 342:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Bravo, M. (2019). Resistencias antimicrobianas: A propósito de una investigación sobre  
  
 la prevalencia en trabajadores de la Universidad de Extremadura. Servicio de  
  
 Publicaciones de la Universidad de Extremadura.  
  
Bravo, M., Iglesias, R., y Palomo, G. (2020). Situación del sector ovino y caprino en  
  
 España. In Principales enfermedades infecciosas y parasitarias del ganado ovino  
  
 y caprino en España (pp. 19–40). Servicio de Publicaciones UEx.  
  
Briones, V., De Juan, L., Sánchez, C., Vela, A.-I., y Galka, M. (2000). Bovine tuberculosis  
  
 and the endangered Iberian lynx. Emerging Infectious Diseases, 6(2), 189.  
  
Broadbent, J. R., Neeno-Eckwall, E. C., Stahl, B., Tandee, K., Cai, H., Morovic, W., Horvath,  
  
 P., Heidenreich, J., Perna, N. T., y Barrangou, R. (2012). Analysis of the  
  
 Lactobacillus casei supragenome and its influence in species evolution and  
  
 lifestyle adaptation. BMC Genomics, 13(1), 1–18.  
  
Brosch, R., Gordon, S. V., Buchrieser, C., Pym, A. S., Garnier, T., y Cole, S. T. (2000).  
  
 Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in  
  
 Mycobacterium bovis BCG Pasteur. Yeast, 17(2), 111–123.  
  
Buddle, B. M., Vordermeier, H. M., Chambers, M. A., y de Klerk-Lorist, L.-M. (2018).  
  
 Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic  
  
 livestock and wildlife. Frontiers in Veterinary Science, 5, 259.  
  
Buffie, C. G., y Pamer, E. G. (2013). Microbiota-mediated colonization resistance against  
  
 intestinal pathogens. Nature Reviews Immunology, 13(11), 790–801.  
  
Busarcevic, M., y Dalgalarrondo, M. (2012). Purification and genetic characterisation of  
  
 the novel bacteriocin LS2 produced by the human oral strain Lactobacillus  
  
 salivarius BGHO1. International Journal of Antimicrobial Agents, 40(2), 127–134.  
  
  
  
 342 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 343:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Byers, S. R., y Kramer, J. W. (2010). Normal hematology of sheep and goats. In Schalm’s  
  
 Veterinary Hematology (6th ed., pp. 862–869). Blackwell Publishing.  
  
Byrne, A. W., Allen, A. R., O’Brien, D. J., y Miller, M. A. (2019). Bovine Tuberculosis—  
  
 International Perspectives on Epidemiology and Management. Frontiers in  
  
 Veterinary Science, 6, 202.  
  
Cambier, C., Falkow, S., y Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation  
  
 schemes of Mycobacterium tuberculosis. Cell, 159(7), 1497–1509.  
  
Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill,  
  
 C., y O’Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in  
  
 Lactobacillus spp. Applied and Environmental Microbiology, 85(1), e01738-18.  
  
Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L.,  
  
 Aarestrup, F. M., y Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids  
  
 using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrobial  
  
 Agents and Chemotherapy, 58(7), 3895–3903.  
  
Cardona, P., Marzo-Escartín, E., Tapia, G., Díaz, J., García, V., Varela, I., Vilaplana, C., y  
  
 Cardona, P.-J. (2016). Oral administration of heat-killed Mycobacterium  
  
 manresensis delays progression toward active tuberculosis in C3HeB/FeJ mice.  
  
 Frontiers in Microbiology, 6, 1482.  
  
Casadei, G., Grilli, E., y Piva, A. (2009). Pediocin A modulates intestinal microflora  
  
 metabolism in swine in vitro intestinal fermentations. Journal of Animal Science,  
  
 87(6), 2020–2028.  
  
Cebrián, R., Rodríguez-Cabezas, M. E., Martín-Escolano, R., Rubiño, S., Garrido-Barros,  
  
 M., Montalbán-López, M., Rosales, M. J., Sánchez-Moreno, M., Valdivia, E., y  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 343

Página 344:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
 Martínez-Bueno, M. (2019). Preclinical studies of toxicity and safety of the AS-48  
  
 bacteriocin. Journal of Advanced Research, 20, 129–139.  
  
Cetinkaya, Y., Falk, P., y Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. Clinical  
  
 Microbiology Reviews, 13(4), 686–707.  
  
Che’Amat, A., Armenteros, J. A., González-Barrio, D., Lima, J., Díez-Delgado, I., Barasona,  
  
 J. A., Romero, B., Lyashchenko, K. P., Ortiz, J.-A., y Gortázar, C. (2016). Is targeted  
  
 removal a suitable means for tuberculosis control in wild boar? Preventive  
  
 Veterinary Medicine, 135, 132–135.  
  
Chen, Y. E., Fischbach, M. A., y Belkaid, Y. (2018). Skin microbiota–host interactions.  
  
 Nature, 553(7689), 427–436.  
  
Ch’ng, J.-H., Chong, K. K., Lam, L. N., Wong, J. J., y Kline, K. A. (2019). Biofilm-associated  
  
 infection by enterococci. Nature Reviews Microbiology, 17(2), 82–94.  
  
Cho, S. W., Yang, J., Park, S., Kim, B., y Seo, S. W. (2019). Complete Genome Sequence  
  
 of Lactic Acid Bacterium Pediococcus acidilactici Strain ATCC 8042, an Autolytic  
  
 Anti-bacterial Peptidoglycan Hydrolase Producer. Biotechnology and Bioprocess  
  
 Engineering, 24(3), 483–487.  
  
Choi, E. A., y Chang, H. C. (2015). Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic  
  
 strain Lactobacillus plantarum EM isolated from kimchi. LWT-Food Science and  
  
 Technology, 62(1), 210–217.  
  
Cicenia, A., Scirocco, A., Carabotti, M., Pallotta, L., Marignani, M., y Severi, C. (2014).  
  
 Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. Journal of Clinical  
  
 Gastroenterology, 48, S18–S22.  
  
  
  
  
  
 344 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 345:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Cleveland, J., Chikindas, M., y Montville, T. J. (2002). Multimethod assessment of  
  
 commercial nisin preparations. Journal of Industrial Microbiology and  
  
 Biotechnology, 29(5), 228–232.  
  
Collado, M., Vinderola, G., y Salminen, S. (2019). Postbiotics: Facts and open questions.  
  
 A position paper on the need for a consensus definition. Beneficial Microbes,  
  
 10(7), 711–719.  
  
Reglamento (CE) 429/2008 de la comisión de 25 de abril de 2008 sobre normas de  
  
 desarrollo para la aplicación del Reglamento (CE) 1831/2003 del Parlamento  
  
 Europeo y del Consejo por lo que se refiere a la preparación y presentación de  
  
 solicitudes y a la evaluación y autorización de aditivos para piensos, (2008).  
  
Coque, T. M., Singh, K. V., Weinstock, G. M., y Murray, B. E. (1999). Characterization of  
  
 Dihydrofolate Reductase Genes from Trimethoprim-Susceptible and  
  
 Trimethoprim-Resistant Strains of Enterococcus faecalis. Antimicrobial Agents  
  
 and Chemotherapy, 43(1), 141–147.  
  
Corner, L. A. (2006). The role of wild animal populations in the epidemiology of  
  
 tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. Veterinary  
  
 Microbiology, 112(2–4), 303–312.  
  
Correa-Fiz, F., Blanco-Fuertes, M., Navas, M. J., Lacasta, A., Bishop, R. P., Githaka, N.,  
  
 Onzere, C., Le Potier, M.-F., Almagro-Delgado, V., y Martinez, J. (2019).  
  
 Comparative analysis of the fecal microbiota from different species of  
  
 domesticated and wild suids. Scientific Reports, 9(1), 1–15.  
  
Cosma, C. L., Sherman, D. R., y Ramakrishnan, L. (2003). The secret lives of the  
  
 pathogenic mycobacteria. Annual Reviews in Microbiology, 57(1), 641–676.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 345

Página 346:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Rubiralta, M., Bellavista, J. (2003). Nuevos mecanismos de transferencia de tecnología.  
  
 Debilidades y oportunidades del sistema español de transferencia de tecnología.  
  
 Libro Nº 9 de la Colección de Encuentros Empresariales CONEC. Fundación Cotec  
  
 Para La Innovación Tecnológica.  
  
Cotter, P. D., Hill, C., y Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for  
  
 food. Nature Reviews Microbiology, 3(10), 777–788.  
  
Cumming, B. M., y Steyn, A. J. (2015). Metabolic plasticity of central carbon metabolism  
  
 protects mycobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences,  
  
 112(43), 13135–13136.  
  
De la Rua-Domenech, R. (2006). Human Mycobacterium bovis infection in the United  
  
 Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects  
  
 of bovine tuberculosis. Tuberculosis, 86(2), 77–109.  
  
de Martino, M., Lodi, L., Galli, L., y Chiappini, E. (2019). Immune response to  
  
 Mycobacterium tuberculosis: A narrative review. Frontiers in Pediatrics, 7, 350.  
  
Deng, L., He, C., Zhou, Y., Xu, L., y Xiong, H. (2017). Ground transport stress affects  
  
 bacteria in the rumen of beef cattle: A real-time PCR analysis. Animal Science  
  
 Journal, 88(5), 790–797.  
  
Desriac, F., Defer, D., Bourgougnon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P., y Fleury, Y. (2010).  
  
 Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare:  
  
 Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. Marine Drugs,  
  
 8(4), 1153–1177.  
  
Diep, D. B., Håvarstein, L. S., y Nes, I. F. (1996). Characterization of the locus responsible  
  
 for the bacteriocin production in Lactobacillus plantarum C11. Journal of  
  
 Bacteriology, 178(15), 4472–4483.  
  
 346 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 347:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., y Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic  
  
 bacteriocin pln loci from Lactobacillus plantarum. Peptides, 30(8), 1562–1574.  
  
Díez-Delgado, I., Rodríguez, O., Boadella, M., Garrido, J. M., Sevilla, I. A., Bezos, J., Juste,  
  
 R., Domínguez, L., y Gortázar, C. (2017). Parenteral vaccination with heat-  
  
 inactivated mycobacterium bovis reduces the prevalence of tuberculosis-  
  
 compatible lesions in farmed wild boar. Transboundary and Emerging Diseases,  
  
 64(5), e18–e21.  
  
Díez-Delgado, I., Sevilla, I. A., Romero, B., Tanner, E., Barasona, J. A., White, A. R., Lurz,  
  
 P. W., Boots, M., de la Fuente, J., y Dominguez, L. (2018). Impact of piglet oral  
  
 vaccination against tuberculosis in endemic free-ranging wild boar populations.  
  
 Preventive Veterinary Medicine, 155, 11–20.  
  
Díez-Delgado, I., Sevilla, I. A., Garrido, J. M., Romero, B., Geijo, M. V., Dominguez, L.,  
  
 Juste, R. A., Aranaz, A., de la Fuente, J., y Gortazar, C. (2019). Tuberculosis  
  
 vaccination sequence effect on protection in wild boar. Comparative  
  
 Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 66, 101329.  
  
Dimitrieva-Moats, G. Y., y Ünlü, G. (2012). Development of freeze-dried bacteriocin-  
  
 containing preparations from lactic acid bacteria to inhibit Listeria  
  
 monocytogenes and Staphylococcus aureus. Probiotics and Antimicrobial  
  
 Proteins, 4(1), 27–38.  
  
Dina, J., Malbruny, B., y Leclercq, R. (2003). Nonsense mutations in the lsa-like gene in  
  
 Enterococcus faecalis isolates susceptible to lincosamides and streptogramins A.  
  
 Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(7), 2307–2309.  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 347

Página 348:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Dolasia, K., Bisht, M. K., Pradhan, G., Udgata, A., y Mukhopadhyay, S. (2018). TLRs/NLRs:  
  
 Shaping the landscape of host immunity. International Reviews of Immunology,  
  
 37(1), 3–19.  
  
du Teil Espina, M., Gabarrini, G., Harmsen, H. J., Westra, J., van Winkelhoff, A. J., y van  
  
 Dijl, J. M. (2019). Talk to your gut: The oral-gut microbiome axis and its  
  
 immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis. FEMS  
  
 Microbiology Reviews, 43(1), 1–18.  
  
Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., Leulier,  
  
 F., Gänzle, M., y Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: Evolution and natural  
  
 history of the genus Lactobacillus. FEMS Microbiology Reviews, 41(Supp\_1), S27–  
  
 S48.  
  
Ducarmon, Q., Zwittink, R., Hornung, B., van Schaik, W., Young, V., y Kuijper, E. (2019).  
  
 Gut microbiota and colonization resistance against bacterial enteric infection.  
  
 Microbiology and Molecular Biology Reviews, 83(3), e00007-19.  
  
Dumas, A., Corral, D., Colom, A., Levillain, F., Peixoto, A., Hudrisier, D., Poquet, Y., y  
  
 Neyrolles, O. (2018). The host microbiota contributes to early protection against  
  
 lung colonization by Mycobacterium tuberculosis. Frontiers in Immunology, 9,  
  
 2656.  
  
Dunbar, K. L., Scharf, D. H., Litomska, A., y Hertweck, C. (2017). Enzymatic carbon–sulfur  
  
 bond formation in natural product biosynthesis. Chemical Reviews, 117(8),  
  
 5521–5577.  
  
Dwivedi, M., Kumar, P., Laddha, N. C., y Kemp, E. H. (2016). Induction of regulatory T  
  
 cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. In  
  
  
  
 348 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 349:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
 Autoimmunity Reviews (Vol. 15, Issue 4, pp. 379–392). Elsevier B.V.  
  
 https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.01.002  
  
EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP).  
  
 (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials  
  
 of human and veterinary importance. EFSA Journal, 10(6), 2740.  
  
EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-  
  
 Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A.,  
  
 Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P.,  
  
 Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., … Herman, L. (2021).  
  
 Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to  
  
 food or feed as notified to EFSA 13: Suitability of taxonomic units notified to EFSA  
  
 until September 2020. EFSA Journal, 19(1), e06377.  
  
Ekblad, B., Kyriakou, P. K., Oppegård, C., Nissen-Meyer, J., Kaznessis, Y. N., y Kristiansen,  
  
 P. E. (2016). Structure–function analysis of the two-peptide bacteriocin  
  
 plantaricin EF. Biochemistry, 55(36), 5106–5116.  
  
Espinosa-Santos, V. (2010). Difusión y divulgación de la investigación científica. Idesia  
  
 (Arica), 28(3), 5–6.  
  
EUCAST. (2021). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.  
  
 Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0,  
  
 2021. Http://www.eucast.org.  
  
European Commission. (2017). Commission regulation (EU) 2017/1017 of 15 June 2017  
  
 amending Regulation (EU) No 68/2013 on the catalogue of feed materials.  
  
 Official J, 50, 48–119.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 349

Página 350:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
European Food Safety Authority (EFSA). (2007). Introduction of a Qualified Presumption  
  
 of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to  
  
 EFSA-Opinion of the Scientific Committee. EFSA Journal, 5(12), 587.  
  
FAO/WHO, E. C. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including  
  
 powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert  
  
 Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in  
  
 Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.  
  
Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M.-H., Lievin-Le Moal, V., y Servin,  
  
 A. L. (2005). PH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of  
  
 probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica Serovar Typhimurium. Applied  
  
 and Environmental Microbiology, 71(10), 6008–6013.  
  
Fellag, M., Gouba, N., Bedotto, M., Sakana, M., Zingué, D., Tarnagda, Z., Million, M., y  
  
 Drancourt, M. (2020). Culturomics Discloses Anti-Tubercular Enterococci  
  
 Exclusive of Pulmonary Tuberculosis: A Preliminary Report. Microorganisms,  
  
 8(10), 1544.  
  
Fernández-Llario, P. (2006). Jabalí (Sus scrofa). In Carrascal, L.M. y Salvador, A. (Eds.),  
  
 Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles.  
  
Ferran, A. A., Toutain, P.-L., y Bousquet-Mélou, A. (2011). Impact of early versus later  
  
 fluoroquinolone treatment on the clinical; microbiological and resistance  
  
 outcomes in a mouse-lung model of Pasteurella multocida infection. Veterinary  
  
 Microbiology, 148(2–4), 292–297.  
  
Fisher, K., y Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus.  
  
 Microbiology, 155(6), 1749–1757.  
  
  
  
 350 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 351:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Fitzgerald, S., y Kaneene, J. (2013). Wildlife reservoirs of bovine tuberculosis worldwide:  
  
 Hosts, pathology, surveillance, and control. Veterinary Pathology, 50(3), 488–  
  
 499.  
  
Fleige, S., Preißinger, W., Meyer, H., y Pfaffl, M. (2007). Effect of lactulose on growth  
  
 performance and intestinal morphology of pre-ruminant calves using a milk  
  
 replacer containing Enterococcus faecium. Animal, 1(3), 367–373.  
  
Flynn, S., Van Sinderen, D., Thornton, G. M., Holo, H., Nes, I. F., y Collins, J. K. (2002).  
  
 Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118,  
  
 a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium Lactobacillus salivarius  
  
 subsp. Salivarius UCC118The GenBank accession number for the sequence  
  
 reported in this paper is AF408405. Microbiology, 148(4), 973–984.  
  
Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., y Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and  
  
 evasion: The many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus.  
  
 Nature Reviews Microbiology, 12(1), 49–62.  
  
Ganguli, K., Collado, M. C., Rautava, J., Lu, L., Satokari, R., von Ossowski, I., Reunanen, J.,  
  
 de Vos, W. M., Palva, A., y Isolauri, E. (2015). Lactobacillus rhamnosus GG and its  
  
 SpaC pilus adhesin modulate inflammatory responsiveness and TLR-related gene  
  
 expression in the fetal human gut. Pediatric Research, 77(4), 528–535.  
  
Gao, H., Chi, X., Li, G., Qin, W., Song, P., Jiang, F., Liu, D., Zhang, J., Zhou, X., y Li, S. (2020).  
  
 Gut microbial diversity and stabilizing functions enhance the plateau adaptability  
  
 of Tibetan wild ass (Equus kiang). MicrobiologyOpen, e1025.  
  
García, C. E. V., Petrova, M., Claes, I. J., De Boeck, I., Verhoeven, T. L., Dilissen, E., von  
  
 Ossowski, I., Palva, A., Bullens, D. M., y Vanderleyden, J. (2015). Piliation of  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 351

Página 352:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
 Lactobacillus rhamnosus GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine  
  
 modulation in macrophages. Applied and Environmental Microbiology, 81(6),  
  
 2050–2062.  
  
García-Jiménez, W., Fernández-Llario, P., Benítez-Medina, J., Cerrato, R., Cuesta, J.,  
  
 García-Sánchez, A., Gonçalves, P., Martínez, R., Risco, D., y Salguero, F. (2013).  
  
 Reducing Eurasian wild boar (Sus scrofa) population density as a measure for  
  
 bovine tuberculosis control: Effects in wild boar and a sympatric fallow deer  
  
 (Dama dama) population in Central Spain. Preventive Veterinary Medicine,  
  
 110(3–4), 435–446.  
  
García-Jiménez, W., Bravo, M., Risco, D., Gonçalves, P., Montero, M. J., Martínez, C.,  
  
 Arenas, V., Horrillo, R., y Fernández-Llario, P. (2019). Pasteurelosis ovina: Utilidad  
  
 de los cuadros lesionales para el diagnóstico. Ganadería, 123, 38–43.  
  
Garrido, J. M., Sevilla, I. A., Beltrán-Beck, B., Minguijón, E., Ballesteros, C., Galindo, R. C.,  
  
 Boadella, M., Lyashchenko, K. P., Romero, B., y Geijo, M. V. (2011). Protection  
  
 against tuberculosis in Eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated  
  
 Mycobacterium bovis. PloS One, 6(9), e24905.  
  
Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S., Kumar, A., y Kapila, S. (2014). Bacteriocin production  
  
 and different strategies for their recovery and purification. Probiotics and  
  
 Antimicrobial Proteins, 6(1), 47–58.  
  
Gasbarrini, G., Bonvicini, F., y Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. Journal of Clinical  
  
 Gastroenterology, 50, S116–S119.  
  
Gazzaniga, F. S., y Kasper, D. L. (2018). Wild gut microbiota protects from disease. Cell  
  
 Research, 28(2), 135–136.  
  
  
  
 352 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 353:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Getahun, D., Getabalew, M., Zewdie, D., Alemneh, T., y Akeberegn, D. (2019). Urea  
  
 metabolism and recycling in ruminants. BJSTR, 20, 14790–14796.  
  
Gibson, K. M., Nguyen, B. N., Neumann, L. M., Miller, M., Buss, P., Daniels, S., Ahn, M. J.,  
  
 Crandall, K. A., y Pukazhenthi, B. (2019). Gut microbiome differences between  
  
 wild and captive black rhinoceros–implications for rhino health. Scientific  
  
 Reports, 9(1), 1–11.  
  
Gil Sánchez, J. (2003). Toxiinfecciones alimentarias: ¿una patología emergente?. Control  
  
 calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología  
  
 Clínica. Disponible en:  
  
 https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Toxialim.p  
  
 df  
  
Goldstein, E. J., Tyrrell, K. L., y Citron, D. M. (2015). Lactobacillus species: Taxonomic  
  
 complexity and controversial susceptibilities. Clinical Infectious Diseases,  
  
 60(suppl\_2), S98–S107.  
  
Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C., Darini, A. L. C., Felis, G. E., Sechi, L. A., Franco,  
  
 B. D., y De Martinis, E. C. (2008). Prevalence and characterization of Enterococcus  
  
 spp. Isolated from Brazilian foods. Food Microbiology, 25(5), 668–675.  
  
Gonzalez, C. F., y Kunka, B. S. (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and  
  
 sucrose fermentation in Pediococcus acidilactici. Applied and Environmental  
  
 Microbiology, 53(10), 2534–2538.  
  
González, J., Bello, J., Rodríguez, M., Navarro, T., Lacasta, D., Fernández, A., y De las  
  
 Heras, M. (2016). Lamb feedlot production in Spain: Most relevant health issues.  
  
 Small Ruminant Research, 142, 83–87.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 353

Página 354:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An immunobiologic process. Immunity, 44(3), 463–475.  
  
Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., y Vicente, J. (2006). Disease risk and  
  
 overabundance of game species. European Journal of Wildlife Research, 52, 81–  
  
 87.  
  
Gortazar, C., Diez-Delgado, I., Barasona, J. A., Vicente, J., De La Fuente, J., y Boadella, M.  
  
 (2015). The wild side of disease control at the wildlife-livestock-human interface:  
  
 A review. Frontiers in Veterinary Science, 1, 27.  
  
Gradisteanu-Pircalabioru, G., Popa, L. I., Marutescu, L., Gheorghe, I., Popa, M., Czobor  
  
 Barbu, I., Cristescu, R., y Chifiriuc, M.-C. (2021). Bacteriocins in the Era of  
  
 Antibiotic Resistance: Rising to the Challenge. Pharmaceutics, 13(2), 196.  
  
Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. Cold Spring Harbor  
  
 Perspectives in Medicine, 6(4), a025387.  
  
Grove, T. L., Himes, P. M., Hwang, S., Yumerefendi, H., Bonanno, J. B., Kuhlman, B., Almo,  
  
 S. C., y Bowers, A. A. (2017). Structural insights into thioether bond formation in  
  
 the biosynthesis of sactipeptides. Journal of the American Chemical Society,  
  
 139(34), 11734–11744.  
  
Gueimonde, M., Sánchez, B., de Los Reyes-Gavilán, C. G., y Margolles, A. (2013).  
  
 Antibiotic resistance in probiotic bacteria. Frontiers in Microbiology, 4, 202.  
  
Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., y Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool  
  
 for genome assemblies. Bioinformatics, 29(8), 1072–1075.  
  
Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., y Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential  
  
 oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with  
  
 food components. Food Microbiology, 26(2), 142–150.  
  
  
  
 354 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 355:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Halim, M., Mustafa, N. A. M., Othman, M., Wasoh, H., Kapri, M. R., y Ariff, A. B. (2017).  
  
 Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic  
  
 Pediococcus acidilactici ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high  
  
 acidity, bile salts and heat. LWT-Food Science and Technology, 81, 210–216.  
  
Han, N., Qiang, Y., y Zhang, W. (2016). ANItools web: A web tool for fast genome  
  
 comparison within multiple bacterial strains. Database, 2016, baw084.  
  
Hanchi, H., Hammami, R., Gingras, H., Kourda, R., Bergeron, M. G., Ben Hamida, J.,  
  
 Ouellette, M., y Fliss, I. (2017). Inhibition of MRSA and of Clostridium difficile by  
  
 durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics. Future Microbiology,  
  
 12(3), 205–212.  
  
Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., y Hammami, R. (2018). The genus Enterococcus:  
  
 Between probiotic potential and safety concerns—An update. Frontiers in  
  
 Microbiology, 9, 1791.  
  
Harkness, J. E., Turner, P. V., VandeWoude, S., y Wheler, C. L. (2013). Harkness and  
  
 Wagner’s biology and medicine of rabbits and rodents. John Wiley y Sons.  
  
Harris, H. M., Bourin, M. J., Claesson, M. J., y O’Toole, P. W. (2017). Phylogenomics and  
  
 comparative genomics of Lactobacillus salivarius, a mammalian gut commensal.  
  
 Microbial Genomics, 3(8).  
  
Harrison, X. A., Sewell, T., Fisher, M., y Antwis, R. E. (2020). Designing probiotic therapies  
  
 with broad-spectrum activity against a wildlife pathogen. Frontiers in  
  
 Microbiology, 10, 3134.  
  
Hayden, M., West, A., y Ghosh, S. (2006). NF-κ B and the immune response. Oncogene,  
  
 25(51), 6758–6780.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 355

Página 356:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
He, F., Qin, X., Xu, N., Li, P., Wu, X., Duan, L., Du, Y., Fang, R., Hardwidge, P. R., y Li, N.  
  
 (2020). Pasteurella multocida Pm0442 affects virulence gene expression and  
  
 targets TLR2 to induce inflammatory responses. Frontiers in Microbiology, 11,  
  
 1972.  
  
He, Y., Wen, Q., Yao, F., Xu, D., Huang, Y., y Wang, J. (2017). Gut–lung axis: The microbial  
  
 contributions and clinical implications. Critical Reviews in Microbiology, 43(1),  
  
 81–95.  
  
Hegarty, J. W., Guinane, C. M., Ross, R. P., Hill, C., y Cotter, P. D. (2016). Bacteriocin  
  
 production: A relatively unharnessed probiotic trait? F1000Research, 5.  
  
Herbin, S., Mathieu, F., Brulé, F., Branlant, C., Lefebvre, G., y Lebrihi, A. (1997).  
  
 Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by  
  
 Carnobacterium piscicola CP5 isolated from cheese. Current Microbiology, 35(6),  
  
 319–326.  
  
Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., y Margolles, A. (2015). Molecular players involved in  
  
 the interaction between beneficial bacteria and the immune system. Frontiers in  
  
 Microbiology, 6, 1285.  
  
Hochwind, K., Weinmaier, T., Schmid, M., van Hemert, S., Hartmann, A., Rattei, T., y  
  
 Rothballer, M. (2012). Draft genome sequence of Lactobacillus casei W56.  
  
 Journal of Bacteriology, 194(23), 6638.  
  
Hong, B.-Y., Maulén, N. P., Adami, A. J., Granados, H., Balcells, M. E., y Cervantes, J.  
  
 (2016). Microbiome changes during tuberculosis and antituberculous therapy.  
  
 Clinical Microbiology Reviews, 29(4), 915–926.  
  
  
  
  
  
 356 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 357:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Hooper, L. V., Midtvedt, T., y Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape  
  
 the nutrient environment of the mammalian intestine. Annual Review of  
  
 Nutrition, 22(1), 283–307.  
  
Hörmannsperger, G., von Schillde, M.-A., y Haller, D. (2013). Lactocepin as a protective  
  
 microbial structure in the context of IBD. Gut Microbes, 4(2), 152–157.  
  
Hsuan, S., Kannan, M. S., Jeyaseelan, S., Prakash, Y., Malazdrewich, C., Abrahamsen, M.,  
  
 Sieck, G., y Maheswaran, S. (1999). Pasteurella haemolyticaleukotoxin and  
  
 endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages  
  
 requires NF-κB activation and calcium elevation. Microbial Pathogenesis, 26(5),  
  
 263–273.  
  
Hu, C., Mayadas-Norton, T., Tanaka, K., Chan, J., y Salgame, P. (2000). Mycobacterium  
  
 tuberculosis infection in complement receptor 3-deficient mice. The Journal of  
  
 Immunology, 165(5), 2596–2602.  
  
Hu, Y., Feng, Y., Wu, J., Liu, F., Zhang, Z., Hao, Y., Liang, S., Li, B., Li, J., y Lv, N. (2019). The  
  
 gut microbiome signatures discriminate healthy from pulmonary tuberculosis  
  
 patients. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 9, 90.  
  
Huberman, Y., Malena, R., Lomónaco, J., Nievas, P., y Terzolo, H. (2015). Evaluación de  
  
 medios de cultivo para aislamiento de Pasteurella multocida. 9nas. Jornadas  
  
 Internacionales de Veterinaria Práctica, Mar del Plata.  
  
Humam, A. M., Loh, T. C., Foo, H. L., Samsudin, A. A., Mustapha, N. M., Zulkifli, I., y  
  
 Izuddin, W. I. (2019). Effects of Feeding Different Postbiotics Produced by  
  
 Lactobacillus plantarum on Growth Performance, Carcass Yield, Intestinal  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 357

Página 358:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
 Morphology, Gut Microbiota Composition, Immune Status, and Growth Gene  
  
 Expression in Broilers under Heat Stress. Animals, 9(9), 644.  
  
Hutchings, M. I., Palmer, T., Harrington, D. J., y Sutcliffe, I. C. (2009). Lipoprotein  
  
 biogenesis in Gram-positive bacteria: Knowing when to hold ‘em, knowing when  
  
 to fold ‘em. Trends in Microbiology, 17(1), 13–21.  
  
Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T.,  
  
 Creasy, H. H., Earl, A. M., FitzGerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-  
  
 Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny,  
  
 D. M., Sodergren, E. J., … The Human Microbiome Project Consortium. (2012).  
  
 Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature,  
  
 486(7402), 207–214. https://doi.org/10.1038/nature11234  
  
Informe Final Técnico-Financiero Programa Nacional de la Tuberculosis Bovina Año  
  
 2019. (2019). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.  
  
Izuddin, W. I., Loh, T. C., Foo, H. L., Samsudin, A. A., y Humam, A. M. (2019a). Postbiotic  
  
 L. plantarum RG14 improves ruminal epithelium growth, immune status and  
  
 upregulates the intestinal barrier function in post-weaning lambs. Scientific  
  
 Reports, 9(1), 1–10.  
  
Izuddin, W. I., Loh, T. C., Samsudin, A. A., Foo, H. L., Humam, A. M., y Shazali, N. (2019b).  
  
 Effects of postbiotic supplementation on growth performance, ruminal  
  
 fermentation and microbial profile, blood metabolite and GHR, IGF-1 and MCT-  
  
 1 gene expression in post-weaning lambs. BMC Veterinary Research, 15(1), 315.  
  
Jabés, D., Brunati, C., Candiani, G., Riva, S., Romanó, G., y Donadio, S. (2011). Efficacy of  
  
 the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by multidrug-  
  
  
  
 358 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 359:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
 resistant Gram-positive pathogens. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,  
  
 55(4), 1671–1676.  
  
Jacobsen, L., Wilcks, A., Hammer, K., Huys, G., Gevers, D., y Andersen, S. R. (2007).  
  
 Horizontal transfer of tet (M) and erm (B) resistance plasmids from food strains  
  
 of Lactobacillus plantarum to Enterococcus faecalis JH2-2 in the gastrointestinal  
  
 tract of gnotobiotic rats. FEMS Microbiology Ecology, 59(1), 158–166.  
  
Jaimee, G., y Halami, P. (2016). Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid  
  
 bacteria of food origin—An impending menace. Applied Microbiology and  
  
 Biotechnology, 100(3), 1137–1151.  
  
Jamet, E., Akary, E., Poisson, M.-A., Chamba, J.-F., Bertrand, X., y Serror, P. (2012).  
  
 Prevalence and characterization of antibiotic resistant Enterococcus faecalis in  
  
 French cheeses. Food Microbiology, 31(2), 191–198.  
  
Kanak, E. K., y Yilmaz, S. Ö. (2018). Maldi-tof mass spectrometry for the identification  
  
 and detection of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from local  
  
 cheeses. Food Science and Technology, 39, 462-469.  
  
Kaneko, J. J., Harvey, J. W., y Bruss, M. L. (2008). Clinical biochemistry of domestic  
  
 animals. Elsevier academic press.  
  
Kang, M., Ko, Y.-P., Liang, X., Ross, C. L., Liu, Q., Murray, B. E., y Höök, M. (2013).  
  
 Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix  
  
 molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation  
  
 via the classical pathway. Journal of Biological Chemistry, 288(28), 20520–20531.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 359

Página 360:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Kapitan, M., Niemiec, M. J., Steimle, A., Frick, J. S., y Jacobsen, I. D. (2018). Fungi as part  
  
 of the microbiota and interactions with intestinal bacteria. En M. Rodrigues (Ed.),  
  
 Fungal physiology and immunopathogenesis (264-293). Springer.  
  
Karczewski, J., Poniedziałek, B., Adamski, Z., y Rzymski, P. (2014). The effects of the  
  
 microbiota on the host immune system. Autoimmunity, 47(8), 494–504.  
  
Kaufmann, S. H., y Dorhoi, A. (2016). Molecular determinants in phagocyte-bacteria  
  
 interactions. Immunity, 44(3), 476–491.  
  
Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H.,  
  
 Yamazaki, Y., Tateno, Y., y Itoh, T. (2004). Structural and functional differences in  
  
 two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli.  
  
 Applied and Environmental Microbiology, 70(5), 2906–2911.  
  
Kawashima, T., Kosaka, A., Yan, H., Guo, Z., Uchiyama, R., Fukui, R., Kaneko, D., Kumagai,  
  
 Y., You, D.-J., y Carreras, J. (2013). Double-stranded RNA of intestinal commensal  
  
 but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon-β.  
  
 Immunity, 38(6), 1187–1197.  
  
Kehrenberg, C., Salmon, S. A., Watts, J. L., y Schwarz, S. (2001). Tetracycline resistance  
  
 genes in isolates of Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica,  
  
 Mannheimia glucosida and Mannheimia varigena from bovine and swine  
  
 respiratory disease: Intergeneric spread of the tet (H) plasmid pMHT1. Journal of  
  
 Antimicrobial Chemotherapy, 48(5), 631–640.  
  
Kim, S., Covington, A., y Pamer, E. G. (2017). The intestinal microbiota: Antibiotics,  
  
 colonization resistance, and enteric pathogens. Immunological Reviews, 279(1),  
  
 90–105.  
  
  
  
 360 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 361:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer,  
  
 R., Tarchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M., y Fiers, M. W. (2003). Complete  
  
 genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFS1. Proceedings of the  
  
 National Academy of Sciences, 100(4), 1990–1995.  
  
Kline, K., Fälker, S., Dahlberg, S., Normark, S., y Henriques-Normark, B. (2009). Bacterial  
  
 Adhesins in Host-Microbe Interactions. Cell Host y Microbe, 5, 580–592.  
  
 https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.011  
  
Klose, V., Bayer, K., Kern, C., Goelß, F., Fibi, S., y Wegl, G. (2014). Antibiotic resistances  
  
 of intestinal lactobacilli isolated from wild boars. Veterinary Microbiology,  
  
 168(1), 240–244.  
  
Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C., y Akira, S. (2008). Innate immune response to viral  
  
 infection. Cytokine, 43(3), 336–341.  
  
Kristinsson, G., y Adam, H. (2007). Pasteurella multocida infections. Pediatr. Rev, 28(2),  
  
 472-473.  
  
Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., Siezen, R. J., y De Vos, W. M. (1993). Characterization  
  
 of the nisin gene cluster nisABTCIPR of Lactococcus lactis: Requirement of  
  
 expression of the nisA and nisIgenes for development of immunity. European  
  
 Journal of Biochemistry, 216(1), 281–291.  
  
Lacasta, D., Ferrer, L., Ramos, J., González, J., y De las Heras, M. (2008). Influence of  
  
 climatic factors on the development of pneumonia in lambs. Small Ruminant  
  
 Research, 80(1–3), 28–32.  
  
Latimer, K. S. (2011). Duncan and Prasse’s veterinary laboratory medicine: Clinical  
  
 pathology. John Wiley y Sons.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 361

Página 362:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Lawrence, T. L. J., Fowler, V. R., y Novakofski, J. E. (2012). Growth of farm animals. Cabi.  
  
Lebedeva, E., Bagaev, A., Pichugin, A., Chulkina, M., Lysenko, A., Tutykhina, I., Shmarov,  
  
 M., Logunov, D., Naroditsky, B., y Ataullakhanov, R. (2018). The differences in  
  
 immunoadjuvant mechanisms of TLR3 and TLR4 agonists on the level of antigen-  
  
 presenting cells during immunization with recombinant adenovirus vector. BMC  
  
 Immunology, 19(1), 1–14.  
  
LeBel, G., Piché, F., Frenette, M., Gottschalk, M., y Grenier, D. (2013). Antimicrobial  
  
 activity of nisin against the swine pathogen Streptococcus suis and its synergistic  
  
 interaction with antibiotics. Peptides, 50, 19–23.  
  
LeBlanc, J., Laiño, J. E., del Valle, M. J., Vannini, V. v, van Sinderen, D., Taranto, M. P., de  
  
 Valdez, G. F., de Giori, G. S., y Sesma, F. (2011). B-Group vitamin production by  
  
 lactic acid bacteria–current knowledge and potential applications. Journal of  
  
 Applied Microbiology, 111(6), 1297–1309.  
  
Lebreton, F., Willems, R. J., y Gilmore, M. S. (2014). Enterococcus diversity, origins in  
  
 nature, and gut colonization. In Enterococci: From commensals to leading causes  
  
 of drug resistant infection [Internet]. Massachusetts Eye and Ear Infirmary.  
  
Lee, W.-J., y Hase, K. (2014). Gut microbiota–generated metabolites in animal health  
  
 and disease. Nature Chemical Biology, 10(6), 416–424.  
  
Leonard, M. T., Valladares, R. B., Ardissone, A., Gonzalez, C. F., Lorca, G. L., y Triplett, E.  
  
 W. (2014). Complete genome sequences of Lactobacillus johnsonii strain N6. 2  
  
 and Lactobacillus reuteri strain TD1. Genome Announcements, 2(3), e00397-14.  
  
Li, F., Shah, A. M., Wang, Z., Peng, Q., Hu, R., Zou, H., Tan, C., Zhang, X., Liao, Y., y Wang,  
  
 Y. (2019). Effects of Land Transport Stress on Variations in Ruminal Microbe  
  
 Diversity and Immune Functions in Different Breeds of Cattle. Animals, 9(9), 599.  
  
 362 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 363:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Li, J. B., Lee, D. S. W., y Madrenas, J. (2013). Evolving bacterial envelopes and plasticity  
  
 of TLR2-dependent responses: Basic research and translational opportunities.  
  
 Frontiers in Immunology, 4, 347.  
  
Litvak, Y., y Bäumler, A. J. (2019). The founder hypothesis: A basis for microbiota  
  
 resistance, diversity in taxa carriage, and colonization resistance against  
  
 pathogens. PLoS Pathogens, 15(2), e1007563.  
  
Liu, H., Zhang, L., Yi, H., Han, X., y Chi, C. (2016). Identification and characterization of  
  
 plantaricin Q7, a novel plantaricin produced by Lactobacillus plantarum Q7. LWT-  
  
 Food Science and Technology, 71, 386–390.  
  
Liu, W., Pang, H., Zhang, H., y Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In Lactic  
  
 acid bacteria (pp. 103–203). Springer.  
  
Loh, T. C., Foo, H. L., Sazili, A. Q., y Bejo, M. H. (2014). Effects of feeding different  
  
 postbiotic metabolite combinations produced by Lactobacillus plantarumstrains  
  
 on egg quality and production performance, faecal parameters and plasma  
  
 cholesterol in laying hens. BMC Veterinary Research, 10(1), 149.  
  
López, M. M., Jiménez, S. P., y González, S. V. (2007). Probioticos: Potencial para prevenir  
  
 y curar. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 1(2), 573.  
  
Luciano, S. A., y Roess, A. (2020). Human zoonotic tuberculosis and livestock exposure  
  
 in low-and middle-income countries: A systematic review identifying challenges  
  
 in laboratory diagnosis. Zoonoses and Public Health, 67(2), 97–111.  
  
Luo, M., Liu, Y., Wu, P., Luo, D.-X., Sun, Q., Zheng, H., Hu, R., Pandol, S. J., Li, Q.-F., y Han,  
  
 Y.-P. (2017). Alternation of gut microbiota in patients with pulmonary  
  
 tuberculosis. Frontiers in Physiology, 8, 822.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 363

Página 364:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
MacKenzie, D. A., McLay, K., Roos, S., Walter, J., Swarbreck, D., Drou, N., Crossman, L.  
  
 C., y Juge, N. (2014). Draft genome sequence of a novel Lactobacillus salivarius  
  
 strain isolated from piglet. Genome Announcements, 2(1), e01231-13.  
  
Macuamule, C., Wiid, I., van Helden, P., Tanner, M., y Witthuhn, R. (2016). Effect of milk  
  
 fermentation by kefir grains and selected single strains of lactic acid bacteria on  
  
 the survival of Mycobacterium bovis BCG. International Journal of Food  
  
 Microbiology, 217, 170–176.  
  
Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2003). Microbial growth. Brock Biology of  
  
 Microorganisms, 137–166.  
  
Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R., y Ruiz-Barba, J. L. (2004). Induction of plantaricin  
  
 production in Lactobacillus plantarum NC8 after coculture with specific gram-  
  
 positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. Journal of  
  
 Bacteriology, 186(5), 1556–1564.  
  
Maldonado, A., Ruiz-Barba, J. L., y Jiménez-Díaz, R. (2004). Production of plantaricin NC8  
  
 by Lactobacillus plantarum NC8 is induced in the presence of different types of  
  
 gram-positive bacteria. Archives of Microbiology, 181(1), 8–16.  
  
Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Lucena-Padrós, H., y Ruiz-Barba, J. L.  
  
 (2013). Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among  
  
 plantaricin-producing Lactobacillus plantarum strains with different regulatory  
  
 operons. Food Microbiology, 33(1), 40–47.  
  
Marakalala, M. J., Martinez, F. O., Plüddemann, A., y Gordon, S. (2018). Macrophage  
  
 heterogeneity in the immunopathogenesis of tuberculosis. Frontiers in  
  
 Microbiology, 9, 1028.  
  
  
  
 364 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 365:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M. C., Mollet, B., y Poolman, B. (1997). Thermophilin  
  
 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions  
  
 without a receptor. Journal of Biological Chemistry, 272(22), 14277–14284.  
  
Marco, M. L., y Tachon, S. (2013). Environmental factors influencing the efficacy of  
  
 probiotic bacteria. Current Opinion in Biotechnology, 24(2), 207–213.  
  
Mariam, S. H. (2009). Interaction between lactic acid bacteria and Mycobacterium bovis  
  
 in Ethiopian fermented milk: Insight into the fate of M. bovis. Applied and  
  
 Environmental Microbiology, 75(6), 1790–1792.  
  
Martin, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L. M., y Hernandez, P. E. (2006).  
  
 Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors  
  
 of enterococci isolated from wood pigeons (Columba palumbus). Journal of Food  
  
 Protection, 69(3), 520–531.  
  
Martín-Hernando, M. P., Höfle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido,  
  
 J. M., de la Fuente, J., y Gortazar, C. (2007). Lesions associated with  
  
 Mycobacterium tuberculosis complex infection in the European wild boar.  
  
 Tuberculosis, 87(4), 360–367.  
  
Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B.,  
  
 Kleerebezem, M., van Hijum, S. A., y Leulier, F. (2016). Nomadic lifestyle of  
  
 Lactobacillus plantarum revealed by comparative genomics of 54 strains isolated  
  
 from different habitats. Environmental Microbiology, 18(12), 4974–4989.  
  
Martín-Palomino, Pedro. (2020, June 23). Pasteurella multocida tipo A en pequeños  
  
 rumiantes: ¿patógeno emergente? Bioseguridad, Bienestar y Patologías En  
  
 Pequeños Rumiantes. XXII Foro Nacional de Ovino 2020, Edición virtual.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 365

Página 366:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Matevosyan, L., Bazukyan, I., y Trchounian, A. (2019). Antifungal and antibacterial  
  
 effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on  
  
 cultivation media and duration of cultivation. BMC Microbiology, 19(1), 1–8.  
  
Mathur, H., Beresford, T. P., y Cotter, P. D. (2020). Health Benefits of Lactic Acid Bacteria  
  
 (LAB) Fermentates. Nutrients, 12(6), 1679.  
  
Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P. D., Hill, C., y Ross, R. P. (2017). Bacteriocin-  
  
 antimicrobial synergy: A medical and food perspective. Frontiers in Microbiology,  
  
 8, 1205.  
  
Matos, A., Andrade, S., Figueira, L., Matos, M., Pires, M., Coelho, A., y Pinto, M. (2016).  
  
 Mesenteric lymph node granulomatous lesions in naturally infected wild boar  
  
 (Sus scrofa) in Portugal—Histological, immunohistochemical and molecular  
  
 aspects. Veterinary Immunology and Immunopathology, 173, 21–26.  
  
Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M. J., Monedero, V., Correia,  
  
 K., Jacques, N., y Beaufils, S. (2010). Complete genome sequence of the probiotic  
  
 Lactobacillus casei strain BL23. Journal of Bacteriology, 192(10), 2647–2648.  
  
McCann, J. C., Elolimy, A. A., y Loor, J. J. (2017). Rumen microbiome, probiotics, and  
  
 fermentation additives. Veterinary Clinics: Food Animal Practice, 33(3), 539–553.  
  
McKenzie, V. J., Kueneman, J. G., y Harris, R. N. (2018). Probiotics as a tool for disease  
  
 mitigation in wildlife: Insights from food production and medicine. Annals of the  
  
 New York Academy of Sciences, 1429(1), 18–30.  
  
Meade, E., Slattery, M. A., y Garvey, M. (2020). Bacteriocins, potent antimicrobial  
  
 peptides and the fight against multi drug resistant species: Resistance is futile?  
  
 Antibiotics, 9(1), 32.  
  
  
  
 366 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 367:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Mekadim, C., Killer, J., Pechar, R., y Mrázek, J. (2019). Fragment of the aspartyl-tRNA  
  
 synthetase applicable as a shared classification and phylogenetic marker in  
  
 particular representatives of the order Lactobacillales. Folia Microbiologica,  
  
 64(1), 113–120.  
  
Menin, Á., Fleith, R., Reck, C., Marlow, M., Fernandes, P., Pilati, C., y Báfica, A. (2013).  
  
 Asymptomatic cattle naturally infected with Mycobacterium bovis present  
  
 exacerbated tissue pathology and bacterial dissemination. PloS One, 8(1),  
  
 e53884.  
  
Mentaberre, G., Romero, B., De Juan, L., Navarro-González, N., Velarde, R., Mateos, A.,  
  
 Marco, I., Olivé-Boix, X., Domínguez, L., y Lavín, S. (2014). Long-term assessment  
  
 of wild boar harvesting and cattle removal for bovine tuberculosis control in free  
  
 ranging populations. PLoS One, 9(2), e88824.  
  
Mijakovic, I., Poncet, S., Boël, G., Mazé, A., Gillet, S., Jamet, E., Decottignies, P.,  
  
 Grangeasse, C., Doublet, P., y Le Maréchal, P. (2003). Transmembrane  
  
 modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose  
  
 dehydrogenases. The EMBO Journal, 22(18), 4709–4718.  
  
Real Decreto 138/2020, de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en  
  
 materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como  
  
 reservorio de la tuberculosis (complejo Mycobacterium tuberculosis)., (2020).  
  
Mirkovic, N., Radulovic, Z., Uzelac, G., Lozo, J., Obradovic, D., Topisirovic, L., y Kojic, M.  
  
 (2015). Isolation and characterisation of bacteriocin and aggregation-promoting  
  
 factor production in Lactococcus lactis ssp. Lactis BGBM50 strain. Food  
  
 Technology and Biotechnology, 53(2), 237–242.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 367

Página 368:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Miró, J. M., y Gatell, J. M. (2000). Modelos experimentales de patología infecciosa.  
  
 Ediciones Doyma.  
  
Mohajeri, M. H., Brummer, R. J. M., Rastall, R. A., Weersma, R. K., Harmsen, H. J. M.,  
  
 Faas, M., y Eggersdorfer, M. (2018). The role of the microbiome for human  
  
 health: From basic science to clinical applications. European Journal of Nutrition,  
  
 57(S1), 1–14. https://doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4  
  
Mohamadzadeh, M., Olson, S., Kalina, W. V., Ruthel, G., Demmin, G. L., Warfield, K. L.,  
  
 Bavari, S., y Klaenhammer, T. R. (2005). Lactobacilli activate human dendritic  
  
 cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. Proceedings of the National  
  
 Academy of Sciences, 102(8), 2880–2885.  
  
Moreno, C., y Sanchez-Ibarrola, A. (2003). Receptores tipo Toll: Bases moleculares de la  
  
 relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario.  
  
 Revisiones Médicas de la Universidad de Navarra, 47(3), 29-33.  
  
Morris, T. (1995). Antibiotic therapeutics in laboratory animals. Laboratory Animals,  
  
 29(1), 16–36.  
  
Moya, A., Peretó, J., Gil, R., y Latorre, A. (2008). Learning how to live together: Genomic  
  
 insights into prokaryote–animal symbioses. Nature Reviews Genetics, 9(3), 218–  
  
 229.  
  
Nagai, Y., Garrett, K. P., Ohta, S., Bahrun, U., Kouro, T., Akira, S., Takatsu, K., y Kincade,  
  
 P. W. (2006). Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate  
  
 innate immune system replenishment. Immunity, 24(6), 801–812.  
  
Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J., y de la Fuente, J. (2008). Evidence of the role of  
  
 European wild boar as a reservoir of Mycobacterium tuberculosis complex.  
  
 Veterinary Microbiology, 127(1–2), 1–9.  
  
 368 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 369:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Nava, G. M., y Stappenbeck, T. S. (2011). Diversity of the autochthonous colonic  
  
 microbiota. Gut Microbes, 2(2), 99–104.  
  
Navarro-Gonzalez, N., Porrero, M. C., Mentaberre, G., Serrano, E., Mateos, A., Cabal, A.,  
  
 Domínguez, L., y Lavín, S. (2015). Escherichia coli O157: H7 in wild boars (Sus  
  
 scrofa) and Iberian ibex (Capra pyrenaica) sharing pastures with free-ranging  
  
 livestock in a natural environment in Spain. Veterinary Quarterly, 35(2), 102–106.  
  
Negishi, H., Miki, S., Sarashina, H., Taguchi-Atarashi, N., Nakajima, A., Matsuki, K., Endo,  
  
 N., Yanai, H., Nishio, J., y Honda, K. (2012). Essential contribution of IRF3 to  
  
 intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction.  
  
 Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(51), 21016–21021.  
  
Nelson, R. (1999). Intrinsically vancomycin-resistant gram-positive organisms: Clinical  
  
 relevance and implications for infection control. Journal of Hospital Infection,  
  
 42(4), 275–282.  
  
Ng, Z. J., Zarin, M. A., Lee, C. K., y Tan, J. S. (2020). Application of bacteriocins in food  
  
 preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: A  
  
 review. RSC Advances, 10(64), 38937–38964.  
  
Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., y Pettersson, S.  
  
 (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. Science, 336(6086), 1262–  
  
 1267.  
  
Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., y Kristiansen, P. E. (2010).  
  
 Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins.  
  
 Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2(1), 52–60.  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 369

Página 370:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
O’Connor, C. M., Haydon, D. T., y Kao, R. R. (2012). An ecological and comparative  
  
 perspective on the control of bovine tuberculosis in Great Britain and the  
  
 Republic of Ireland. Preventive Veterinary Medicine, 104(3–4), 185–197.  
  
O’Donnell, M. M., Harris, H. M., Ross, R. P., y O’Toole, P. W. (2017). Core fecal microbiota  
  
 of domesticated herbivorous ruminant, hindgut fermenters, and monogastric  
  
 animals. Microbiologyopen, 6(5), e00509.  
  
Ołdak, A., Zielińska, D., Rzepkowska, A., y Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Comparison of  
  
 antibacterial activity of Lactobacillus plantarum strains isolated from two  
  
 different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski cheese.  
  
 BioMed Research International, 2017, 6820369.  
  
Oppegård, C., Kjos, M., Veening, J., Nissen-Meyer, J., y Kristensen, T. (2016). A putative  
  
 amino acid transporter determines sensitivity to the two-peptide bacteriocin  
  
 plantaricin JK. MicrobiologyOpen, 5(4), 700–708.  
  
Orhan, G., Bayram, A., Zer, Y., y Balci, I. (2005). Synergy tests by E test and checkerboard  
  
 methods of antimicrobial combinations against Brucella melitensis. Journal of  
  
 Clinical Microbiology, 43(1), 140–143.  
  
O’Shea, E. F., O’Connor, P. M., Raftis, E. J., O’Toole, P. W., Stanton, C., Cotter, P. D., Ross,  
  
 R. P., y Hill, C. (2011). Production of multiple bacteriocins from a single locus by  
  
 gastrointestinal strains of Lactobacillus salivarius. Journal of Bacteriology,  
  
 193(24), 6973–6982.  
  
Pachón, J., Gavaldà, J., y Miró, J. M. (2000). Modelo de Neumonía. In Modelos  
  
 experimentales de patología infecciosa (José M Miró y José M Gatell, pp. 81–90).  
  
 Ediciones Doyma.  
  
  
  
 370 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 371:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Papagianni, M. (2012). Recent advances in engineering the central carbon metabolism  
  
 of industrially important bacteria. Microbial Cell Factories, 11(1), 1–13.  
  
Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., y Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from  
  
 lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. Brazilian  
  
 Archives of Biology and Technology, 50(3), 512–542.  
  
Pasparakis, M. (2012). Role of NF-κB in epithelial biology. Immunological Reviews,  
  
 246(1), 346–358.  
  
Pelzer, E., Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., y Nitert, M. D. (2017). Maternal health and  
  
 the placental microbiome. Placenta, 54, 30–37.  
  
Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: Lights  
  
 and shadows. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2, 86.  
  
Peters, V., van de Steeg, E., van Bilsen, J., y Meijerink, M. (2019). Mechanisms and  
  
 immunomodulatory properties of pre-and probiotics. Beneficial Microbes, 10(3),  
  
 225–236.  
  
Pieters, J. (2008). Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: Maintaining a  
  
 balance. Cell Host y Microbe, 3(6), 399–407.  
  
Piqué, N., Berlanga, M., y Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed  
  
 (Tyndallized) probiotics: An overview. International Journal of Molecular  
  
 Sciences, 20(10), 2534.  
  
Plan de Actuación Sobre Tuberculosis en Especies Silvestres. (2017). Ministerio de  
  
 Agricultura, Pesca y Alimentación.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 371

Página 372:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Poeta, P., Costa, D., Igrejas, G., Rodrigues, J., y Torres, C. (2007). Phenotypic and  
  
 genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from  
  
 wild boars (Sus scrofa). Veterinary Microbiology, 125(3–4), 368–374.  
  
Pornsukarom, S., van Vliet, A. H., y Thakur, S. (2018). Whole genome sequencing analysis  
  
 of multiple Salmonella serovars provides insights into phylogenetic relatedness,  
  
 antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals  
  
 and agriculture environmental sources. BMC Genomics, 19(1), 1–14.  
  
Prabhu, V. R., Kamalakkannan, R., Arjun, M. S., y Nagarajan, M. (2020). Consequences of  
  
 domestication on gut microbiome: A comparative study between wild gaur and  
  
 domestic mithun. Frontiers in Microbiology, 11, 133.  
  
Praveena, P. E., Periasamy, S., Kumar, A., y Singh, N. (2010). Cytokine profiles, apoptosis  
  
 and pathology of experimental Pasteurella multocida serotype A1 infection in  
  
 mice. Research in Veterinary Science, 89(3), 332–339.  
  
Qin, W., Song, P., Lin, G., Huang, Y., Wang, L., Zhou, X., Li, S., y Zhang, T. (2020). Gut  
  
 Microbiota Plasticity Influences the Adaptability of Wild and Domestic Animals  
  
 in Co-inhabited Areas. Frontiers in Microbiology, 11, 125.  
  
Radostits, O. M., Gay, C., Hinchcliff, K. W., y Constable, P. D. (2007). Diseases associated  
  
 with Pasteurella species. In Veterinary medicina: A textbook of the diseases of  
  
 cattle, horses, sheep, pigs and goats (Vol. 10, pp. 921–963). Saunders Elsevier.  
  
 publisher: 10th Co., Philadelphia, USA  
  
  
  
Ramírez-López, C., y Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de  
  
 bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra.  
  
 Información Tecnológica, 27(6), 115–128.  
  
 372 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 373:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Rao, M., Streur, T. L., Aldwell, F. E., y Cook, G. M. (2001). Intracellular pH regulation by  
  
 Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium bovis BCG. Microbiology,  
  
 147(4), 1017–1024.  
  
Real Decreto 138/2020, de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en  
  
 materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como  
  
 reservorio de la tuberculosis (complejo Mycobacterium tuberculosis)., (2020).  
  
Reenen, V. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423,  
  
 a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum. Journal of Applied  
  
 Microbiology, 84(6), 1131–1137.  
  
Ren, C., Zhang, Q., De Haan, B. J., Zhang, H., Faas, M. M., y De Vos, P. (2016).  
  
 Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune  
  
 regulation. Scientific Reports, 6(1), 1–12.  
  
Repka, L. M., Chekan, J. R., Nair, S. K., y Van Der Donk, W. A. (2017). Mechanistic  
  
 understanding of lanthipeptide biosynthetic enzymes. Chemical Reviews, 117(8),  
  
 5457–5520.  
  
Rezvani, F., Ardestani, F., y Najafpour, G. (2017). Growth kinetic models of five species  
  
 of Lactobacilli and lactose consumption in batch submerged culture. Brazilian  
  
 Journal of Microbiology, 48(2), 251–258.  
  
Ribeiro, G., Gruninger, R., Badhan, A., y McAllister, T. (2016). Mining the rumen for  
  
 fibrolytic feed enzymes. Animal Frontiers, 6(2), 20–26.  
  
Ribelles, P., Rodríguez, I., y Suárez, J. E. (2012). LysA2, the Lactobacillus casei  
  
 bacteriophage A2 lysin is an endopeptidase active on a wide spectrum of lactic  
  
 acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, 94(1), 101–110.  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 373

Página 374:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Rich, J. T., Neely, J. G., Paniello, R. C., Voelker, C. C., Nussenbaum, B., y Wang, E. W.  
  
 (2010). A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves.  
  
 Otolaryngology—Head and Neck Surgery, 143(3), 331–336.  
  
Risco, D., Bravo, M., Martínez, R., Torres, A., Gonçalves, P., Cuesta, J., García-Jiménez,  
  
 W., Cerrato, R., Iglesias, R., y Galapero, J. (2018). Vaccination against porcine  
  
 Circovirus-2 reduces severity of tuberculosis in wild boar. Ecohealth, 15(2), 388–  
  
 395.  
  
Risco, D., Fernández-Llario, P., Cuesta, J. M., García-Jiménez, W. L., Gil, M., Gonçalves,  
  
 P., Martínez, R., Gómez, L., García, A., y Rey, J. (2013). Fatal outbreak of systemic  
  
 pasteurellosis in a wild boar (Sus scrofa) population from southwest Spain.  
  
 Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 25(6), 791–794.  
  
Risco, D., y García, A. (2020). Enfermedades respiratorias. In Principales enfermedades  
  
 infecciosas y parasitarias en el ganado ovino y caprino extensivo (pp. 145–160).  
  
 Servicio de Publicaciones UEx.  
  
Risco, D., Gonçalves, P., Mentaberre, G., Navarro-González, N., Casas-Díaz, E., Gassó, D.,  
  
 Colom-Cadena, A., Fernández-Aguilar, X., Castillo-Contreras, R., y Velarde, R.  
  
 (2018). Biometrical measurements as efficient indicators to assess wild boar  
  
 body condition. Ecological Indicators, 88, 43–50.  
  
Risco, D., Martínez, R., Bravo, M., Llario, P. F., Cerrato, R., Garcia-Jiménez, W. L.,  
  
 Gonçalves, P., García, A., Barquero-Pérez, Ó., y Quesada, A. (2019). Nasal  
  
 shedding of Mycobacterium tuberculosis in wild boar is related to generalised  
  
 tuberculosis and concomitant infections. Veterinary Record, 185(20), 629-629.  
  
Risco, D., Salguero, F. J., Cerrato, R., Gutierrez-Merino, J., Lanham-New, S., Barquero-  
  
 Pérez, Ó., Hermoso de Mendoza, J., y Fernández-Llario, P. (2016). Association  
  
 374 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 375:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
 between vitamin D supplementation and severity of tuberculosis in wild boar  
  
 and red deer. Research in Veterinary Science, 108, 116–119.  
  
Risco, D., Serrano, E., Fernández-Llario, P., Cuesta, J. M., Gonçalves, P., García-Jiménez,  
  
 W. L., Martínez, R., Cerrato, R., Velarde, R., Gómez, L., Segalés, J., y Hermoso de  
  
 Mendoza, J. (2014). Severity of Bovine Tuberculosis Is Associated with Co-  
  
 Infection with Common Pathogens in Wild Boar. PLOS ONE, 9(10), e110123.  
  
Rocha, D. J., Santos, C. S., y Pacheco, L. G. (2015). Bacterial reference genes for gene  
  
 expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. Antonie Van Leeuwenhoek,  
  
 108(3), 685–693.  
  
Rocha-Ramírez, L., Pérez-Solano, R., Castañón-Alonso, S., Moreno Guerrero, S., Ramírez  
  
 Pacheco, A., García Garibay, M., y Eslava, C. (2017). Probiotic Lactobacillus strains  
  
 stimulate the inflammatory response and activate human macrophages. Journal  
  
 of Immunology Research, 2017.  
  
Roldán, M. L., Otero, J. L., Villarreal, F., Baroni, M. R., Carrasco, M. S., Álvarez, C., Russell-  
  
 White, K., Méndez, E. de los Á., y Simonetta, A. C. (2011). Efecto inhibidor de  
  
 Lactobacillus casei 206/1 contra Escherichia coli O157: H7. Revista de La  
  
 Sociedad Venezolana de Microbiología, 31(1), 37–41.  
  
Roosaare, M., Vaher, M., Kaplinski, L., Möls, M., Andreson, R., Lepamets, M., Kõressaar,  
  
 T., Naaber, P., Kõljalg, S., y Remm, M. (2017). StrainSeeker: Fast identification of  
  
 bacterial strains from raw sequencing reads using user-provided guide trees.  
  
 PeerJ, 5, e3353.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 375

Página 376:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., y Tuohy, K. (2018).  
  
 Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components.  
  
 European Journal of Nutrition, 57(1), 1–24.  
  
Saad, M. A., Abdelsamei, H. M., Ibrahim, E., Abdou, A. M., y El Sohaimy, S. A. (2015).  
  
 Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of  
  
 Lactobacillus acidophilus bacteriocin. Benha Veterinary Medical Journal, 28(1),  
  
 210–215.  
  
Sable, S., y Lortal, S. (1995). The lysins of bacteriophages infecting lactic acid bacteria.  
  
 Applied Microbiology and Biotechnology, 43(1), 1–6.  
  
Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Navarro, L., Díez, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F.,  
  
 y Torres, C. (2009). Genetic diversity of the pln locus among oenological  
  
 Lactobacillus plantarum strains. International Journal of Food Microbiology,  
  
 134(3), 176–183.  
  
Saleem, A., Zanouny, A., y Singer, A. (2017). Growth performance, nutrients digestibility,  
  
 and blood metabolites of lambs fed diets supplemented with probiotics during  
  
 pre-and post-weaning period. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,  
  
 30(4), 523.  
  
Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M., Sanders, M. E.,  
  
 Shamir, R., Swann, J. R., y Szajewska, H. (2021). The International Scientific  
  
 Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the  
  
 definition and scope of postbiotics. Nature Reviews Gastroenterology y  
  
 Hepatology, 1–19.  
  
Sandoval-Mosqueda, I., Llorente-Bousquets, A., Montiel-Sosa, J., Corona, L., y  
  
 Guadarrama-Álvarez, Z. (2019). Encapsulation of Lactobacillus plantarum ATCC  
  
 376 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 377:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
 8014 and Pediococcus acidilactici ATCC 8042 in a freeze-dried alginate-gum  
  
 arabic system and its in vitro testing under gastrointestinal conditions. Journal of  
  
 Microencapsulation, 36(7), 591–602.  
  
Sanhueza, E., Paredes-Osses, E., González, C. L., y García, A. (2015). Effect of pH in the  
  
 survival of Lactobacillus salivarius strain UCO\_979C wild type and the pH acid  
  
 acclimated variant. Electronic Journal of Biotechnology, 18(5), 343–346.  
  
Şanlıbaba, P., y Güçer, Y. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. J. Int. Sci.  
  
 Publ, 3, 451–457.  
  
Santos, N., Almeida, V., Gortázar, C., y Correia-Neves, M. (2015). Patterns of  
  
 Mycobacterium tuberculosis-complex excretion and characterization of super-  
  
 shedders in naturally-infected wild boar and red deer. Veterinary Research,  
  
 46(1), 1–10.  
  
Schroeder, B. O. (2019). Fight them or feed them: How the intestinal mucus layer  
  
 manages the gut microbiota. Gastroenterology Report, 7(1), 3–12.  
  
Schwiertz, A., y Rusch, V. (2016). A short definition of terms. In Microbiota of the Human  
  
 Body (pp. 1–3). Springer.  
  
Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics,  
  
 30(14), 2068–2069.  
  
Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., y Roy, N.  
  
 C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe  
  
 interactions in the gastrointestinal tract. Mediators of Inflammation, 2013.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 377

Página 378:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Shah, J. A., Lindestam Arlehamn, C. S., Horne, D. J., Sette, A., y Hawn, T. R. (2019).  
  
 Nontuberculous mycobacteria and heterologous immunity to tuberculosis. The  
  
 Journal of Infectious Diseases, 220(7), 1091–1098.  
  
Silva, Y. P., Bernardi, A., y Frozza, R. L. (2020). The role of short-chain fatty acids from  
  
 gut microbiota in gut-brain communication. Frontiers in Endocrinology, 11, 25.  
  
Sims, G. E., Jun, S.-R., Wu, G. A., y Kim, S.-H. (2009). Alignment-free genome comparison  
  
 with feature frequency profiles (FFP) and optimal resolutions. Proceedings of the  
  
 National Academy of Sciences, 106(8), 2677–2682.  
  
Singh, A. P., Preet, S., y Rishi, P. (2014). Nisin/β-lactam adjunct therapy against  
  
 Salmonella enterica serovar Typhimurium: A mechanistic approach. Journal of  
  
 Antimicrobial Chemotherapy, 69(7), 1877–1887.  
  
Singla, V., Mandal, S., Sharma, P., Anand, S., y Tomar, S. K. (2018). Antibiotic  
  
 susceptibility profile of Pediococcus spp. From diverse sources. 3 Biotech, 8(12),  
  
 489.  
  
Sivaraj, A., Sundar, R., Manikkam, R., Parthasarathy, K., Rani, U., y Kumar, V. (2018).  
  
 Potential applications of lactic acid bacteria and bacteriocins in anti-  
  
 mycobacterial therapy. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 11(8), 453.  
  
Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. B., Gaudreau, H., Bédard, F.,  
  
 Biron, E., Drider, D., y Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of  
  
 antimicrobials: Toxicity aspects and regulations. FEMS Microbiology Reviews,  
  
 45(1), fuaa039.  
  
Sorbara, M. T., y Pamer, E. G. (2019). Interbacterial mechanisms of colonization  
  
 resistance and the strategies pathogens use to overcome them. Mucosal  
  
 Immunology, 12(1), 1–9.  
  
 378 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 379:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Sosunov, V., Mischenko, V., Eruslanov, B., Svetoch, E., Shakina, Y., Stern, N., Majorov, K.,  
  
 Sorokoumova, G., Selishcheva, A., y Apt, A. (2007). Antimycobacterial activity of  
  
 bacteriocins and their complexes with liposomes. Journal of Antimicrobial  
  
 Chemotherapy, 59(5), 919–925.  
  
Stedman, A. (2017). BCG as a vaccine vehicle to deliver porcine immunity to African swine  
  
 fever virus. [Tesis Doctoral, University of Surrey]. ExLibris.  
  
 https://openresearch.surrey.ac.uk/esploro/outputs/doctoral/BCG-as-a-vaccine-  
  
 vehicle-to/99515580002346  
  
Stedman, A., de Motes, C. M., Lesellier, S., Dalley, D., Chambers, M., y Gutierrez-Merino,  
  
 J. (2018). Lactic acid Bacteria isolated from European badgers (Meles meles)  
  
 reduce the viability and survival of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine and  
  
 influence the immune response to BCG in a human macrophage model. BMC  
  
 Microbiology, 18(1), 74.  
  
Stedman, A., van Vliet, A. H., A. Chambers, M., y Gutierrez-Merino, J. (2020). Gut  
  
 commensal bacteria show beneficial properties as wildlife probiotics. Annals of  
  
 the New York Academy of Sciences, 1467(1), 112–132.  
  
Stefanovic, E., Casey, A., Cotter, P., Cavanagh, D., Fitzgerald, G., y McAuliffe, O. (2016).  
  
 Draft genome sequence of Lactobacillus casei DPC6800, an isolate with the  
  
 potential to diversify flavor in cheese. Genome Announcements, 4(2), e00063-  
  
 16.  
  
Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección (Ed.). (2019).  
  
 Caracterización del sector ovino y caprino en España (No. 003-19-255–7;  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 379

Página 380:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
 Catálogo de Publicaciones de La Administración General Del Estado, p. 22).  
  
 https://cpage.mpr.gob.es/  
  
Suez, J., Zmora, N., Segal, E., y Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of  
  
 probiotics. In Nature Medicine (Vol. 25, Issue 5, pp. 716–729). Nature Research.  
  
 https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x  
  
Sugita, H., Matsuo, N., Hirose, Y., Iwato, M., y Deguchi, Y. (1997). Vibrio sp. Strain NM  
  
 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect  
  
 against Pasteurella piscicida. Applied and Environmental Microbiology, 63(12),  
  
 4986–4989.  
  
Sun, B., Wang, X., Bernstein, S., Huffman, M. A., Xia, D.-P., Gu, Z., Chen, R., Sheeran, L.  
  
 K., Wagner, R. S., y Li, J. (2016). Marked variation between winter and spring gut  
  
 microbiota in free-ranging Tibetan Macaques (Macaca thibetana). Scientific  
  
 Reports, 6, 26035.  
  
Tai, H. F., Foo, H. L., Rahim, R. A., Loh, T. C., Abdullah, M. P., y Yoshinobu, K. (2015).  
  
 Molecular characterisation of new organisation of plnEF and plw loci of  
  
 bacteriocin genes harbour concomitantly in Lactobacillus plantarum I-UL4.  
  
 Microbial Cell Factories, 14(1), 1–13.  
  
Takeuchi, O., y Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. In Cell  
  
 (Vol. 140, Issue 6, pp. 805–820). Cell Press.  
  
 https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022  
  
Teneva, D., Goranov, B., Denkova, R., Denkova, Z., y Kostov, G. (2016). Antimicrobial  
  
 activity of Lactobacillus plantarum strains against Escherichia coli strains.  
  
 Scientific Works of University of Food Technologies, 63(1), 199-206.  
  
  
  
 380 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 381:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Thomas-White, K., Forster, S. C., Kumar, N., Van Kuiken, M., Putonti, C., Stares, M. D.,  
  
 Hilt, E. E., Price, T. K., Wolfe, A. J., y Lawley, T. D. (2018). Culturing of female  
  
 bladder bacteria reveals an interconnected urogenital microbiota. Nature  
  
 Communications, 9(1), 1557. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03968-5  
  
Todorov, S., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M., Holzapfel, W.,  
  
 y Dicks, L. (2008). Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. Journal  
  
 of Applied Microbiology, 104(2), 465–477.  
  
Todorov, S., y Dicks, L. (2006). Medium components effecting bacteriocin production by  
  
 two strains of Lactobacillus plantarum ST414BZ and ST664BZ isolated from boza.  
  
 Biologia, 61(3), 269–274.  
  
Todorov, S., Franco, B., y Wiid, I. (2014). In vitro study of beneficial properties and safety  
  
 of lactic acid bacteria isolated from Portuguese fermented meat products.  
  
 Beneficial Microbes, 5(3), 351–366.  
  
Townsend, K. M., Boyce, J. D., Chung, J. Y., Frost, A. J., y Adler, B. (2001). Genetic  
  
 organization of Pasteurella multocida cap loci and development of a multiplex  
  
 capsular PCR typing system. Journal of Clinical Microbiology, 39(3), 924–929.  
  
Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., y Phillippy, A. M. (2014). The Harvest suite for  
  
 rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific  
  
 microbial genomes. Genome Biology, 15(11), 1–15.  
  
Tulini, F. L. (2014). Isolation of lactic acid bacteria from milk and cheese with potential  
  
 for food biopreservation and utilization for increasing whey digestibility. [Tesis  
  
 Doctoral, Universidade de Sao Paulo]. Teses USP.  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 381

Página 382:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
 https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-30102014-  
  
 142251/publico/Tese\_Completa\_original.pdf  
  
Turgis, M., Khanh, D., Majid, J., Behnoush, M., y Monique, L. (2016). Synergistic  
  
 antimicrobial effect of combined bacteriocins against food pathogens and  
  
 spoilage bacteria. Microb Res Inter, 4(1), 1–5.  
  
Unger, S. A., y Bogaert, D. (2017). The respiratory microbiome and respiratory infections.  
  
 Journal of Infection, 74, S84–S88.  
  
Ushida, K., Tsuchida, S., Ogura, Y., Toyoda, A., y Maruyama, F. (2016). Domestication and  
  
 cereal feeding developed domestic pig-type intestinal microbiota in animals of  
  
 suidae. Animal Science Journal, 87(6), 835–841.  
  
van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., y Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: A  
  
 user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. Nucleic  
  
 Acids Research, 46(W1), W278–W281.  
  
Van Tassell, M. L., y Miller, M. J. (2011). Lactobacillus adhesion to mucus. Nutrients, 3(5),  
  
 613–636.  
  
Van Zyl, W., Deane, S., y Dicks, L. (2019). Bacteriocin production and adhesion properties  
  
 as mechanisms for the anti-listerial activity of Lactobacillus plantarum 423 and  
  
 Enterococcus mundtii ST4SA. Beneficial Microbes, 10(3), 329–349.  
  
Vásquez, S. M., Suárez, H., y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas  
  
 producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista  
  
 Chilena de Nutrición, 36(1), 64–71.  
  
Vasseur, M. V., Lacroix, M. Z., Toutain, P.-L., Bousquet-Melou, A., y Ferran, A. A. (2017).  
  
 Infection-stage adjusted dose of beta-lactams for parsimonious and efficient  
  
  
  
 382 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 383:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
 antibiotic treatments: A Pasteurella multocida experimental pneumonia in mice.  
  
 Plos One, 12(8), e0182863.  
  
Velasco, J. L. F., Moreno, E. E. C., Ramírez, M. C., y Vara, I. A. D. (2006). Alimentos  
  
 funcionales para cerdos al destete. Veterinaria México, 37(1), 117–136.  
  
Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J., Fernandez de Mera, I., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M.,  
  
 y Gortázar, C. (2007). Risk Factors Associated With the Prevalence of  
  
 Tuberculosis-Like Lesions in Fenced Wild Boar and Red Deer in South Central  
  
 Spain. Veterinary Research, 38, 451–464.  
  
 https://doi.org/10.1051/vetres:2007002  
  
Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J. M., Fernández-De-Mera, I. G., Juste, R., Barral, M., y  
  
 Gortazar, C. (2006). Wild boar and red deer display high prevalences of  
  
 tuberculosis-like lesions in Spain. Veterinary Research, 37(1), 107–119.  
  
Viera, K. R. M., y Márquez, P. L. (2020). Utilización de animales en la investigación  
  
 biomédica y médica. Revista Iberoamericana de Bioética, 12, 01–19.  
  
Von Reyn, C. F., Mtei, L., Arbeit, R. D., Waddell, R., Cole, B., Mackenzie, T., Matee, M.,  
  
 Bakari, M., Tvaroha, S., y Adams, L. V. (2010). Prevention of tuberculosis in Bacille  
  
 Calmette–Guérin-primed, HIV-infected adults boosted with an inactivated  
  
 whole-cell mycobacterial vaccine. Aids, 24(5), 675–685.  
  
Wang, Y., Qin, Y., Xie, Q., Zhang, Y., Hu, J., y Li, P. (2018). Purification and characterization  
  
 of plantaricin LPL-1, a novel class IIa bacteriocin produced by Lactobacillus  
  
 plantarum LPL-1 isolated from fermented fish. Frontiers in Microbiology, 9, 2276.  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 383

Página 384:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Ward, D., y Somkuti, G. (1995). Characterization of a bacteriocin produced by  
  
 Streptococcus thermophilus ST134. Applied Microbiology and Biotechnology,  
  
 43(2), 330–335.  
  
Ward, L., y Timmins, M. (1999). Differentiation of Lactobacillus casei, Lactobacillus  
  
 paracasei and Lactobacillus rhamnosus by polymerase chain reaction. Letters in  
  
 Applied Microbiology, 29(2), 90–92.  
  
Wegh, C. A., Geerlings, S. Y., Knol, J., Roeselers, G., y Belzer, C. (2019). Postbiotics and  
  
 Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. International  
  
 Journal of Molecular Sciences, 20(19), 4673.  
  
Weindl, L., Frank, E., Ullrich, U., Heurich, M., Kleta, S., Ellerbroek, L., y Gareis, M. (2016).  
  
 Listeria monocytogenes in different specimens from healthy red deer and wild  
  
 boars. Foodborne Pathogens and Disease, 13(7), 391–397.  
  
Welsh, M. D., Cunningham, R. T., Corbett, D. M., Girvin, R. M., McNair, J., Skuce, R. A.,  
  
 Bryson, D. G., y Pollock, J. M. (2005). Influence of pathological progression on the  
  
 balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis.  
  
 Immunology, 114(1), 101–111.  
  
WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2019. (2020).  
  
 World Health Organization.  
  
Winglee, K., Eloe-Fadrosh, E., Gupta, S., Guo, H., Fraser, C., y Bishai, W. (2014). Aerosol  
  
 Mycobacterium tuberculosis infection causes rapid loss of diversity in gut  
  
 microbiota. PloS One, 9(5), e97048.  
  
Wood, M. R., Elaine, A. Y., y Mehta, S. (2017). The human microbiome in the fight against  
  
 tuberculosis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 96(6),  
  
 1274–1284.  
  
 384 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 385:  
 REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
Xavier, K. B. (2018). Bacterial interspecies quorum sensing in the mammalian gut  
  
 microbiota. Comptes Rendus Biologies, 341(5), 297–299.  
  
Xu, C., Fu, Y., Liu, F., Liu, Z., Ma, J., Jiang, R., Song, C., Jiang, Z., y Hou, J. (2021).  
  
 Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by  
  
 Lactobacillus rhamnosus 1.0320. LWT, 137, 110338.  
  
Yatera, K., Noguchi, S., y Mukae, H. (2018). The microbiome in the lower respiratory  
  
 tract. Respiratory Investigation, 56(6), 432–439.  
  
Yoon, S. S., Kim, E.-K., y Lee, W.-J. (2015). Functional genomic and metagenomic  
  
 approaches to understanding gut microbiota–animal mutualism. Current  
  
 Opinion in Microbiology, 24, 38–46.  
  
Yoshida, T., Sugimoto, T., Sato, M., y Hirai, K. (2000). Incidence of Listeria  
  
 monocytogenes in wild animals in Japan. Journal of Veterinary Medical Science,  
  
 62(6), 673–675.  
  
Yu, S., y Gao, N. (2015). Compartmentalizing intestinal epithelial cell toll-like receptors  
  
 for immune surveillance. In Cellular and Molecular Life Sciences (Vol. 72, Issue  
  
 17, pp. 3343–3353). Birkhauser Verlag AG. https://doi.org/10.1007/s00018-015-  
  
 1931-1  
  
Yu, X., Jaatinen, A., Rintahaka, J., Hynönen, U., Lyytinen, O., Kant, R., Åvall-Jääskeläinen,  
  
 S., von Ossowski, I., y Palva, A. (2015). Human gut-commensalic Lactobacillus  
  
 ruminis ATCC 25644 displays sortase-assembled surface piliation: Phenotypic  
  
 characterization of its fimbrial operon through in silico predictive analysis and  
  
 recombinant expression in Lactococcus lactis. PLoS One, 10(12), e0145718.  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 385

Página 386:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
Zacharof, M., y Lovitt, R. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review  
  
 article. Apcbee Procedia, 2, 50–56.  
  
Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O.,  
  
 Aarestrup, F. M., y Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial  
  
 resistance genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(11), 2640–2644.  
  
Zhang, D., Ji, H., Wang, S., Liu, H., Wang, J., y Wang, Y. (2019). In vitro characterisation  
  
 of two Lactobacillus strains and evaluation of their suitability as probiotics for  
  
 growing-finishing pigs. Animal Production Science, 59(8), 1537–1545.  
  
Zhang, Q., Lee, W.-B., Kang, J.-S., Kim, L. K., y Kim, Y.-J. (2018). Integrin CD11b negatively  
  
 regulates Mincle-induced signaling via the Lyn–SIRPα–SHP1 complex.  
  
 Experimental y Molecular Medicine, 50(2), e439–e439.  
  
Zheng, J., Ruan, L., Sun, M., y Gänzle, M. (2015). A genomic view of lactobacilli and  
  
 pediococci demonstrates that phylogeny matches ecology and physiology.  
  
 Applied and Environmental Microbiology, 81(20), 7233–7243.  
  
Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O’Toole, P.  
  
 W., Pot, B., Vandamme, P., y Walter, J. (2020). A taxonomic note on the genus  
  
 Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus  
  
 Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and  
  
 Leuconostocaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary  
  
 Microbiology, 70(4), 2782–2858.  
  
  
  
  
  
 386 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 387:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 387

Página 388:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
  
 APÉNDICES  
  
  
  
  
  
 388 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 389:  
 APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
MARÍA BRAVO SANTILLANA 389

Página 390:  
REF | Referencias Bibliográficas  
  
 APÉNDICE I  
  
  
 Apéndice IA. Cebadores utilizados para la amplificación de los transcritos derivados de los precursores  
  
 de las bacteriocinas clase II de L. plantarum, L. paracasei y L. salivarius.  
  
 Gen Bacteriocina Cebadores  
  
 plnE Plantaricina E, L. plantarum Fw: caatattccaggttgccgca Rv: gaatgcctgcaactgaacca  
  
 plnF Plantaricina F, L. plantarum Fw: atttcaggtggcgttttcca Rv: aatcctcggacagcgctaat  
  
 plnJ Plantaricina J, L. plantarum Fw: gccagcttcgccatcataaa Rv: aggatttggatgtagtagatgca  
  
 plnK Plantaricina K, L. plantarum Fw: ttgaaccaccaagcacgg Rv: ttgaagaattaactgctgacgc  
  
 A Bacteriocina clase IIb, L. casei Fw: agttgtcaggggtttcaggt Rv: ccgccgattatcccaaaagg  
  
 B Bacteriocina clase IIb, L. casei Fw: gagccaagcgacgcaataaa Rv: cgcctgcaacagttgtaaatg  
  
 Tα Bacteriocina clase IId, L. salivarius Fw: gcaatcagaggaggaatggc Rv: ccgatacaagccaatccacc  
  
 Tβ Bacteriocina clase IId, L. salivarius Fw: gggaatggcattaattgggga Rv: ggattaccgaaagctgcacc  
  
 gyrA DNA topoisomerasa, L. plantarum Fw: tttaagtcgcaacaccgtgg Rv: gattcctttggccgtacgac  
  
 dnaG DNA primasa, L. plantarum Fw: agttggtagtcggtctggtg Rv: cgcacctaaggatcagcaac  
  
 gyrA DNA topoisomerasa, L. paracasei Fw: cttccacgcatgatgtcctg Rv: cgccttcatgcacgttgata  
  
 dnaG DNA primasa, L. paracasei Fw: cagttcggccaattgatcgt Rv: cgactcgatccaggaatcca  
  
 gyrA DNA topoisomerasa, L. salivarius Fw: gttttgccagcacgttttcc Rv: tcccattacaattgcgccag  
  
 dnaG DNA primasa, L. salivarius Fw: gcacaaagattcaacgtcgc Rv: cgttctgctttctctgcctt  
  
gyrA y dnaG fueron seleccionados como genes constitutivos (Rocha et al., 2015).  
  
  
  
  
  
 390 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 391:  
 APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
Apéndice IB. Correlación entre valores medios de log10 (UFC / mL) y log10 (FU) de M. bovis BCG en cocultivos con lactobacilos después de 48 horas (h) de incubación en caldo  
  
MH con OADC (10 %), Tween 80 (0,1 %) y glicerol (0,2 %). Los gráficos muestran una bondad de ajuste positiva entre log10 (UFC / mL) y log10 (FU) (R2> 0.9).  
  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 391

Página 392:  
APN | Apéndices  
  
  
 Apéndice IC. Proteínas codificadas por el clúster de la bacteriocina de péptido único de Ligilactobacillus salivarius C12  
  
 ORF (gen) Tamaño (aa) Función Homólogo % Referencia  
  
 Proteína putativa (Harris et al., 2017) 1 (T2) 87 Ligilactobacillus salivarius CCUG47825 96  
  
 2 (T3) 57 Péptido similar a bacteriocinas Ligilactobacillus salivarius UCC118 96 (Flynn et al., 2002)  
  
 3(T4) 85 Péptido similar a bacteriocinas Ligilactobacillus salivarius ATCC11741 96 (Harris et al., 2017)  
  
 4 (Ta) 80 Subunidad A bacteriocina ThmA Blp1a, Ligilactobacillus salivarius BGH01 96 (Busarcevic y Dalgalarrondo, 2012)  
  
 5 (T1M1) 59 Inmunidad Ligilactobacillus salivarius BGH01 82 (Busarcevic y Dalgalarrondo, 2012)  
  
 6 (Tb) 69 Subunidad B bacteriocina TmhB Blp1b, Ligilactobacillus salivarius BGH01 100 (Busarcevic y Dalgalarrondo, 2012)  
  
 7 (T1M2) 54 Inmunidad Ligilactobacillus salivarius BGH01 100 (Busarcevic y Dalgalarrondo, 2012)  
  
 8 (TIP) 39 Péptido de inducción Ligilaactobacillus salivarius ATCC11741 79 (Harris et al., 2017)  
  
 9 (TK) 429 Histidina quinasa Ligilactobacillus salivarius ATCC11741 87 (Harris et al., 2017)  
  
 264 Regulador de la respuesta Ligilactobacillus salivarius UCC118 (Flynn et al., 2002) 10 (TR) 99  
  
 11 (orf1) 76 Proteína putativa Ligilactobacillus salivarius ATCC11741 99 (Harris et al., 2017)  
  
 12(orf2) 65 Proteína putativa Ligilactobacillus salivarius ATCC11741 100 (Harris et al., 2017)  
  
 13 (orf3) 44 Proteína putativa Ligilactobacillus salivarius ATCC11741 100 (Harris et al., 2017)  
  
 14 (orf4) 237 Proteína putativa Ligilactobacillus salivarius ATCC11741 98 (Harris et al., 2017)  
  
 15 (orf5) 88 Proteína putativa Ligilactobacillus salivarius CCUG47825 99 (Harris et al., 2017)  
  
 16 (orf6) 273 Integrasa Ligilactobacillus salivarius UCC118 99 (Flynn et al., 2002)  
  
  
  
 392 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 393:  
 APN | Apéndices  
  
  
 Apéndice ID. Proteínas codificadas por el clúster de las bacteriocinas de dos péptidos de los aislados de Lactiplantibacillus plantarum y Lacticaseibacillus paracasei  
  
Aislados ORF (gen) Tamaño (aa) Función Homólogo (100%) Referencia  
  
 Proteasa CAAX autoinmunidad (Diep et al., 1996, 2009)C1/EML1/SA3 1 (W) 228 PlnW, L. plantarum C11  
  
 2 (V) 226 Proteasa CAAX autoinmunidad PlnV, L. plantarum C11 (Diep et al., 1996, 2009)  
  
 3(U) 222 Familia CAAX proteína putativa PlnU, L. plantarum C11 (Diep et al., 1996, 2009)  
  
 4 (T) 149 Familia CAAX proteína putativa PlnT, L. plantarum C11 (Diep et al., 1996, 2009)  
  
 5 (S) 99 Proteína putativa PlnS, L. plantarum C11 (Diep et al., 1996, 2009)  
  
 6 (H) 458 Factor accesorio de transportador ABC PlnH, L. plantarum C11 (Diep et al., 1996, 2009)  
  
 7 (G) 716 Transportador ABC PlnG, L. plantarum C11 (Diep et al., 1996, 2009)  
  
 8 (E) 56 Plantaricina E PlnE, L. plantarum C11 (Diep et al., 1996, 2009)  
  
 9 (F) 52 Plantaricina F PlnF, L. plantarum C11 (Diep et al., 1996, 2009)  
  
SA5 77 Bacteriocina clase IIb L. casei DPC6800 (Stefanovic et al., 2016) 1 (A)  
  
 2 (B) 71 Bacteriocina clase IIb L. casei UCD174 (Broadbent et al., 2012)  
  
 3(C) 102 Proteína putativa L. casei W56 (Hochwind et al., 2012)  
  
 4 (AT) 198 Acetiltransferasa L. casei W56 (Hochwind et al., 2012)  
  
 5 (D) 111 Inmunidad L. casei DPC6800 (Stefanovic et al., 2016)  
  
 6 (E) 225 Metaloproteasa L. casei W56 (Hochwind et al., 2012)  
  
 7 (F) 110 Proteína putativa L. casei W56 (Hochwind et al., 2012)  
  
 8 (G) 52 Proteína de membrana putativa L. casei BL23 (Mazé et al., 2010)  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 393

Página 394:  
APN | Apéndices  
  
  
  
  
 Apéndice IE. Proteínas codificadas por los genes hipotéticos de bacteriolisinas identificadas en los aislados de lactobacilos  
  
 Proteína Gen Tamaño Dominio catalítico conservado Lactobacilosa Homólogo (100%) Referencia  
 (aa)  
  
 Fago lisina acm 245-772 Endopeptidasa M23 C1, EML1, SA3, C2 Lactobacillus sp. CBA3606 L. Genomas completos NCBI  
 Muramidasa GH25-PlyB C12, SA5 paracasei ATCC 25302 L. (Martin et al., 2006; Ward y  
 salivarius CECT 5713 Timmins, 1999)  
  
 Lisozima lyc 309-921 Endolisina GH25-LysA C2, C12, SA5 L. reuteri TD1 L. casei 32G (Aktas et al., 2015; Leonard  
 et al., 2014)  
  
 Autolisina 1 lytA\_1 486 Endopeptidasa C39 C2 L. salivarius cp400 (MacKenzie et al., 2014)  
  
 Autolisina 2 lytA\_2 350-468 Amidasa familia PGRP C2, C12, SA5 L. salivarius ACS-116-V-Col5a L. Genomas completos NCBI  
 casei 32G (Aktas et al., 2015)  
  
 Amidasa lytC 282-350 MurNAc-LAA C1, EML1, SA3 Lactobacillus sp. CBA3606 Genomas completos NCBI  
 C2, C12, SA5 Lactobacillus sp. DS22\_6  
  
 Toxina 1 toxA\_1 125 Amidasa C2 L. salivarius cp400 (MacKenzie et al., 2014)  
  
 Toxina 2 toxA\_2 523 Endopeptidasa M23 C2, C12 L. salivarius cp400 (MacKenzie et al., 2014)  
  
aAislados de lactobacilos del estudio en los que se ha identificado  
  
  
  
  
 394 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 395:  
 APN | Apéndices  
  
APÉNDICE II  
 APÉNDICE II. Resultados de la mortalidad y los síntomas registrados tras las infecciones experimentales con Pasteurella multocida en modelo ratón en los grupos del  
 estudio  
  
  
  
 Grupo Dosis Síntomas Nº de bajas (dpi)d Mortalidad (%)  
  
 Suplementoa Antibióticob Infecciónc 1 2 3 4 5  
  
 Fase 0 Control - - - No 0 0 0 0 0 0 (0 %)  
  
 Suplemento 1:1 - - No 0 0 0 0 0 0 (0 %)  
  
 Infección DL50 - - DL50 Leves/Moderados 0 2 1 0 0 3 (50 %)  
  
 Infección DL100 - - DL100 Graves 1 2 1 2 0 6 (100 %)  
  
 Fase 1 No tratamiento - - DL50 Leves/Moderados 0 2 1 0 0 3 (50 %)  
  
 Antibiótico - 10mg/Kg/día DL50 Leves 0 0 0 0 0 0 (0 %)  
  
 Suplemento 1:1 - DL50 Leves/Moderados 0 0 3 0 0 3 (50 %)  
  
 Fase 2 No tratamiento - - DL100 Graves 1 3 2 0 0 6 (100 %)  
  
 Antibiótico - 10mg/Kg/día DL100 Graves 0 3 3 0 0 6 (100 %)  
  
 Suplemento 1:1 - DL100 Graves 0 4 2 0 0 6 (100 %)  
  
 Antibiótico + suplemento 1:1 10mg/Kg/día DL100 Moderados/Graves 1 0 3 0 0 2 (66,67 %)  
  
  
aSuplemento administrado en el agua de bebida en proporción 1:1 semanalmente (50 mL de sobrenadante de L. salivarius C12 en 50 mL de agua) 14 días antes de la infección y 5 días después  
bAntibiótico administrado en el agua de bebida a una dosis de 10 mg de doxaciclina por Kg de peso y por día durante 5 días (300 µL doxaciclina al 10 % en 100 mL de agua)  
cInóculo del patógeno Pasteurella multocida a DL50 (104 ufc/mL) o DL100 (107 ufc/mL)  
dNúmero de animales muertos en los días posinfección (dpi)  
  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 395

Página 396:  
APN | Apéndices  
  
 APÉNDICE III  
 APÉNDICE IIIA. Informe de resultados del diagnóstico previo de procesos infecciosos que causan  
 mortalidad en un cebadero de corderos  
  
  
  
  
  
 396 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 397:  
 APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
MARÍA BRAVO SANTILLANA 397

Página 398:  
APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
 398 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 399:  
 APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
MARÍA BRAVO SANTILLANA 399

Página 400:  
APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
 400 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 401:  
 APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
MARÍA BRAVO SANTILLANA 401

Página 402:  
APN | Apéndices  
  
  
  
 APÉNDICE IIIB. Informe de resultados de las pruebas de cribado para la selección de BAL candidatas  
 para el diseño y elaboración del producto posbiótico de un cebadero de corderos  
  
  
  
  
  
 402 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 403:  
 APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
MARÍA BRAVO SANTILLANA 403

Página 404:  
APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
 404 MARÍA BRAVO SANTILLANA

Página 405:  
 APN | Apéndices  
  
APÉNDICE IV  
 APÉNDICE IV. Resultados totales de los jabalíes abatidos y muestreados durante las dos temporadas de caza  
  
 Fecha Finca Jabalíes Jabalíes Lesiones Lesiones Lesiones Inspección Sueros Sueros  
  
montería abatidos inspeccionados TB generalizadas localizadas incompleta recogidos positivos  
  
 20/1/18 1 151 10 0 0 0 NA 10 0  
  
 19/1/19 1 191 10 0 0 0 NA 10 0  
  
 4/11/17 2 71 10 0 0 0 0 10 0  
  
 17/10/18 2 116 10 0 0 0 0 10 0  
  
 12/1/18 3 90 0 0 0 0 NA 6 0  
  
 7/2/19 3 131 10 0 0 0 0 10 0  
  
 3/12/17 4 10 9 7 1 3 3 9 6  
  
 3/2/18 4 7 0 0 0 0 NA 7 7  
  
 14/11/18 4 45 0 0 0 0 NA 10 9  
  
 30/1/19 4 45 0 0 0 0 NA 10 8  
  
 13/12/17 5 57 10 8 2 6 0 10 6  
  
 15/2/18 5 88 10 4 1 3 0 10 7  
  
 20/2/19 5 39 8 6 2 1 3 8 7  
  
 4/11/17 6 53 10 5 0 5 0 10 0  
  
 9/11/18 6 55 9 1 0 1 0 9 0  
  
 10/2/18 7 15 15 5 2 3 0 15 8  
  
 15/11/18 7 87 0 0 0 0 NA 10 5  
  
 3/1/19 7 13 10 4 2 1 1 10 0  
  
 3/2/18 8 48 10 0 0 0 NA 10 0  
  
 11/1/19 8 60 10 2 1 1 0 10 0  
  
 27/1/18 9 185 10 5 0 5 0 10 3  
  
 9/2/19 9 175 10 0 0 0 0 10 3  
  
 18/11/17 10 107 0 0 0 0 0 14 5  
  
 22/12/18 10 161 8 0 0 0 0 8 0  
  
 31/10/17 11 132 10 1 0 1 0 0 NA  
  
 24/11/18 11 75 10 3 1 1 1 0 NA  
  
 9/2/18 12 11 10 10 4 6 0 10 8  
  
 14/1/19 12 7 5 5 0 0 5 5 0  
  
 28/12/17 13 38 10 2 0 2 0 10 2  
  
 18/1/19 13 148 10 0 0 0 0 10 3  
  
 20/1/18 14 11 10 0 0 0 NA 10 3  
  
 9/1/19 14 16 3 0 0 0 0 3 0  
  
 20/1/18 15 171 10 8 3 5 0 10 7  
  
 13/12/18 15 178 15 3 1 2 0 15 1  
  
 15/11/17 16 33 10 0 0 0 0 10 2  
  
 18/2/19 16 31 0 0 0 0 NA 9 0  
  
 22/11/17 17 103 10 7 4 3 0 0 NA  
  
 12/1/19 17 86 10 3 0 3 0 0 NA  
  
 11/11/17 18 17 9 7 2 5 0 9 6  
  
 16/12/17 18 17 8 0 0 0 0 10 3  
  
 13/1/18 18 49 10 8 0 8 0 10 3  
  
 17/11/18 18 16 9 5 0 5 0 9 3  
  
 8/12/18 18 44 0 0 0 0 0 10 4  
  
 22/12/18 18 56 10 8 1 1 6 10 6  
  
 13/2/18 19 72 10 6 2 4 0 10 5  
  
 14/2/19 19 49 8 6 0 0 NA 10 6  
  
 15/2/19 19 30 10 5 0 0 NA 10 7  
  
 20/10/17 20 8 4 2 1 1 0 4 0  
  
 27/1/18 20 18 9 4 1 3 0 9 3  
  
 27/10/18 20 18 10 5 1 3 1 10 7  
  
 12/1/19 20 15 10 1 0 1 0 10 0  
  
 TOTAL 3449 409 146 32 83 20 449 153  
  
  
  
 MARÍA BRAVO SANTILLANA 405

Página 406:  
APN | Apéndices  
  
  
  
  
  
 406 MARÍA BRAVO SANTILLANA