



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Caracterización genética de cepas probióticas para su uso como alternativas a los antibióticos en producción aviar

Trabajo Final de Grado de Biotecnología

Laura Sáez Fuertes

Junio 2020

Tutor académico

Dr. Cristina Reguant Miranda

cristina.reguant@urv.cat

Tutor profesional

Dr. Joan Tarradas Font

joan.tarradas@irta.cat

**Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
(IRTA)**

Jo, Laura Sáez Fuertes , amb DNI “18455290-K”, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 8 de junio de 2020

A handwritten signature in black ink, consisting of a horizontal line with a stylized, scribbled mark above it.

El trabajo de final de grado se ha desarrollado durante el periodo de Prácticas Externas en el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)-Mas Bové bajo la supervisión de Dr. Joan Tarradas Font.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar al personal del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) Mas Bové por haberme brindado la oportunidad de poder realizar este trabajo con ellos. En especial al Dr. Joan Tarradas Font por su implicación en el desarrollo del trabajo y su paciencia durante esta etapa y por todo lo que me ha enseñado. Además a Sofía Marcos y Antton Alberdi por su ayuda constante.

A mis amigos de Teruel por hacer la distancia un poco más corta y así no olvidarme nunca de dónde vengo, a la gente que ha estado conmigo estos cuatro años en Tarragona y a La Resistencia 3.3 por hacer la vida universitaria más amena dejando de lado la cordura. Y, a Elena Herrero por pasar esta cuarentena juntas como si fuera una luna de miel.

Por último, a mi familia por estar siempre conmigo y apoyarme en cada paso que doy.

Índice

Resumen	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Problemática	6
1.2. HoloFood.....	8
1.3. Intestino y microbiota.....	10
1.4. Probióticos	10
1.4.1. Probiogenómica.....	11
1.4.2. Modos de acción	11
1.4.3. Genes relevantes en los probióticos	14
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
2.1. Hipótesis	16
2.2. Objetivos	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Obtención de muestras y extracción de ADN	17
3.2. Secuenciación de las cepas bacterianas.....	18
3.3. Ensamblaje genómico	18
3.4. Anotación	18
3.5. Búsqueda bibliográfica de cepas <i>Bacillus subtilis</i> ya disponibles.....	19
3.6. Búsqueda bibliográfica de genes relevantes	19
3.7. Análisis de datos	19
3.7.1. Análisis dirigido.....	20
3.7.2. Análisis masivo	22
4. RESULTADOS	22
4.1. Caracterización <i>Bacillus subtilis</i> DSM32324 y DSM32325	22
4.2. Análisis de la búsqueda dirigida	25
4.2.1. Genes de resistencia a antibióticos.....	25
4.2.2. Genes relacionados con la producción de vitaminas	27
4.2.3. Genes codificantes de enzimas endógenas bacterianas.....	29

4.2.4. Genes codificantes de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas).....	29
4.2.5. Otros genes relevantes	30
4.3. Búsqueda masiva de genes minoritarios relevantes en función probiótica	31
5. DISCUSIÓN.....	33
6. CONCLUSIÓN.....	38
7. AUTOEVALUACIÓN.....	38
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39
9. ANEXOS.....	45

Resumen

El aumento de consumo de carne ha incrementado el uso de antibióticos mejorando el rendimiento animal, pero propiciando la aparición de resistencias antimicrobianas. La UE prohibió el uso de antibióticos como promotores de crecimiento (2006), generando una intensa búsqueda de productos alternativos con efectos beneficiosos similares a los antibióticos, entre los que destacan los probióticos. Los recientes avances en secuenciación masiva hacen económicamente viable el análisis genético completo de cepas bacterianas, permitiendo discernir los genes específicos que confieren capacidad probiótica.

El objetivo de este trabajo es desarrollar una novedosa herramienta, basada en la caracterización de genomas bacterianos, que facilite la detección de nuevas cepas probióticas candidatas mediante la identificación de genes relevantes para la probiosis. Para crear esta herramienta, se han caracterizado genéticamente dos cepas probióticas conocidas (ambas *Bacillus subtilis*) mediante un análisis dirigido y uno masivo. El enfoque dirigido se ha basado en la detección de genes conocidos que confieren capacidad probiótica. Se han identificado genes de resistencia a antibióticos, síntesis de compuestos esenciales, enzimas, bacteriocinas, proteínas de adhesión al epitelio y de resistencia al ambiente ácido gástrico. El enfoque masivo se ha centrado en la búsqueda de genes minoritarios presentes en los *Bacillus* conocidos para identificar si son éstos los que confieren la capacidad probiótica diferencial demostrada *in vivo*.

Tras estos análisis, se ha conseguido generar una base de datos de genes relevantes para la probiosis permitiendo caracterizar nuevas cepas candidatas tras su secuenciación. Para validar esta herramienta serán necesarios futuros estudios de metatranscriptómica e *in vivo*.

Palabras clave: Immunomodulación, probiótico, industria alimentaria, caracterización genética.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática

La demanda de consumo de proteína animal aumenta a medida que avanza el desarrollo de los países y el crecimiento de la población mundial (1). Las principales explotaciones de animales para la producción de alimento de consumo humano son ganado porcino, aves domésticas y vacuno (2). La *Organisation for Economic Co-operation and Development-Food and Agricultural Organisation (OECD-FAO)* estima que el consumo mundial de carne aumentará entre 2019 y 2030 en 46 millones de toneladas, alcanzando los 35.7kg per cápita (2). Este consumo se verá incrementado de forma notable en regiones del planeta en desarrollo como África y América Latina (Fig. 1) (2). El aumento del consumo de carne aviar se debe a las ventajas que aporta como la asequibilidad, imagen saludable, conveniencia y disminución de la huella ecológica (2).

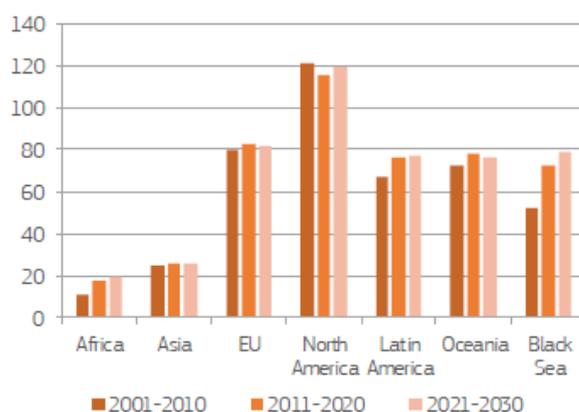


Figura 1. Consumo de carne per capita (kg/capita/año) (2)

Este gran volumen de producción ha incrementado de forma notable el uso de antibióticos como factores de crecimiento y/o terapéuticos aumentando potencialmente la presión de selección en las bacterias y, por lo tanto, favoreciendo la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos (AMR) (1). Se estima que más del 80% del consumo de antibióticos a nivel mundial van destinados a la producción animal. Este uso masivo de antibióticos en la producción de ganado incrementa exponencialmente el riesgo de aparición y propagación de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (3). Debido a este motivo, la Unión Europea (UE) prohibió el uso de antibióticos como factores de crecimiento (AGP) en 2006 (regulación del 2003) en animales de producción (4). Es necesario tener en cuenta que una gran parte de los antibióticos que se utilizan en la producción animal también son usados en medicina humana como tratamiento de infecciones comunes e intervenciones médicas, cirugías y quimioterapia. Cabe resaltar

que las bacterias resistentes generadas en animales pueden infectar a los humanos a través del ambiente, alimentos o de forma directa mediante el contacto con agricultores o ganaderos desencadenando la aparición de enfermedades bacterianas difícilmente tratables (1).

Antes del 2006, los antibióticos se podían suministrar de forma terapéutica y subterapéutica en la UE. Las dosis subterapéuticas de antibióticos se suministraban de manera continuada en pequeñas cantidades durante todo el ciclo productivo, ya que favorecían su rendimiento. Se ha demostrado que el uso de AGP genera una respuesta positiva en el 72% de los casos de su aplicación, mejorando entre un 3-5% el crecimiento y la eficiencia de conversión del alimento, reduciendo la mortalidad e incrementando la resistencia a infecciones (5). Tras el establecimiento de la regulación en la UE, la administración de antibióticos se ha limitado a su uso terapéutico, es decir, únicamente a casos en los que los animales de producción sufren una infección bacteriana (4). Aún así, se espera que en 2030 el consumo de antibióticos aumente un 67% en todo el mundo (1) debido principalmente al incremento de la demanda de carne en países en desarrollo (Fig. 2) (1).

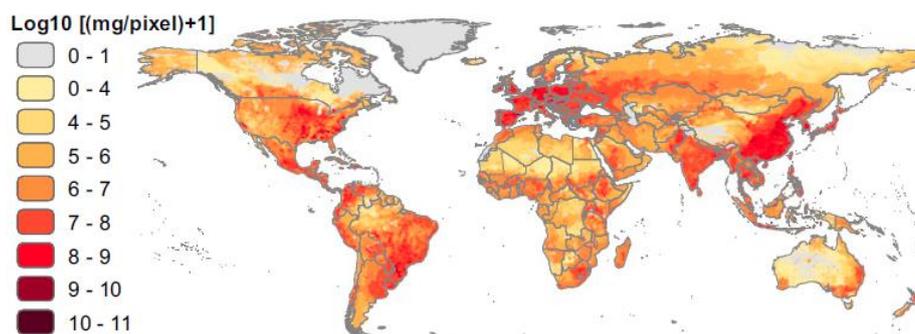


Figura 2. Consumo global de antibióticos en la producción en miligramos por 10km2 (1)

Debido a la gran importancia social y económica que tiene la industria de las aves de corral, se debe tener en cuenta que la reducción del uso de antibióticos puede tener efectos negativos, como el incremento de la prevalencia de bacterias que provocan enfermedades zoonóticas (ej. *Salmonella* spp. o *Campylobacter* spp). Las bacterias zoonóticas son aquellas que pueden ser transmitidas de animales a humanos mediante picaduras, heridas, consumo de alimentos de origen animal, etc. (6). Contrariamente, si no se reduce el uso de los antibióticos en animales, estas mismas cepas zoonóticas se pueden convertir en resistentes poniendo en riesgo la salud humana (7). Aunque la retirada de los antibióticos como AGP es esencial para evitar la aparición de resistencias antimicrobianas, esto provocará una disminución de la productividad y un aumento de patologías (potencialmente zoonóticas) en los animales. Además, esta reducción en el rendimiento animal agravará el problema de demanda de carne en los próximos años y

limitará la disponibilidad de materias primas (8). Esta compleja problemática hace que sea necesaria la búsqueda de productos alternativos a los antibióticos que sean capaces de conferir los mismos efectos beneficiosos que los antibióticos pero evitando la aparición de AMR.

Numerosos estudios han demostrado que la microbiota intestinal tiene efectos beneficiosos sobre el rendimiento del animal, la barrera intestinal y la modulación del sistema inmune. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se han desarrollado estrategias que modulan la microbiota intestinal con el objetivo de mejorar la producción de alimentos mediante la suplementación de la dieta con probióticos y prebióticos (9).

Hasta la actualidad, la caracterización de cepas probióticas se ha realizado mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. Los estudios *in vitro* se utilizan de forma recurrente para determinar la capacidad de una cepa a ser utilizada como probiótica (resistencia a sales biliares, presencia de resistencias a antibióticos, etc.). Los estudios *in vivo* permiten descubrir capacidades probióticas concretas sobre el huésped mediante el análisis específico de biomarcadores (inflamación, reducción de patógenos, mejora de la morfología intestinal, etc.) y de rendimiento (peso, consumo, y conversión). Este tipo de estudios ha permitido incrementar el conocimiento de procesos concretos, pero se desconocen totalmente las interacciones biomoleculares que se dan entre la microbiota y el huésped de forma global.

1.2. HoloFood

El proyecto europeo HoloFood (10) nace de la necesidad de generar una alternativa que mejore los sistemas de producción. Este proyecto se centra en comprender todos los procesos biomoleculares y fisiológicos que se modifican al incorporar un aditivo en la dieta de los animales de producción sobre la microbiota y el huésped.

HoloFood pretende realizar un análisis holístico de las interacciones microbiota-huésped mediante un estudio holo-ómico con en el que se aspira a desarrollar una gran base de datos que permita analizar y entender estas interacciones. El avance holo-ómico considera al holobionte (huésped y su microbiota) como una única unidad, por lo que es necesario comprender las interacciones entre el genoma y transcriptoma del huésped y el metagenoma y metatranscriptoma de la microbiota. El estudio de todas estas interacciones permitirá entender cómo interactúa la alimentación, el huésped y la microbiota para generar el fenotipo del huésped (Fig. 3) (11).

El proyecto HoloFood tiene como objetivos globales optimizar los niveles de producción de la industria animal mediante la mejora de las diferentes fases de las líneas de producción y demostrar que la comprensión de las interacciones entre la dieta, el microbioma y el huésped permitirá mejorar la productividad. El proyecto analiza este

concepto en dos modelos animales, salmones y pollos. En ambos se llevan a cabo estudios de caracterización genómico, transcriptómico y metabolómico tanto del huésped como de la microbiota intestinal.

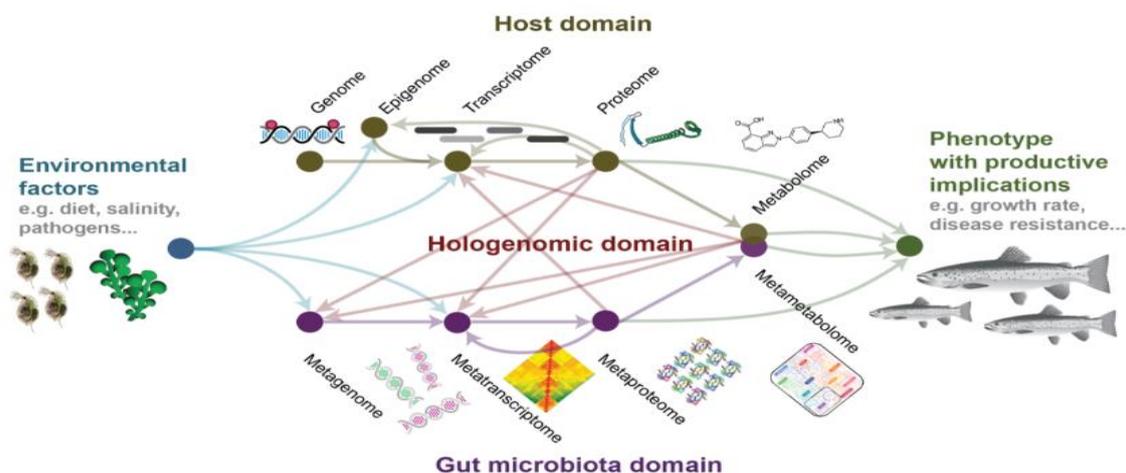


Figura 3. Las interacciones moleculares entre el huésped (animal) y su respectivo microbioma son desencadenadas por factores ambientales y generan variaciones en la producción (11)

Este proyecto se agrupa en diferentes *work packages* (WP) organizando de manera muy precisa las tareas de cada entidad que lo forman. Los primeros WP-1;3 se encargan de los análisis y organización a nivel general durante todo el proyecto. En los WP-4;6 se desarrollan los estudios experimentales:

- 1) Realización de los estudios *in vivo* donde se analizan los efectos de un producto comercial probiótico sobre índices de rendimiento clave y otros parámetros relevantes (seguridad, calidad, bienestar, etc.).
- 2) Análisis de parámetros morfológicos, metabolómicos y de inmunidad intestinal.
- 3) Análisis genético y transcriptómico de los huéspedes (*background* genético de los animales) y de su microbiota mediante técnicas -omics.
- 4) Creación de una base de datos con todos los resultados para identificar las interacciones específicas inducidas por la presencia del probiótico en la dieta.

Enfocando el estudio en la rama de la industria aviar, se analiza la influencia de la dieta, el fondo genético del huésped y del microbioma sobre los parámetros de producción.

El producto probiótico analizado en este proyecto se comercializa en Estados Unidos y se espera que sea aceptado para su comercialización en la UE en 2020-2021. Este aditivo está compuesto por tres cepas bacterianas, dos de ellas son *Bacillus subtilis* (DSM32324 y DSM32325) y una es *Bacillus amiloquefaciens* DSM25840.

Este Trabajo de Fin de Grado se centra en la caracterización metagenómica de las dos cepas *Bacillus subtilis* (DSM32324 y DSM32325) el objetivo de incorporar la información obtenida a la base de datos final del proyecto.

1.3. Intestino y microbiota

El tracto digestivo es una de las principales vías de entrada de antígenos foráneos y patogénicos al organismo. La barrera intestinal juega un papel determinante en la protección del huésped ya que es capaz de diferenciar los antígenos inocuos o propios de los patogénicos desencadenando una respuesta inmune adecuada a cada situación. La salud intestinal (funcionalidad gastrointestinal) puede describirse como el equilibrio entre la dieta, la eficiencia en la digestión y absorción, la efectividad de la respuesta inmunitaria, la microbiota, la mucosa intestinal, y las funciones motoras y endocrinas del intestino. Si cualquiera de estos factores sufre una alteración negativa se puede generar la pérdida de la homeostasis, disbiosis de la microbiota y alteración de la barrera intestinal generando finalmente inflamación intestinal (12).

El intestino está formado por numerosas poblaciones bacterianas que forman la microbiota intestinal. Estudios anteriores han sugerido que el fenotipo del huésped se ve influido por la composición de su microbiota intestinal. Estas bacterias desempeñan funciones fisiológicas como el procesamiento de nutrientes, el control de la homeostasis o la protección ante patógenos mediante la exclusión competitiva. Las poblaciones que conforman la microbiota pueden ser moduladas mediante la suplementación de probióticos en la dieta (13).

Las poblaciones bacterianas intestinales son muy diversas y desempeñan funciones relevantes para la absorción, protección y metabolismo del animal. El intestino está colonizado principalmente por bacterias del *phylum Firmicutes* y *Bacteroidetes* que mejoran la capacidad de obtener energía. La mayoría de las bacterias de *Bacteroidetes* facilitan la digestión y utilización de los nutrientes (14) y la fermentación de sustratos para la producción de ácidos grasos de cadena corta (*short chain fatty acids*-SCFA) (15). Por otro lado, bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium*, *Eubacterium* y *Ruminococcus* están involucradas en la digestión de la fibra (13). Por ejemplo, *Eubacterium halli* participa metabolizando el glicerol a 3-hidroxipropionato que forma parte de la reuterina, la cual tiene efectos antimicrobianos contra un amplio rango de patógenos (16). Otro género bacteriano importante en la microbiota intestinal es *Oscillospira*; algunas especies de este género han demostrado efectos en la digestión del almidón y en la producción de butirato, éste último es uno de los principales SCFA el cuál ha demostrado desempeñar funciones antiinflamatorias y antimicrobianas (17).

1.4. Probióticos

Los probióticos también son denominados microorganismos ingeridos directamente (DFMs) y son una alternativa potente para mejorar la eficiencia productiva. Inicialmente fueron definidos como “suplementos de alimentación microbiana que afectan

beneficiosamente al animal huésped al mejorar su equilibrio microbiano intestinal" (18). Una definición más reciente y precisa es "Los probióticos son cultivos mono o mixtos de organismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped" (19).

El interés de los beneficios que aportan los probióticos se remonta al 1908 cuando se le otorgó a Elie Metchnikoff el premio Nobel por los descubrimientos en el campo de los microorganismos beneficiosos (20). La comercialización de productos que contienen probióticos ha crecido de forma exponencial en las últimas décadas, tanto para consumo humano como animal. Aun así, la autorización de comercialización de un probiótico para uso animal debe ser otorgada por parte de la autoridad competente (*European Food Safety Authority* – EFSA). Esta autorización solo se obtiene tras una evaluación exigente del producto en la que se realiza una caracterización funcional y un análisis de seguridad tanto *in vivo* como *in vitro*. También se analizan la presencia o ausencia de genes de resistencia a antibióticos, loci relacionados con la virulencia y la producción de metabolitos bacterianos nocivos (21).

1.4.1. Probiogenómica

La probiogenómica abarca la genética y la biología molecular de las cepas bacterianas con potencial probiótico, incluyendo la transcriptómica y la metabolómica (22).

Los estudios probiogenómicos pretenden entender la secuencia genómica al completo e identificar los mecanismos moleculares que promueven la salud intestinal conferida por las cepas probióticas. Además, la probiogenómica permite identificar los mecanismos bacterianos que favorecen la adhesión celular, las interacciones con el huésped y la adaptación al tracto gastrointestinal (21).

Para identificar genes propios de bacterias se llevan a cabo estudio *in silico* donde se estudian los *clusters* de genes con potencial de producción de bacteriocinas, exopolisacáridos, proteínas superficiales, genes de tolerancia al estrés, etc. (21).

1.4.2. Modos de acción

Se han descrito diferentes modos de acción de los probióticos sobre el intestino del huésped, el sistema inmune (inmunomodulación), la microbiota y sobre el patógeno. Entre ellos cabe destacar 1) la competición contra los patógenos por los nutrientes, 2) la bioconversión de moléculas en compuestos más sencillos, 3) la producción de sustratos que favorecen el crecimiento, 4) el efecto directo contra los patógenos, 5) la exclusión competitiva, 6) la función de barrera de protección del epitelio, 7) el control de las vías de inflamación y 8) la modulación del sistema inmune (Fig. 4) (23).

Aunque se han descrito diversos modos de acción de los probióticos, hay que considerar que su eficacia y actuación varía en función de diversos parámetros entre los que se incluyen la propia cepa bacteriana, la dieta, la dosis suministrada y la edad del animal (24).

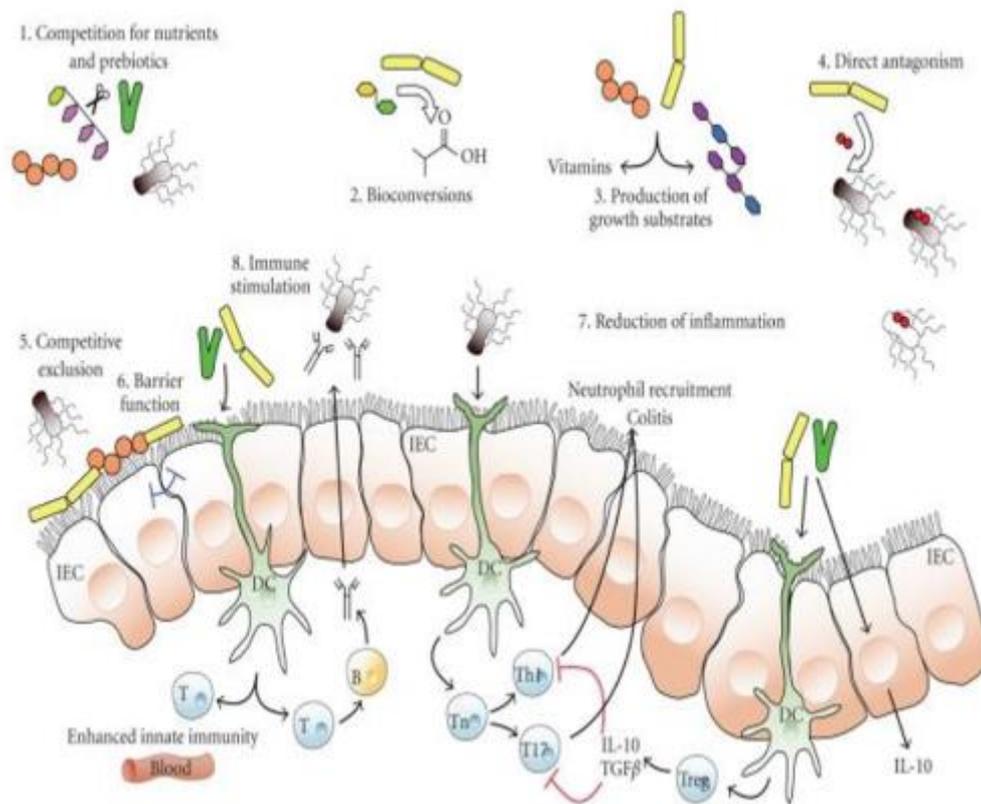


Figura 4. Diferentes modos de acción de los probióticos (23)

Entre los principales géneros bacterianos utilizados como probióticos, destacan *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. y *Bacillus* spp.. Numerosas cepas de estos géneros han demostrado tener potencial para combatir enfermedades en humanos como la obesidad, enfermedades cardiovasculares y la diarrea. Por ejemplo, las bacterias probióticas (activas de hidrolasa de sal biliar) pueden reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular debido a su capacidad para reducir los niveles de colesterol (25).

Géneros bacterianos como *Lactobacillus* y *Bacillus* han demostrado la capacidad de inhibir el crecimiento de otras especies bacterianas por exclusión competitiva. *Lactobacillus* por lo general tiene efectos inhibitorios en especies cercanas evolutivamente mientras que *Bacillus* tiene un espectro de inhibición más amplio (26). Además, las bacterias que pertenecen al género *Bacillus* son capaces de formar esporas, factor favorece que sean candidatos a ser probióticos ya que ofrecen una alta

tolerancia a los ambientes ácidos (estómago) y una gran estabilidad a altas y bajas temperaturas (inclusión en piensos peletizados) (20).

Las cepas *B. subtilis* DSM32324 y DSM32325 han sido evaluadas *in vivo*. Se ha observado que estas cepas favorecen la colonización del intestino de gallinas con géneros bacterianos beneficiosos como *Penibacillus*, *Eubacterium* y *Coprobacillus* (13). Del mismo modo, estudios realizados en cerdos indicaron que la adicción de alguna de las cepas testadas en la dieta favorecía el ratio de conversión de alimento, además de reducir el número de tratamientos veterinarios requeridos debido a ileítis (27).

Estos estudios permiten concluir que la colonización intestinal por parte de poblaciones bacterianas con capacidad probiótica tiene efectos positivos sobre el crecimiento, la salud intestinal y el metabolismo del huésped. Además, estas cepas tienen un efecto indirecto evitando la colonización de organismos patógenos mediante exclusión competitiva (28).

Estudios similares en los que se pone a prueba la eficacia de una bacteria *B. subtilis* (DSM29788) observaron que la suplementación de la dieta con esta bacteria tenía efectos probióticos diferentes en función de la fase de crecimiento en gallinas ponedoras (29). En la fase de crecimiento, se vio una relación entre la tasa bacteriana (*Firmicutes* y *Bacteroidetes* principalmente) y los SCFA y la retención de nutrientes asociadas al crecimiento. De diferente modo, en las fases de desarrollo y puesta se observó un aumento de las bacterias con efectos fisiológicos beneficiosos, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, las cuales se asocian con la producción de ácido láctico que reduce el pH del intestino evitando el crecimiento de bacterias patógenas (29).

En la UE, el organismo oficial *European Food Safety Authority* (EFSA) determina las características que deben tener todos los microorganismos que se utilicen como aditivos de la dieta o como productores de sustancias de interés, y autoriza su comercialización. Para que un producto se pueda comercializar como aditivo en pienso, se debe llevar a cabo la identificación de la bacteria, analizar la susceptibilidad antimicrobiana, la producción de sustancias antimicrobianas y analizar la toxicidad y patogenicidad. Además, es necesario demostrar la eficacia del producto sobre los parámetros específicos estudiados que modula la cepa bacteriana (30). Este análisis se centra únicamente en los efectos específicos sobre parámetros como el rendimiento (peso, consumo, conversión), la reducción de un patógeno en concreto, o la modulación de alguna vía metabólica del epitelio (secreción de mucinas o SCFA) o del sistema inmune (reducción de la inflamación). Aun así, se desconocen la mayoría de las interacciones de esta cepa bacteriana con la microbiota y con el huésped, ya que no se aborda el estudio de estas interacciones de forma global.

1.4.3. Genes relevantes en los probióticos

1.4.3.1. Resistencia a antibióticos

La presencia de genes de resistencia a antibióticos en el ADN de cepas potencialmente probióticas debe ser analizada para evitar su circulación.

La EFSA ha creado una lista de antimicrobianos relevantes para su uso en humanos y animales clasificándolos en dos grupos: antimicrobianos críticamente importantes (CIAs) y antimicrobianos de alta importancia (HIAs). En función de la presencia o ausencia de estos genes se determinará si las cepas bacterianas son aptas o no para utilizarse como aditivos. Si la resistencia antimicrobiana es inherente a las bacterias se denomina “resistencia intrínseca”. En este caso no se considera como un riesgo potencial para la salud. Sin embargo, cuando una determinada especie es resistente a un antibiótico en concreto se considera “resistencia adquirida” y requiere una investigación más profundizada (31). Los antibióticos que la EFSA considera que se deben evaluar son la Ampicilina, la Vancomicina, la Gentamicina, la Kanamicina, la Estreptomicina, la Eritromicina, la Clindamicina, la Tetraciclina, el Cloranfenicol, la Tilosina, la Ciprofloxacina, la Colistina y la Fosfomicina.

1.4.3.2. Biosíntesis de compuestos beneficiosos

La capacidad bacteriana de sintetizar compuestos que mejoren la salud gastrointestinal del huésped favorece su uso como aditivos de la dieta. Entre estos compuestos destacan las vitaminas las cuales son esenciales para numerosas vías metabólicas. El hecho de que las bacterias sean capaces de contribuir a su síntesis permite suplir los posibles déficits de vitaminas en el huésped evitando que la falta de algunas vitaminas derive en enfermedades (32).

1.4.3.3. Secreción enzimas endógenas bacterianas

La secreción de enzimas endógenas bacterianas por parte de los probióticos facilita la digestión de los alimentos ingeridos por el huésped ya que algunos de ellos carecen en parte de esta capacidad endógena (pollos y cerdos de primera edad). En la industria alimentaria, la dieta de los animales (cerdos o aves) suele estar basada en cereales, cuyo principal componente es la fibra. Esta fibra está formada por celulosa, hemicelulosa, arabinosilanos y otros compuestos como inulina, quitina y pectina (33).

La particularidad de la fibra es que su digestión no se produce por enzimas endógenas del huésped en el intestino proximal sino que las bacterias presentes en el intestino distal son las encargadas de fermentarla (34). La fermentación se realiza principalmente por carbohidrasas (xilanasas y β -glucanasas) y los principales productos de la fermentación bacteriana de la fibra son ácidos grasos volátiles (VFA) como SCFA o

branched chain fatty acids (BCFA), lactato, aminas, fenoles y gases como el dióxido de carbono y el metano. De todos estos compuestos los más relevantes son los SCFA, en especial el butirato que favorece el aporte de energía, la salud intestinal y el sistema inmune (Fig. 5) (34). La energía que aporta el butirato al huésped es de gran importancia para el ecosistema intestinal del huésped incrementando la proliferación de la mucosa epitelial y la altura de las vellosidades (35).

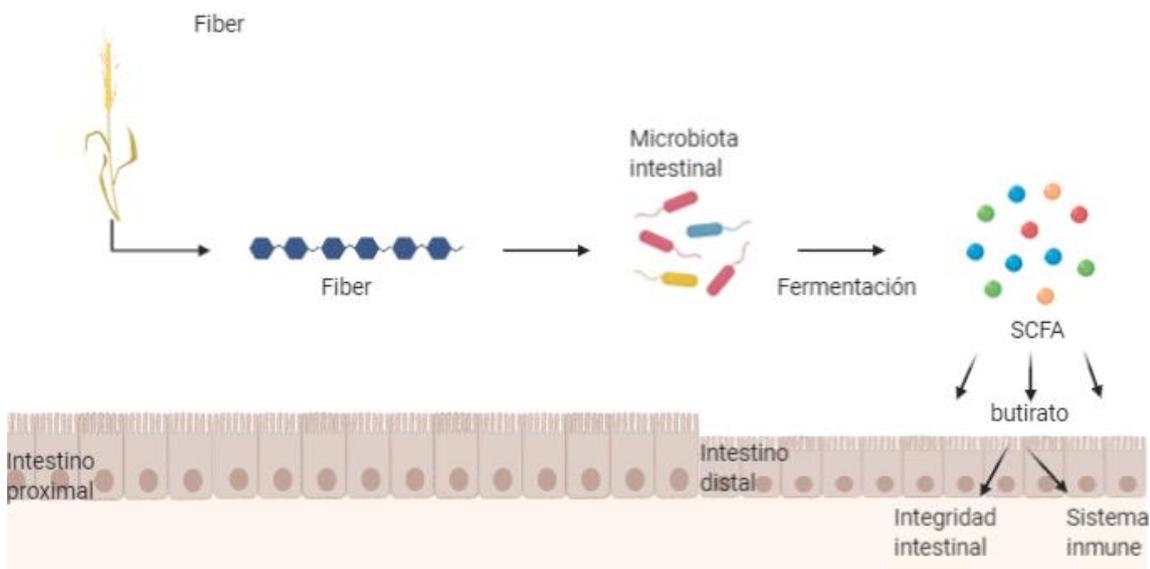


Figura 5. Metabolismo general de la fibra

1.4.3.3. Actividad antimicrobiana

Las bacterias pueden tener capacidad de sintetizar péptidos antimicrobianos (también llamados bacteriocinas) que les confieren capacidad antimicrobiana frente a otros microorganismos. Las bacteriocinas pueden clasificarse en función del tipo de organismo contra el que actúen ya sea bacterias o hongos. Esta capacidad de síntesis de compuestos antimicrobianos evita la colonización de organismos patógenos por exclusión competitiva (28). Las bacteriocinas son compuestos peptídicos con actividad bactericida que generan poros en la pared celular de patógenos de forma dirigida provocando su apoptosis (28).

El género *Bacillus* destaca por tener una gran cantidad de especies y cepas donde cada una de ellas tiene la capacidad de generar péptidos antimicrobianos y otros metabolitos de interés (36).

1.4.3.4. Genes relevantes en la adhesión al epitelio y resistencia al ambiente ácido gástrico

1.4.3.4.1. Resistencia al tracto gástrico

Los alimentos ingeridos antes de llegar al intestino pasan por el estómago cuya composición es de carácter ácido para realizar la digestión ácida. Los ácidos gástricos

del estómago actúan de barrera contra los microorganismos ingeridos, sin embargo, las bacterias utilizadas como probióticos deben ser capaces de resistir a estos ácidos (37). Además, las cepas probióticas también deben resistir los ácidos biliares sintetizados en el hígado y secretados desde la vesícula biliar al duodeno. Como particularidad, estos ácidos sufren modificaciones químicas (deshidrogenación, deshidroxilación, etc) en el colon y como resultado manifiestan actividad antimicrobiana contra el crecimiento de patógenos como *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Enterococcus* spp. (37).

1.4.3.4.2. Adhesión al epitelio

Una de las características de los probióticos es la capacidad de colonización del epitelio. Este hecho es posible gracias a la síntesis de proteínas que favorezcan la unión a las células epiteliales evitando que colonicen las bacterias patógenas. Por lo tanto, en la selección de probióticos es necesario considerar la presencia de genes que codifiquen para este tipo de proteínas (38).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

H1: La generación de una herramienta que incluya los genes relevantes involucrados en los efectos probióticos inducidos por cepas *Bacillus subtilis* permitirá seleccionar posibles cepas como probióticas mediante su secuenciación y análisis genético.

H2: El uso de esta herramienta o aplicación reducirá de forma significativa los análisis *in vitro* que se deben realizar de forma rutinaria a cepas probióticas candidatas para analizar y caracterizar sus posibles efectos probióticos.

H3: La inclusión en esta herramienta de genes relacionados con la resistencia a antibióticos, la fermentación de fibra y generación de SCFA, genes involucrados en biosíntesis de metabolitos (vitaminas), genes involucrados en la adaptación al ambiente ácido del intestino y la adhesión al epitelio y genes que participan en la síntesis de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) permitirá seleccionar cepas con una alta capacidad probiótica.

2.2. Objetivos

El objetivo general de este estudio es la creación de una herramienta que permita la selección de cepas de *Bacillus subtilis* mediante la detección de genes presentes en estas bacterias que han demostrado conferir capacidad probiótica.

Objetivos específicos:

O1: Selección, secuenciación y anotación de cepas probióticas *Bacillus subtilis* con efectos probióticos demostrados en experimentos *in vivo*.

O2: Generación de una base de datos que incluya cepas *Bacillus subtilis* secuenciadas previamente y disponibles en las diferentes plataformas genómicas existentes.

O3: Detección de genes bacterianos involucrados en vías metabólicas relevantes que mejoran el rendimiento y la salud intestinal del huésped mediante el análisis de la bibliografía existente.

O4: Selección de los genes relevantes detectados en el O3 y presentes en los genomas secuenciados en el O1 y en los genomas obtenidos en el O2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La siguiente figura (Fig. 6) resume la metodología seguida en este estudio y descrita en los siguientes apartados.

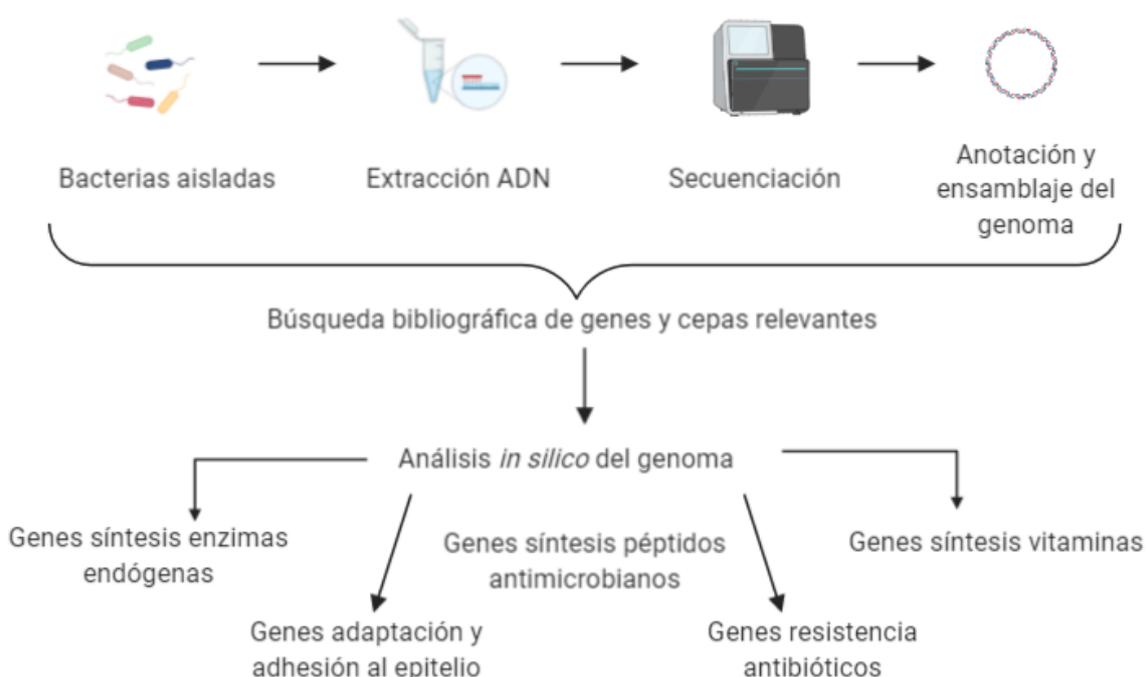


Figura 6. Protocolo general del proyecto

3.1. Obtención de muestras y extracción de ADN

Para llevar a cabo este estudio, se ha extraído el ADN de dos cepas bacterianas aisladas de *Bacillus subtilis* (DSM32324 y DSM32325). Estas cepas han sido utilizadas como probiótico en el proyecto Holofood y, junto con una cepa de *B. amyloliquefaciens*, forman

parte de un producto comercial (Gallipro® Fit). Este producto, que se comercializa en Estados Unidos y está en proceso de autorización en EU, se utiliza como aditivo de la dieta en la industria aviar ya que ha demostrado ser eficaz en la mejora de los parámetros productivos.

La extracción del ADN bacteriano se realizó utilizando un kit de extracción Qiagen® que permite obtener moléculas largas de ADN.

3.2. Secuenciación de las cepas bacterianas

Una vez extraído el ADN bacteriano se llevó a cabo la secuenciación de los genomas de ambas cepas. Para maximizar la calidad y fiabilidad de los resultados, se utilizaron dos métodos de secuenciación basados en el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos en las librerías.

Se creó una librería con fragmentos de ADN largos utilizando el kit de secuenciación de ADN de Oxford Nanopore *Ligation Sequencing kit*. Estas librerías genómicas fueron secuenciadas mediante el equipo minION (Oxford Nanopore Sequencing®), que permite la obtención de secuencias largas, las cuales facilitan los ensamblajes de los diferentes fragmentos, aunque la calidad de la secuencia no es muy elevada.

También se creó una librería con fragmentos de ADN cortos siguiendo el protocolo BEST (39). Se fraccionó el ADN extraído mediante un equipo de ultrasonificación (Covaris® LEE220) para obtener fragmentos de menos de 350 bases. La secuenciación de estas librerías se realizó mediante el equipo MGISEQ-2000 (BGI®) que permite obtener lecturas de secuencias cortas pero de alta precisión.

3.3. Ensamblaje genómico

Para realizar el ensamblaje de las secuencias genómicas obtenidas con los dos métodos de secuenciación, se utilizó un sistema híbrido de ensamblaje Unicycler: *hybrid assembly pipeline* (40). Esta plataforma ensambla primero las lecturas cortas en un gráfico de ensamblaje preciso y después utiliza las lecturas largas para encontrar las mejores conexiones entre estos *contigs*. El resultado final es un ensamblaje completo del genoma de alta calidad.

3.4. Anotación

Una vez ensamblados los fragmentos secuenciados y reconstruidos los genomas completos, se obtiene una única secuencia de cada genoma en formato FASTA. Estos archivos FASTA fueron anotados mediante el *pipeline Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) (41) del portal National Center for Biotechnology Information (NCBI). El sistema PGAP permite anotar los genomas bacterianos utilizando un enfoque pangénomico, es decir, identifica los genes y proteínas en función de lo común que sean

en un clado específico del árbol filogenético (42). Se decidió utilizar la metodología PGAP para la anotación de los genomas ya que permite que los resultados sean comparables con los genomas ya disponibles en el portal NCBI.

3.5. Búsqueda bibliográfica de cepas *Bacillus subtilis* ya disponibles

Se utilizó la plataforma NCBI *GenBank* (43) con el objetivo de crear una base de datos de diferentes cepas de *Bacillus subtilis* ya secuenciadas y hacer un análisis filogenético con las cepas de estudio. Se seleccionaron un total de 116 cepas, todas ellas con la secuencia del genoma completa y las anotaciones compatibles con las dos cepas de estudio. Esta base de datos permitió establecer el nivel evolutivo de las dos cepas *B. subtilis*, la comparación de genes y la creación de un árbol filogenético.

3.6. Búsqueda bibliográfica de genes relevantes

Con el objetivo de identificar cuáles son los genes presentes en las bacterias que les confieren propiedades probióticas, se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes que han demostrado ser relevantes en la mejora de la salud intestinal. Se ha realizado un análisis de los genes involucrados en a) la resistencia a antibióticos, b) la síntesis de compuestos esenciales para el huésped (vitaminas), c) la síntesis de enzimas, d) la síntesis de metabolitos secundarios (bacteriocinas), e) la adaptación al ambiente ácido del tracto gastrointestinal y f) la síntesis de proteínas que favorecen la adhesión al epitelio.

La detección de genes relevantes se ha realizado mediante la búsqueda de estudios experimentales a través del portal NCBI *Pubmed* (44). Además, se ha utilizado la plataforma Subtiwiki (45) para identificar vías metabólicas o procesos en los que participan estos genes. Subtiwiki (45) es una base de datos que permite el acceso a información específica de genes y proteínas involucradas en las vías metabólicas de *Bacillus subtilis*.

A partir de esta búsqueda bibliográfica se ha creado un listado de posibles genes relevantes que pueden ser susceptibles de conferir capacidad probiótica en las cepas *B. subtilis*. La presencia o ausencia de estos genes en las cepas *B. subtilis* DSM32324 y DSM32325 ha sido examinada mediante la herramienta *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (Blastn) (46) del portal NCBI.

3.7. Análisis de datos

Con el objetivo de maximizar la información obtenida con el análisis de datos, se han realizado dos tipos de enfoques, el análisis dirigido y el masivo. El análisis dirigido se basa en la búsqueda de genes específicos relacionados con las funciones biológicas

que desempeñan. El análisis masivo identifica genes minoritarios presentes en algunas cepas probióticas que pueden intervenir en los efectos probióticos sobre el huésped.

3.7.1. Análisis dirigido

Para analizar todos los datos obtenidos, se utilizó la plataforma PangenomeX (panX). En primer lugar, se realizó la caracterización general de las cepas propias (*Bacillus subtilis* DSM32324 y DSM32325) a partir de las secuencias anotadas utilizando el programa Geneious. Se describió la longitud del genoma, el %GC, el número de genes codificantes de proteínas, el número de CDS, tARN, ncARN y rARN. Del mismo modo, utilizando el análisis MAUVE (Geneious) se alinearon las dos cepas testadas.

Una vez caracterizadas, se realizó un análisis pangenómico utilizando la plataforma PangenomeX (47). Este análisis pangenómico permite realizar un análisis genómico amplio y abordar así la problemática de la alta variabilidad en las secuencias de los mismos genes de las bacterias de una misma especie. Por este motivo se estudian los diferentes clados para obtener información de la evolución bacteriana o de la adaptación de la población a los diferentes ambientes (48).

Para realizar este análisis, se compararon los genes de las 116 cepas obtenidas de *Genbank* (43) con los genes de las dos cepas de estudio mediante el paquete de análisis y exploración del propio software (49) y se visualizaron los resultados usando el paquete de visualización (50). En el criterio de selección de cepas de *Bacillus subtilis* se descartaron todas las cepas cuyos genomas no estuvieran secuenciados al completo.

3.7.1.1. Genes de resistencia a antibióticos

A continuación, se realizó el análisis de los genes que confieren a las bacterias resistencia a antibióticos (especificados por la EFSA). La EFSA decreta las características que deben tener los microorganismos que se utilizan como aditivos de la dieta o como productores de sustancias de interés. Entre estos criterios está la ausencia de genes que ofrecen resistencia a antibióticos (30). Para realizar este análisis se utilizó la herramienta Blastn (46) del NCBI. En todos los casos se realizó el Blastn (46) con *Bacillus subtilis* DSM32324 y DSM32325 y el gen de resistencia del antibiótico presente en bacterias *Bacillus subtilis* (siendo en la mayoría de los casos *Bacillus subtilis* 168 o *Bacillus subtilis* SR10).

Por otro lado, también se realizó la búsqueda de *clusters* de genes que ofrecen resistencia a antibióticos utilizando la plataforma CARD (51).

3.7.1.2. Genes relacionados con la producción de vitaminas

La identificación de genes involucrados en la síntesis de vitaminas se realizó con la plataforma Subtiwiki (45) ya que permite la agrupación de los genes por la vía metabólica en la que participan. Se identificaron los genes que participan en la síntesis de las vitaminas biotina, folato, riboflavina y tiamina. Subtiwiki contiene la secuencia de nucleótidos de los diferentes genes implicados facilitando el uso de la herramienta Blastn (46) para identificar su presencia en *Bacillus subtilis* DSM32324 y DSM32325.

3.7.1.3. Genes codificantes de enzimas endógenas bacterianas

Una vez analizados todos los efectos positivos que tienen los productos derivados de la fermentación de la fibra, se estudiaron los genes que codifican para las enzimas necesarias en su fermentación. Siguiendo la misma metodología descrita en el punto anterior se realizó la identificación de genes que codifican enzimas endógenas bacterianas que intervienen en el metabolismo del carbono, más concretamente, en la degradación de xylosa y β -glucanos. La identificación de estos genes favorecería el uso de estas bacterias como probióticos ya que participarían en la degradación de la fibra aumentando el rendimiento del animal. En Subtiwiki (45) se buscaron las enzimas xylanasa y β -glucanasa para realizar Blastn (46) y evaluar su presencia en *Bacillus subtilis* DSM32324 y DSM32325.

3.7.1.4. Genes codificantes de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas)

Los metabolitos secundarios también son esenciales en las bacterias utilizadas como probióticos ya que actúan por exclusión competitiva evitando la colonización del intestino por bacterias patógenas. Entre los metabolitos secundarios más destacados se encuentran las bacteriocinas que son pequeños péptidos con actividad antimicrobiana. La identificación de estos péptidos se realizó utilizando la plataforma antiMASH (52) y el portal Blastn (46) de NCBI. La plataforma antiMASH (52) permite el análisis del metabolismo secundario de las bacterias y determinación de compuestos bioactivos que participan en múltiples vías. Además, antiMASH (52) permite la identificación de diferentes *clusters* de genes con potencial antimicrobiano (52). Por otro lado, se identificaron los metabolitos secundarios analizados mediante Blastn (46) por comparación con cepas cercanas (*Bacillus subtilis* 168 o *Bacillus subtilis* SR10) a las de estudio.

3.7.1.5. Otros genes relevantes

Por último, se estudiaron genes que facilitan la adhesión al epitelio intestinal y la resistencia al ambiente ácido del tracto gastrointestinal. Los genes identificados

bibliográficamente se buscaron en el portal *Gene* de NCBI y se realizó un Blastn (46) con los genes de especies utilizadas como genomas de referencia en estudios anteriores (*Bacillus subtilis* 168 o *Bacillus subtilis* SR10).

3.7.2. Análisis masivo

La búsqueda masiva de genes minoritarios que pueden estar relacionados con la capacidad probiótica de las cepas de estudio se realizó utilizando la base de datos creada en panX. En este caso se analizaron los genes presentes en las cepas de estudio *B. subtilis* DSM32324 y DSM32325 y en una pequeña parte de las cepas incluidas en la base de datos global. Esta búsqueda se hizo para caracterizar los posibles genes que otorgan capacidades específicas a las cepas probióticas testadas. Toda la información recopilada se obtuvo en su mayoría de la base de datos InterPro (62) y KEEG (63).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización *Bacillus subtilis* DSM32324 y DSM32325

El producto probiótico analizado está formado por tres bacterias (*Bacillus subtilis* DSM32324 y DSM32325 y *Bacillus amiloquelificans* DSM25840) de las cuales el estudio se centra en las dos primeras. Estos dos organismos tienen la siguiente clasificación taxonómica: Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.

El genoma completo de *B. subtilis* DSM32324 (*Bacillus_subtilis_1*) está formado por un único cromosoma de ADN circular y no contiene plásmidos. La longitud de su secuencia genómica es de 4.096.0711 pb y su contenido de GC es del 43.9% (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización cepas *Bacillus subtilis* DSM32324 y DSM32325

Características	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32324 (1)	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32325 (2)
Tamaño del genoma (pb)	4.069.711	4.103.542
Nº de contigs	1	1
Contenido %GC	43,90%	43,90%
ADN codificante (CDS)	4.079	4.083
rARN	30	33
tARN	86	92
ncARN	4	4
Nº genes	4.200	4.213

El genoma completo de *B. subtilis* DSM32325 (*Bacillus_subtilis_2*) está formado por un único cromosoma de ADN circular y tampoco contiene plásmidos. Su genoma está formado por un total de 4.103.542 de pb y también contiene un 43.9% de GC (Tabla 1). Las anotaciones realizadas con el *pipeline* PGAP determinaron que el número de genes

que codifica *B. subtilis* DSM32324 es de 4.200 mientras que *B. subtilis* DSM32325 codifica para 4.213 genes; los tARN de su secuencia son 86 y 92; de rARN 30 y 33 respectivamente y de ncARN en ambas bacterias es 4.

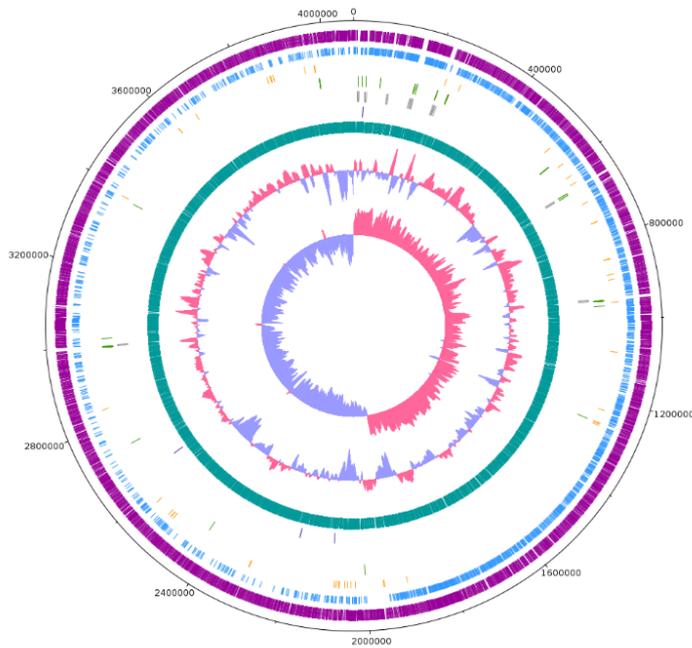


Figura 7. Genoma *Bacillus subtilis* DSM32324

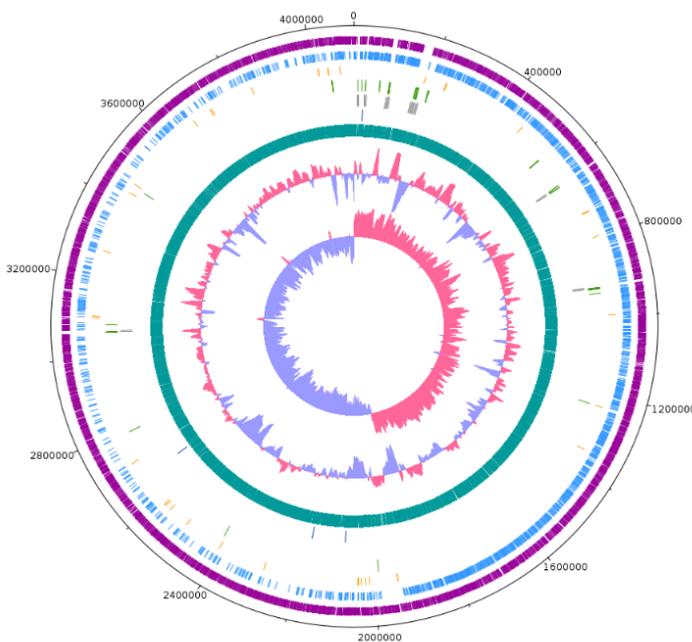


Figura 8. Genoma *Bacillus subtilis* DSM32325

- CDS
 - CDS forward
 - CDS reverse
 - tRNA
 - rRNA
 - ncRNA
 - Genes
-
- G+C content and skew
 - Below average
 - Above average

4.2. Análisis de la búsqueda dirigida

4.2.1. Genes de resistencia a antibióticos

La susceptibilidad antimicrobiana regulada por la EFSA determina que las bacterias no deben poseer genes que aporten resistencia a determinados antibióticos. Los antibióticos listados por la EFSA y que se han utilizado para detectar resistencias en las cepas de estudio son: Ampicilina, Vancomicina, Gentamicina, Kanamicina, Estreptomicina, Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina, Cloranfenicol, Tilosina, Ciprofloxacina, Colistina y Fosfomicina.

Los resultados indicaron que las cepas de *B. subtilis* DSM32324 y DSM32325 presentan genes de resistencia solo para cuatro antibióticos (Estreptomicina, Tilosina, Colistina y Fosfomicina) de los trece establecidos por la EFSA. Los porcentajes de identidad de cada uno de ellos están reflejados en la tabla (Tabla 2). Aun así, la EFSA dictamina que estos genes pueden estar presentes siempre y cuando los niveles de expresión de estos estén dentro de unos los valores máximos establecidos (30).

Tabla 2. Genes que ofrecen resistencia a los antibióticos decretados por la EFSA

Genes resistencia antibióticos	Nombre completo	Identidad <i>Bacillus subtilis</i> DSM32324	Identidad <i>Bacillus subtilis</i> DSM32325
<i>D616_p88001</i>	Ampicilina	SSS*	SSS
<i>EAS44_RS03965</i>	Vancomicina	SSS	SSS
<i>aacC2</i>	Gentamicina	SSS	SSS
<i>aphA1</i>	Kanamicina	SSS	SSS
<i>aadk</i>	Estreptomicina	98,13%	98,59%
<i>BG05_RS16005</i>	Eritromicina	SSS	SSS
<i>KCY_RS0100105</i>	Clindamicina	SSS	SSS
<i>tetL</i>	Tetraciclina	SSS	SSS
<i>cat</i>	Cloramfenicol	SSS	SSS
<i>ybgB</i>	Tilosina	98,19%	99,64%
<i>unknown</i>	Ciprofloxacina	SSS	SSS
<i>gdpP</i>	Colistina	99,39%	99,65%
<i>fosB</i>	Fosfomicina	98,85%	98,85%

*SSS: Sin similitud significativa

A parte de los criterios de la EFSA, se evaluaron otros genes que ofrecen resistencia a antibióticos. El análisis realizado con CARD reveló genes con resistencia a antibióticos en función del *match*. Este análisis también permitió identificar los diferentes genes, la familia a la que pertenecen, la clase de antibiótico a la que resiste y su mecanismo de resistencia.

La cepa *Bacillus subtilis* DSM32324 contiene el gen *ImrB* con un 100% de identidad que ofrece resistencia a los antibióticos lincosamida. Por otro lado, los genes *mphK*, *tmrB*, *vmrR*, *ykkC*, *ykkD*, *aadK* y *pgsA* con mutación confiriendo resistencia a la daptomicina están presentes con más de un 95% de identidad y ofrecen resistencia a otro tipo de antibióticos descritos detalladamente en la Tabla 3.

La cepa *Bacillus subtilis* DSM32325 contiene los genes *mprF*, *ykkC* y *blt* con un 100% de identidad que ofrecen resistencia a antibióticos peptídicos, antibióticos, tetraciclina, fenicol y fluoroquinolona y tinte de acridina respectivamente. También presenta los genes *mphK*, *tmrB*, *vmrR*, *ykkD*, *addK* y *pgsA* mutación confiriendo resistencia a la daptomicina. Todos ellos con más de un 95% de identidad y ofrecen resistencia a otro tipo de antibióticos descritos en la Tabla 4.

Los mecanismos de acción de los genes de *B. subtilis* DSM32324 y *B. subtilis* DSM32325 se basan principalmente en la inactivación del antibiótico, protección o alteración de la diana del antibiótico, reducción de la permeabilidad del antibiótico y eflujo del antibiótico (Tabla 3 y 4).

Tabla 3. Análisis genes resistencia antibióticos de Bacillus subtilis 32324 con CARD

Criterio identificador	Gen	Clase de antibiótico	Mecanismo de resistencia
Perfecto	<i>ImrB</i>	lincosamida	Eflujo
Estricto	<i>mphK</i>	macrólido	Inactivación
Estricto	<i>tmrB</i>	nucleósido	Reducción de la permeabilidad al antibiótico
Estricto	<i>vmrR</i>	macrólido, lincosamida, estreptogramina, tetraciclina, oxazolidinona, fenicol, pleuromutilina	Protección de la diana
Estricto	<i>ykkC</i>	aminoglucósido, tetraciclina, fenicol	Eflujo
Estricto	<i>ykkD</i>	aminoglucósido, tetraciclina, fenicol	Eflujo
Estricto	<i>aadK</i>	aminoglucósido	Inactivación
Estricto	<i>pgsA</i>	peptídico	Alteración de la diana

Tabla 4. Análisis genes resistencia antibióticos de *Bacillus subtilis* 32325 con CARD

Criterio identificador	Gen	Clase de antibiótico	Mecanismo de resistencia
Perfecto	<i>mprF</i>	peptídico	Alteración de la diana
Perfecto	<i>ykkC</i>	aminoglucósido, tetraciclina, fenicol	Eflujo
Perfecto	<i>blt</i>	fluoroquinolona, tinte de acridina	Eflujo
Estricto	<i>mphK</i>	macrólido	Inactivación
Estricto	<i>tmrB</i>	nucleósido	Reducción de la permeabilidad al antibiótico
Estricto	<i>vmIR</i>	macrólido, lincosamida, estreptogramina, tetraciclina, oxazolidinona, fenicol, pleuromutilina	Protección de la diana
Estricto	<i>ykkD</i>	aminoglucósido, tetraciclina, fenicol	Eflujo
Estricto	<i>aadK</i>	aminoglucósido	Inactivación
Estricto	<i>pgsA</i>	peptídico	Alteración de la diana

3.2.2. Genes relacionados con la producción de vitaminas

Tras la búsqueda de los genes que participan en la síntesis de vitaminas biotina (B7), riboflavina (B2), tiamina (B1) y folato (B9) se observó que las cepas *B. subtilis* DSM32324 y *B. subtilis* DSM32325 presentan en su genoma los genes esenciales en la biosíntesis de las vitaminas. Todos los porcentajes de identidad reflejaron valores entre el 96% y el 100% lo que supone un alto grado de identidad. La excepción del gen *BioB* que interviene en la biosíntesis de la biotina de los cuales no se encontraron datos en Subwiki y por tanto se realizó el blastn mediante la búsqueda en NCBI del gen en la cepa de referencia *Bacillus subtilis* (strain 168)

Tabla 5. Genes involucrados en la síntesis de vitaminas

Nombre	Función	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32324	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32325
<i>bioA</i>	Biosíntesis de biotina	97,85%	99,26%
<i>bioB</i>	Biosíntesis de biotina	98,12%	98,81%
<i>bioD</i>	Biosíntesis de biotina	97,56%	97,27%
<i>bioF</i>	Biosíntesis de biotina	97,61%	98,46%
<i>bioI</i>	Biosíntesis de biotina	98,15%	99,16%
<i>bioW</i>	Biosíntesis de biotina	98,20%	98,46%
<i>birA</i>	Regulación de la síntesis de biotina y adición de la biotina a las proteínas	99,18%	99,49%

<i>ribA</i>	Biosíntesis de riboflavina	99,08%	99,58%
<i>ribC</i>	Biosíntesis de FAD	98,21%	98,32%
<i>ribD</i>	Biosíntesis de riboflavina	99,17%	99,08%
<i>ribE</i>	Biosíntesis de riboflavina	97,38%	99,23%
<i>ribH</i>	Biosíntesis de riboflavina	99,14%	100,00%
<i>ycsE</i>	Desfosforilación del precursor de la biotina, 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione 5'-phosphate	98,93%	99,73%
<i>yitU</i>	Desfosforilación del precursor de la biotina, 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione 5'-phosphate (minor activity)	97,91%	98,89%
<i>ywtE</i>	Desfosforilación del precursor de la biotina, 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione 5'-phosphate (minor activity)	99,42%	99,65%
<i>dfrA</i>	Biosíntesis del folato	98,22%	98,62%
<i>folB</i>	Biosíntesis del folato	96,69%	98,35%
<i>folC</i>	Biosíntesis del folato	98,84%	99,15%
<i>folE</i>	Biosíntesis del folato	99,83%	99,65%
<i>folEB</i>	Biosíntesis del folato	98,36%	98,47%
<i>folK</i>	Biosíntesis del folato	98,81%	99,60%
<i>pabA</i>	Biosíntesis del folato y triptófano	98,97%	98,97%
<i>pabB</i>	Biosíntesis del folato	98,73%	99,01%
<i>pabC</i>	Biosíntesis del folato	98,07%	99,55%
<i>sul</i>	Biosíntesis del folato	98,95%	98,83%
<i>dxs</i>	biosíntesis de tiamina, vía MEP de la biosíntesis de isoprenoides	99,11%	99,47%
<i>tenA</i>	<i>thiamine salvage</i>	96,19%	99,16%
<i>tenI</i>	Biosíntesis de tiamina	97,09%	100,00%
<i>thiC</i>	Biosíntesis de tiamina	98,53%	99,38%
<i>thiD</i>	Biosíntesis de tiamina pirofosfato (TPP)	98,40%	99,26%
<i>thiE</i>	Biosíntesis de tiamina por 4-methyl-5-(beta-hydroxyethyl) thiazole phosphate para producir fosfato de tiamina	97,46%	97,31%
<i>thiF</i>	Biosíntesis de tiamina	98,02%	99,11%
<i>thiG</i>	Biosíntesis de tiamina	97,92%	98,05%
<i>thiL</i>	Biosíntesis de tiamina	97,85%	96,93%
<i>thiM</i>	Biosíntesis de tiamina	98,66%	99,15%

<i>thiO</i>	Biosíntesis de tiamina	98,56%	99,10%
<i>thiS</i>	Biosíntesis de tiamina	99,50%	98,51%

4.2.3. Genes codificantes de enzimas endógenas bacterianas

Los resultados del Blastn de los genes que codifican estas enzimas encontrados en Subtiwiki con las cepas *B. subtilis* DSM32324 y *B. subtilis* DSM32325 concluyeron que los genes involucrados en el metabolismo de la xilosa son *araE*, *xylA*, *xylB*, *xylR*, *xynA*, *xynB*, *xynP*. Están presentes en ambas cepas con un porcentaje de identidad en todos los casos superior al 97%. Del mismo modo, los genes que participan en la degradación de los β -glucanos son *bglA*, *bglH*, *bglP*, *licT* y *yckE* y también están presentes en las cepas estudiadas con un porcentaje de identidad superior al 97%.

Tabla 6. Genes involucrados en la síntesis de vitaminas

Nombre	Función	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32324	<i>Bacillus subtilis</i> DSM32325
<i>araE</i>	Consumo de arabinosa, galactosa y xilosa	98,85%	99,21%
<i>xylA</i>	Utilización del xilano y la xilosa	99,18%	99,10%
<i>xylB</i>	Utilización del xilano y la xilosa	98,80%	99,00%
<i>xylR</i>	Regulación del uso del xilano y la xilosa	98,29%	98,01%
<i>xynA</i>	Degradación del xilano	98,91%	99,69%
<i>xynB</i>	Degradación del xilano	97,50%	98,88%
<i>xynP</i>	Utilización del xilano	98,71%	99,14%
<i>bglA</i>	Utilización beta-glucósido	98,12%	98,12%
<i>bglH</i>	Utilización salicina	98,37%	98,51%
<i>bglP</i>	Consumo y fosforilación de beta-glucósido y control de la actividad LicT	97,54%	98,52%
<i>licT</i>	Control del uso del beta-glucano y beta-glucósido	98,80%	99,40%
<i>yckE</i>	Utilización de aryl--glucósidos	98,81%	99,51%

4.2.4. Genes codificantes de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas)

Se analizaron los genomas de *B. subtilis* DSM32324 y *B. subtilis* DSM32325 con la plataforma antiMASH para identificar los genes de *clusters* que codifican para metabolitos secundarios. Así pues, los resultados indicaron que estas bacterias codifican metabolitos de amplio espectro de actividad como la surfactina, otros con actividad antifúngica como fengicina subtilosina A y por último los que tienen actividad

antimicrobiana como bacilisina, *bacillaene*. El % de identidad para todos ellos es del 100% a excepción de la surfactina que en *B. subtilis* DSM32324 es 82% y en *B. subtilis* DSM323252 78%.

A su vez también se identificaron genes individuales codificantes de bacteriocinas las cuales se analizaron mediante Blastn, obteniendo así los genes *cypA* y *sboX* presentes en ambas cepas con un elevado porcentaje de identidad y con función antimicrobiana (Tabla 7).

Tabla 7. Genes involucrados en la síntesis de bacteriocinas

Bacteriocinas utilizando antiMASH Cluster de genes				
Tipo	Cluster similar	Función	Identidad <i>B. subtilis</i> DSM32324	Identidad <i>B. subtilis</i> DSM32325
NRPS	surfactina	espectro amplio	82,00%	78,00%
transAT- PKS,T3PKS,NRPS	<i>bacillaene</i>	Antimicrobiano	1	1
NRPS,betalactona	fengicina	Antifúngico	1	1
NRPS	bacilibactina	Antimicrobiano	1	1
sactipéptido	subtilosina A	Antifúngico	1	1
Otro	bacilisina	Antimicrobiano	1	1

Bacteriocinas utilizando Blastn				
Gen	Nombre completo	Función	Identidad <i>B. subtilis</i> DSM32324	Identidad <i>B. subtilis</i> DSM32325
<i>cypA</i>	Colicin V	Antimicrobiano	98,69%	98.88%
<i>sboX</i>	producto putativo similar a la bacteriocina	Antimicrobiano	100%	98,69

4.2.5. Otros genes relevantes

La caracterización de las bacterias como probióticos viene dada por los genes que codifican. La búsqueda de estos genes se basó en la identificación de genes que se haya demostrado que tienen función probiótica en otras bacterias. Algunas de las funciones que se consideran importantes para que un probiótico sea apto es que codifique genes que ofrezca resistencia a los ácidos gástricos y a las sales biliares y sintetice proteínas que favorezcan la adhesión al epitelio.

4.2.5.1. Resistencia al ácido gástrico

Los genes *lctE* (*lactate dehydrogenase*) y *pgi* (*Glucose-6-phosphate isomerase*) participan en la resistencia al ambiente ácido del tracto gástrico. El gen *lctE* interviene en la producción de ATP ya que reestablece el balance de NAD⁺/NADH y promueve la extrusión de protones favoreciendo la tolerancia al ambiente ácido. Por otro lado, el gen *pgi* genera resistencia a los ácidos participando en otros mecanismos. Los resultados revelaron que las bacterias *B. subtilis* DSM32324 y *B. subtilis* DSM32325 codifican el gen *lctE* y *pgi*. Ambos presentan un alto grado de identidad del gen (Tabla 8).

4.2.5.2. Adhesión al epitelio

Algunas de las proteínas que permiten la adhesión son la enolasa y la *fibronectin binding protein*. La enolasa está codificada por el gen *eno* y los resultados indican que las cepas *B. subtilis* DSM32324 y *B. subtilis* DSM32325 codifican este gen con más del 98.5% de identidad. Por otra parte, la *fibronectin binding protein* viene codificada por el gen *fbpA*. Ambas cepas de *Bacillus subtilis* codifican este gen con un porcentaje de identidad superior al 98% (Tabla 8).

Tabla 8. Genes involucrados en la resistencia al ambiente ácido del tracto gastrointestinal y en la adhesión al epitelio

Resistencia al ácido gástrico y adaptación al medio nutricional				
Genes	Nombre	Función	Identidad <i>B. subtilis</i> DSM32324	Identidad <i>B. subtilis</i> DSM32325
<i>lctE</i>	Lactato deshidrogenasa	Producción de ATP	98,55%	99,07%
<i>pgi</i>	Glucosa-6-fosfato isomerasa	Tolerancia a los ácidos	99,41%	99,41%
<i>treP</i>	Sistema de transportadores de fosfotransferasas (PTS)	--	99,36%	99,93%
Proteínas involucradas en adhesión y agregación al epitelio				
Genes	Nombre	Función	Identidad <i>B. subtilis</i> DSM32324	Identidad <i>B. subtilis</i> DSM32325
<i>eno</i>	Enolasa	Adhesión	99,54%	99,92%
<i>fbpA</i>	Proteína de unión a fibronectina	Adhesión	99,07%	98,66%

4.3. Búsqueda masiva de genes minoritarios relevantes en función probiótica

La búsqueda masiva de genes presentes en al menos una de las cepas de estudio y en unas pocas cepas de la base de datos permitió la detección de 14 genes y los CDS de

los que forman parte. Se han podido discernir sus funciones mediante la búsqueda bibliográfica, aunque la mayoría de ellos siguen teniendo funciones sin identificar.

Tabla 9. CDS y presencia y función de genes en *Geneious*

CDS Geneious	Presencia	Función
CDS de proteínas de la familia YfbU	3/116	Muerte celular
CDS de lipoproteína de pliegue similar a la cistatina	3/116	Transporte de proteínas al núcleo
CDS de proteína de repetición tetratricopeptídica	3/116	Desconocida
CDS de enzima aminotransferasa clase I / II dependiente de fosfato de piridoxal	3/116	Metabolismo de la biotina
CDS de proteína que contiene el dominio DUF1259	3/116	Desconocida
CDS de proteína de la familia de aspartato / glutamato racemasa	3/116	Desconocida
CDS de proteínas de la familia YdcP	3/116	Desconocida
proteína de biosíntesis de ácido teicoico CDS	3/116	Antigénica y adhesión al epitelio
CDS de proteína de unión a (2Fe-2S)	2/116	Oxidoreductasa
CDS de proteínas de la familia FUSC	2/116	Desconocida
CDS de restricción endonucleasa	2/116	Desconocida
subunidad de unión a molibdopterina, proteína de la familia de la xantina deshidrogenasa CDS	2/116	Desconocida
CDS de oxidorreductasa dependiente de NAD (P) de la familia SDR	2/116	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
CDS de péptido de señalización de exportación de la familia <i>yydf</i>	44/116	Antimicrobiana y de señalización

Se han encontrado estudios en los que se utilizan las cepas testadas o similares, como *B. subtilis* DSM29788, en los cuales se observan efectos probióticos e intentan relacionar los efectos probióticos con los genes que codifican. En la mayoría de los estudios se analiza un producto probiótico en el que se combinan cepas de *B. subtilis* y *B. amiloquefaciens* (Tabla 10).

Tabla 10. Efectos cepas probióticas

Cepa	Efecto
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 32324 + <i>Bacillus amiloquefaciens</i>	Mejora la ratio de conversión del alimento (FCR)
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 32324 + <i>Bacillus amiloquefaciens</i>	Reducción tratamientos veterinario por ileitis
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 32324 + <i>Bacillus amiloquefaciens</i>	Aumento población <i>Ruminococcus</i>

Bacillus subtilis DSM 32324 + Bacillus amiloquefaciens	Aumento población <i>Ruminococcus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Enterococcus</i> y <i>Coprobacillus</i>
Bacillus DSM29788	Aumento población <i>Firmicutes</i> y <i>Bacteroidetes</i> en la fase inicial del crecimiento
Bacillus DSM29788	Aumento población <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> en etapas intermedia y final del crecimiento
Bacillus subtilis DSM32324, DSM32325 + Bacillus amiloquefaciens	Reducción Salmonella en las heces

5. DISCUSIÓN

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación de segunda generación ha permitido reducir el tiempo y coste de la secuenciación de genomas bacterianos completos. Los últimos avances han permitido desarrollar técnicas en las que se combinan los fragmentos cortos y largos obtenidos mediante diferentes plataformas para incrementar de forma notable la calidad de las secuencias obtenidas. Una de estas técnicas de combinación es *Unicycler*, la cual permite corregir las limitaciones de cada una de las técnicas por separado. Por un lado, las lecturas de secuencias largas disminuyen la dificultad de ensamblar el genoma completo y por otro lado, las lecturas cortas corrigen errores precisos (40). Estudios realizados comparando los resultados de secuenciación simple y resultados de secuenciación combinando ambas técnicas en *Bacillus subtilis* identificaron 330 genes más con la técnica combinada (53).

La caracterización de las cepas realizada para obtener toda la información de la secuencia genética de las bacterias reveló que no destacan por su elevado contenido en GC con respecto al resto de *Bacillus subtilis*. A nivel general las cepas de *Bacillus subtilis* tienen unos valores que oscilan entre el 43.0% y 44.0% (54). Un elevado %GC puede implicar que haya un elevado contenido de islas CpG. Se ha demostrado que el elevado contenido de islas CpG aumenta la capacidad inmunoestimuladora debido a la unión de éstas con el receptor tipo Toll (TLR)-9 del epitelio y que reconoce el ADN bacteriano (8).

El estudio evolutivo de *Bacillus subtilis* indicó que las cepas *B. subtilis* DSM32324 y DSM32325 se encuentran alejadas evolutivamente, sin embargo, las características genéticas de ambas no son tan dispares. Así pues, el alineamiento de Mauve reveló que la similitud entre las cepas testadas se puede agrupar en 3 bloques, incluyendo una región que tiene el orden de la secuencia invertida. El hecho de que ambas cepas estén alejadas evolutivamente favorece que se administren de manera conjunta en un producto ya que cada una de ellas desempeñará funciones diferentes.

El análisis dirigido sirvió para identificar numerosos genes involucrados en la actividad probiótica. Los resultados demostraron que las cepas *B. subtilis* DSM32324 y *B. subtilis* DSM32325 presentan genes de resistencia a los antibióticos establecidos por la EFSA. A pesar de que las cepas presenten estos genes, la EFSA dictamina que estos genes pueden estar presentes siempre y cuando los niveles de expresión de estos genes estén dentro de los valores establecidos (30). Por este motivo sería necesario un experimento *in vitro* para estudiar los niveles de expresión de estos cuatro genes (Estreptomicina, Tilosina, Colistina y Fosfomicina). En caso de que la capacidad de resistencia a estos antibióticos esté por debajo de los valores marcados por la EFSA, estas cepas podrían comercializarse en la Unión Europea como aditivos en pienso.

Por otro lado, también se buscaron genes que ofrecieran resistencia a otros antibióticos. En este caso se hizo mediante la búsqueda de *clusters* de genes que participan en la síntesis de proteínas que ofrezcan resistencia. En la actualidad no se evalúa este tipo de resistencias ya que no están reguladas por la EFSA. La herramienta desarrollada en este trabajo permite hacer un análisis de la presencia de estos genes y evitar que las cepas utilizadas comercialmente como aditivos de la dieta no presenten actividad de resistencia a antibióticos.

La búsqueda bibliográfica de genes relevantes realizada previamente reveló que las bacterias con capacidad de síntesis de vitaminas favorecen su uso como probiótico (38). Una de las vitaminas que se identificó fue el folato o vitamina B9. Se identificaron los genes involucrados en su síntesis ya que se ha demostrado que participa en la digestión de nutrientes y en la recuperación energética (55). Estudios realizados en humanos concluyeron que el folato participa en la replicación, reparación y metilación del ADN. Además se ha demostrado que los probióticos con capacidad de biosíntesis de esta vitamina podrían proteger contra la inflamación, cáncer, estrés y depresión (56).

La biotina también participa de forma esencial en el metabolismo celular puesto que su déficit puede generar alteraciones importantes. Se ha demostrado que un déficit de esta vitamina puede derivar en trastornos inflamatorios del intestino y enfermedades cutáneas en humanos (57).

Al igual que las vitaminas mencionadas anteriormente, la riboflavina o vitamina B2 ha demostrado estar involucrada en los mecanismos de regulación y absorción importantes para los humanos. Un déficit de esta vitamina podría derivar en problemas en la absorción del hierro, metabolismo del triptófano y desordenes en el tracto gastrointestinal del huésped (58).

Por último, la tiamina es una de las principales vitaminas que intervienen en rutas metabólicas importantes, tanto en el sistema digestivo como en el cardiovascular y

nervioso. Esta vitamina se obtiene principalmente de los alimentos, aunque una parte puede ser sintetizada por los microorganismos del intestino. Cabe resaltar que esta vitamina no se acumula y, por lo tanto, su déficit puede desencadenar en enfermedades mentales (59).

A pesar de que la mayoría de los estudios que desvelan la importancia de las vitaminas se han realizado en humanos, se asume que sus efectos son similares en animales. La importancia de todas estas vitaminas en el organismo hace que se tome la iniciativa de suplementar la dieta con microorganismos capaces de sintetizarlas para suplir los posibles déficits que pueda tener el organismo huésped. Estos compuestos favorecen la disponibilidad de los nutrientes ingeridos además de potenciar la salud de la microbiota intestinal. Además, las vitaminas sintetizadas por las bacterias probióticas pueden servir como suplemento nutritivo (38).

La fibra se somete al proceso de fermentación bacteriana en la parte distal del intestino ya que es indigerible por enzimas endógenas del pollo y de cerdos de pocas semanas de edad. El hecho de que su digestión sea compleja reduce los niveles de productividad de la industria. Las bacterias utilizadas como probióticos pueden tener capacidad de sintetizar enzimas que participan en la fermentación de la fibra. Este proceso maximiza la disponibilidad y absorción de nutrientes mejorando el rendimiento y, además, se generan metabolitos con efectos beneficiosos sobre la mucosa, la microbiota intestinal y el sistema inmune. Entre los productos de la fermentación destacan los SCFA que actúan como fuente de energía para el huésped además de estar involucrados en otras vías metabólicas como la gluconeogénesis (60).

Por este motivo, los análisis realizados en busca de las enzimas que participan en la síntesis de las enzimas necesarias (xilosas y β -glucanasas) son clave para determinar que las cepas testadas *B. subtilis* DSM32324 y *B. subtilis* DSM32325 tienen actividad probiótica al participar en la fermentación de la fibra cuando se añaden a la dieta de aves.

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas no esenciales para el desarrollo y crecimiento del organismo que pueden contribuir a la salud intestinal del huésped. Las bacterias destacan por su capacidad de producir metabolitos secundarios, más concretamente, péptidos antimicrobianos con actividad antibacteriana y antifúngica. Esta característica ha sido muy estudiada en la industria para favorecer su uso como probióticos ya que podría evitar parcialmente la colonización de patógenos en el intestino (36,61). La detección de *clusters* de genes que codifican bacteriocinas en *B. subtilis* DSM32324 y *B. subtilis* DSM32325 como la surfactina, bacilibactina, bacilisina, plipastitina/ fengicina, subtilosina demuestra que el uso de estas cepas como probióticos

reduciría la presencia y capacidad de colonización de bacterias y hongos patógenos en el intestino.

Otro factor clave de una cepa probiótica es su capacidad de resistencia al ambiente ácido del tracto gastrointestinal y la capacidad de adhesión al epitelio intestinal. Estas dos características permitirán que los probióticos incorporados en la dieta sobrevivan y permanezcan en el intestino pudiendo desempeñar las funciones mencionadas en los apartados anteriores. Entre estos genes destacan el gen *lctE*, *pgi* y *treP* con capacidad de resistir al ambiente ácido predominante en el estómago e intestino proximal permitiendo su supervivencia. Por otro lado, el gen *eno* y *fpbA* facilitan la adhesión al epitelio intestinal favoreciendo su prevalencia en el intestino al mismo tiempo que compiten con patógenos por los lugares de unión evitando su adhesión (38).

Por otro lado, el análisis masivo permitió la detección de genes presentes solo en algunas de las cepas *B. subtilis*. A pesar de que la información disponible a nivel general es escasa este estudio permite generar varias hipótesis de funcionalidad genética relacionada con probiósis.

El CDS de proteínas de la familia *YfbU* codifica para una familia de proteínas que en especies como *E. coli* participa en la muerte celular bacteriana cuando se producen daños en el metabolismo interno. En concreto, una de las toxinas que inducen a la apoptosis en *E. coli* es la *MazF*. Se ha demostrado que cuando esta toxina se traduce se produce un aumento de las proteínas *YfbU* que inhiben la traducción y generan daños en el ADN (64).

El CDS de lipoproteína de pliegue similar a la cistatina forma parte de una gran familia de lipoproteínas propias de las bacterias gram-positivas. Estas lipoproteínas tienen un pliegue similar a la cistatina. La función que desempeñan estas proteínas aún no ha sido identificada, pero se considera que pertenecen a la superfamilia NFT2, que forma parte de la envoltura nuclear y facilita el transporte de proteínas al núcleo.

El CDS de enzima aminotransferasa clase I / II codifica para una enzima que utiliza el piridoxal fosfato (PLP) como cofactor. Muchas de las reacciones en las que intervienen enzimas dependientes del PLP están involucradas en la síntesis de aminoácidos. La búsqueda de esta enzima en KEEG reveló que en *E. coli* participa en el metabolismo de la biotina. Como se ha comentado anteriormente, las cepas de *B. subtilis* estudiadas a lo largo del proyecto codifican genes necesarios en la biosíntesis de la biotina la cual ha demostrado que un déficit de ésta puede derivar en trastornos inflamatorios del intestino.

El CDS de proteína de unión a (2Fe-2S) codifica para el gen *yhfW*, el producto de este gen codifica para una proteína con la función molecular oxidorreductasa. Algunos estudios han evaluado la función de este gen mediante la creación de mutantes que

carecían de este gen. Los resultados revelaron que la eliminación de este gen disminuye los metabolitos y aminoácidos que participan en el ciclo de Krebs (ciclo que forma parte de la respiración celular) (65).

El CDS de oxidorreductasa dependiente de NAD (P) de la familia SDR codifica para una enzima que forma parte de la familia deshidrogenasa/reductasas de cadena corta. Este CDS, según los datos de PanX, se encuentra en la cepa *B. subtilis* CW14. Esta cepa se ha demostrado que tienen efectos probióticos en plantas dada la capacidad de síntesis de antifúngicos, actividad que podría ser conferida por la presencia de este gen (65, 66).

El CDS de proteína de biosíntesis de ácido teicoico participa en la síntesis de los ácidos teicoicos. Estos ácidos son esenciales para las bacterias gram-positivas ya que forman parte del peptidoglucano. Entre las funciones que desempeñan estos ácidos destaca la actividad antigénica y la capacidad de adhesión y colonización (68). Estos dos factores favorecen la actividad probiótica de las cepas *B. subtilis* por su capacidad de estimular el sistema inmune del huésped además de favorecer su adhesión al epitelio intestinal.

El CDS de péptido de señalización de exportación de la familia *yydF* codifica el gen *yydF*. Se ha estudiado que el producto de este gen es una proteína con actividad antimicrobiana o de señalización. Este péptido se exporta mediante el transportador *YydIJ*. En caso de que el transportador esté ausente se activa el sistema LiaRS que genera estrés en la envoltura celular causando daño tisular.

A parte de la búsqueda masiva en la que se buscaban genes “únicos” presentes en un pequeño porcentaje de cepas de *B. subtilis* también se ha realizado la búsqueda de los mecanismos en los que estas cepas participan mejorando las interacciones con el huésped. En la mayoría de los estudios se han testado productos probióticos basados en la mezcla de varias bacterias diferentes, por lo tanto, es difícil identificar cuáles son los efectos específicos de cada cepa probiótica. A nivel global los efectos positivos de estos probióticos son la mejora del ratio de conversión del alimento (27), reducción de los tratamientos veterinarios por ileitis (27), reducción de la concentración de *Salmonella* spp. en las heces (29) y aumento de las poblaciones bacterianas beneficiosas en el intestino (13). Todos estos efectos favorecen el rendimiento, salud y bienestar del animal. Por otro lado, el enfoque de estos estudios basados en el rendimiento del animal deja un *gap* en el que no se analiza el motivo genético de estos efectos. Sería de gran interés en un futuro determinar qué genes son los que aportan estas capacidades probióticas y evitar estudios *in vivo* reduciendo el coste que estos conllevan y el uso de animales de experimentación.

6. CONCLUSIÓN

El presente trabajo ha permitido desarrollar una herramienta de caracterización probiótica completa de cepas *Bacillus* mediante el análisis de la secuencia de su genoma. Esta herramienta permite la caracterización genética de cepas probióticas identificando genes relevantes que ofrecen capacidad probiótica. El desarrollo de una guía que permita facilitar la identificación de genes *in silico* reducirá el coste de los estudios *in vitro* e *in vivo* y facilitará la detección de cepas potencialmente probióticas. La creación de esta guía se realiza basándose en dos enfoques, uno dirigido en el que se estudia la presencia de genes con funciones probióticas conocidas como la adhesión al epitelio, resistencia al ambiente ácido, síntesis de bacteriocinas, biosíntesis de vitaminas, síntesis de enzimas endógenas y resistencia antimicrobiana; y otro enfoque masivo en el que se identifican genes minoritarios presentes en cepas bacterianas con capacidad probiótica, lo que permite esclarecer su modo de acción.

Tras el desarrollo de este trabajo, se ha detectado la necesidad de realizar futuros estudios que complementen esta herramienta de caracterización probiótica. Para comprender el efecto específico de los genes detectados son necesarios estudios de metatranscriptómica para identificar sus niveles de expresión. Además, serán necesarios estudios *in vivo* para confirmar los efectos de los genes codificados y expresados por estas bacterias candidatas a ser usadas como probiótico. La complementación de la herramienta generada en este trabajo (secuenciación y caracterización metagenómica) con el análisis del metatranscriptoma y su corroboración en experimentos *in vivo* permitirá obtener una herramienta muy potente para seleccionar cepas bacterianas con alta capacidad probiótica y entender las interacciones entre probiótico-microbiota-huésped.

7. AUTOEVALUACIÓN

La realización de este Trabajo de Final de Grado ha estado asociada a las prácticas realizadas en el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) Mas Bové. Durante este tiempo, me he familiarizado con numerosos campos de la vida de un investigador y, a pesar de las circunstancias que se han dado, he puesto en práctica valores y conceptos aprendidos en las asignaturas de la carrera, entre los que destacan el criterio de selección, procesamiento de datos y familiarización con numerosas bases de datos y programas informáticos.

A nivel global, ha sido una experiencia muy enriquecedora en la que a pesar de las dificultades considero que he puesto empeño y esfuerzo para obtener un trabajo del que me siento satisfecha.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(18):5649–54.
2. EU. EU Agricultural Outlook 2017-2030. 2017. 100 p.
3. CVM, Fda, DS. 2017 Summary Report On Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. 2017.
4. Regulation O. No 1831/2003 of the European Parliament and Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off J Eur Commun*. 2003;268:29–43.
5. Dahiya JP, Wilkie DC, Van Kessel AG, Drew MD. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim Feed Sci Tech*. 2006;129(1–2):60–88.
6. Cantas L, Suer K. Review: The important bacterial zoonoses in “One Health” concept. *Front Public Heal*. 2014;2:144.
7. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Front Vet Sci*. 2017;4:126.
8. Tarradas J, Tous N, Esteve-Garcia E, Brufau AJ. The Control of Intestinal Inflammation: A Major Objective in the Research of Probiotic Strains as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Poultry. *Microorganisms*. 2020;8(2):148.
9. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol* [Internet]. 2013;6(1):39–51. Available from: internal-pdf://144.101.231.23/10.1177_1756283X12459294.pdf
10. Home - HoloFood [Internet]. [cited 2020 May 15]. Available from: <https://www.holofood.eu/>
11. Limborg MT, Alberdi A, Kodama M, Roggenbuck M, Kristiansen K, Gilbert MTP. Applied Hologenomics: Feasibility and Potential in Aquaculture. *Trends Biotechnol*. 2018;36(3):252–64.
12. Celi P, Verlhac V, Pérez Calvo E, Schmeisser J, Klünter AM. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. *Anim Feed Sci Technol*. 2019;250:9–31.
13. Khan S, Chousalkar KK. Short-term feeding of probiotics and synbiotics modulates caecal microbiota during *Salmonella Typhimurium* infection but does

- not reduce shedding and invasion in chickens. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(1):319–34.
14. Li Y, Zhang H, Chen YP, Yang MX, Zhang LL, Lu ZX, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation alleviates immunological stress and intestinal damage in lipopolysaccharide-challenged broilers. *Anim Feed Sci Technol*. 2015;208:119–31.
 15. Meehan CJ, Beiko RG. A Phylogenomic View of Ecological Specialization in the Lachnospiraceae, a Family of Digestive Tract-Associated Bacteria. *Genome Biol Evol*. 2014;6(3):703-713.
 16. Fekry MI, Engels C, Zhang J, Schwab C, Lacroix C, Sturla SJ, et al. The strict anaerobic gut microbe *Eubacterium hallii* transforms the carcinogenic dietary heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Environ Microbiol Rep*. 2016;8(2):201–9.
 17. Gophna U, Konikoff T, Nielsen HB. *Oscillospira* and related bacteria – From metagenomic species to metabolic features. *Environ Microbiol*. 2017;19(3):835–41.
 18. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989;66(5):365–78.
 19. Cox CM, Dalloul RA. Immunomodulatory role of probiotics in poultry and potential in ovo application. *Benef Microbes*. 2015;6(1):45–52.
 20. Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Front Microbiol*. 2017;8:1–15.
 21. Guinane CM, Crispie F, Cotter PD. Value of Microbial Genome Sequencing for Probiotic Strain Identification and Characterization: Promises and Pitfalls [Internet]. *The Gut-Brain Axis Dietary, Probiotic, and Prebiotic Interventions on the Microbiota*. Elsevier Inc.; 2016. 45–60.
 22. Ventura M, Turrone F, van Sinderen D. Probiogenomics as a tool to obtain genetic insights into adaptation of probiotic bacteria to the human gut. *Bioeng Bugs*. 2012;3(2):73–9.
 23. Khalighi A, Behdani R, Kouhestani S. Probiotics: A Comprehensive Review of Their Classification, Mode of Action and Role in Human Nutrition. In: *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health* [Internet]. Available from: <https://www.intechopen.com/books/probiotics-and-prebiotics-in-human-nutrition-and-health/probiotics-a-comprehensive-review-of-their-classification-mode-of-action-and-role-in-human-nutrition>

24. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222–7.
25. Jones ML, Tomaro-Duchesneau C, Martoni CJ, Prakash S. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(5):631–42.
26. Khochamit N, Siripornadulsil S, Sukon P, Siripornadulsil W. Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain. *Microbiol Res*. 2015;170:36–50.
27. van der Peet-Schwering CMC, Verheijen R, Jørgensen L, Raff L. Effects of a mixture of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* on the performance of growing-finishing pigs. *Anim Feed Sci Technol*. 2020;261:114409.
28. Tiwari G, Tiwari R, Pandey S, Pandey P. Promising future of probiotics for human health: Current scenario. *Chronicles Young Sci*. 2012;3(1):17.
29. Neijat M, Habtewold J, Shirley RB, Welsher A, Barton J, Thiery P, et al. *Bacillus subtilis* Strain DSM 29784 Modulates the Cecal Microbiome, Concentration of Short-Chain Fatty Acids, and Apparent Retention of Dietary Components in Shaver White Chickens during Grower, Developer, and Laying Phases. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85(14).
30. Rychen G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, Bastos M de L, Bories G, et al. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J*. 2018;16(3):1–24.
31. Rychen G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, Bastos M de L, Bories G, et al. Guidance on the identity, characterisation and conditions of use of feed additives. *EFSA J*. 2017;15(10).
32. Saulnier DM, Santos F, Roos S, Mistretta TA, Spinler JK, Molenaar D, et al. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PLoS One*. 2011;6(4).
33. Jha R, Berrococo JD. Review: Dietary fiber utilization and its effects on physiological functions and gut health of swine. *Animal* [Internet]. 2015/05/22. 2015;9(9):1441–52. Available from: <https://www.cambridge.org/core/article/review-dietary-fiber-utilization-and-its-effects-on-physiological-functions-and-gut-health-of->

swine/31B43A28B8224E779E4116233416C8AF

34. Jha R, Fohse JM, Tiwari UP, Li L, Willing BP. Dietary fiber and intestinal health of monogastric animals. *Front Vet Sci*. 2019;6(48):1–12.
35. Bach Knudsen KE, Hedemann MS, Lærke HN. The role of carbohydrates in intestinal health of pigs. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2012;173(1–2):41–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.020>
36. Kaspar F, Neubauer P, Gimpel M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *J Nat Prod*. 2019;82(7):2038–53.
37. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 SUPPL.):386–92.
38. Kapse NG, Engineer AS, Gowdaman V, Wagh S, Dhakephalkar PK. Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of *Bacillus coagulans* HS243. *Genomics* [Internet]. 2019;111(4):921–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.05.022>
39. Carøe C, Gopalakrishnan S, Vinner L, Mak SST, Sinding MHS, Samaniego JA, et al. Single-tube library preparation for degraded DNA. *Methods Ecol Evol*. 2018;9(2):410–9.
40. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* [Internet]. 2017;13(6):1–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
41. Tatusova T, Dicuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(14):6614–24.
42. Haft DH, DiCuccio M, Badretdin A, Brover V, Chetvernin V, O'Neill K, et al. RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018;46(D1):D851–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29112715>
43. GenBank Overview [Internet]. [cited 2020 May 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
44. Home - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2020 May 7]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sabidi.urv.cat/pubmed>
45. Zhu B, Stülke J. SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jan 4;46(D1):D743–8. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29788229>
46. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. [cited 2020 May 12]. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
 47. panX [Internet]. [cited 2020 May 7]. Available from: <http://pangenome.tuebingen.mpg.de/home>
 48. Mira A, Martin-Cuadrado AB, D'Auria G, Rodriguez-Valera F. The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *Int Microbiol*. 2010 Jun;13(2):45–57.
 49. GitHub - neherlab/pan-genome-analysis: Processing pipeline for pan-genome visualization and exploration [Internet]. [cited 2020 May 26]. Available from: <https://github.com/neherlab/pan-genome-analysis>
 50. GitHub - neherlab/pan-genome-visualization: Visualization of the pan-genome output by panX [Internet]. [cited 2020 May 26]. Available from: <https://github.com/neherlab/pan-genome-visualization>
 51. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database [Internet]. [cited 2020 May 10]. Available from: <https://card.mcmaster.ca/>
 52. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Apr 29;47(W1):W81–7. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
 53. Kamada M, Hase S, Sato K, Toyoda A, Fujiyama A, Sakakibara Y. Whole Genome Complete Resequencing of *Bacillus subtilis* Natto by Combining Long Reads with High-Quality Short Reads. Schacherer J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(10):e109999. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0109999>
 54. NCBI. Genome List - Genome - NCBI [Internet]. 2019 [cited 2020 May 11]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/Bacillus subtilis](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/Bacillus%20subtilis)
 55. Khatri I, Sharma G, Subramanian S. Composite genome sequence of *Bacillus clausii*, a probiotic commercially available as Enterogermina®, and insights into its probiotic properties. *BMC Microbiol*. 2019;19(1):1–15.
 56. Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients* [Internet]. 2011;3(1):118–34. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6643/3/1/118>
 57. Piraccini BM, Berardesca E, Fabbrocini G, Micali G, Tosti A. Biotin: Overview of the treatment of diseases of cutaneous appendages and of hyperseborrhea. *G Ital*

- di Dermatologia e Venereol. 2019;154(5):557–66.
58. Thakur K, Tomar SK, Singh AK, Mandal S, Arora S. Riboflavin and health: A review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 Nov 22;57(17):3650–60.
 59. Bubko I, Gruber BM, Anuszezwska EL. [The role of thiamine in neurodegenerative diseases]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015 Sep;69:1096–106.
 60. Holscher HD. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*. 2017 Mar 4;8(2):172–84.
 61. Harwood CR, Mouillon J-M, Pohl S, Jos´ J, Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2018 [cited 2020 May 10];028:721–38. Available from: <http://orcid.org/0000-0002-3624-0001>
 62. The European Bioinformatics Institute < EMBL-EBI [Internet]. [cited 2020 May 19]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/>
 63. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [Internet]. [cited 2020 May 19]. Available from: <https://www.kegg.jp/>
 64. Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hananya-Meltabashi M, Sacher A, Kulka HE. *Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both “death proteins” and “survival proteins.” *PLoS Genet*. 2009 Mar;5(3).
 65. Boonstra M, Schaffer M, Sousa J, Morawska L, Holsappel S, Hildebrandt P, et al. Analyses of competent and non-competent subpopulations of *Bacillus subtilis* reveal yhfW, yhxC and ncRNAs as novel players in competence. *Environ Microbiol*. 2020;00.
 66. Shi L, Liang Z, Li J, Hao J, Xu Y, Huang K, et al. Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2014;94(9):1879–85.
 67. Peng, Mengxue Liu J LZ. Probiotic *Bacillus subtilis* CW14 reduces disruption of the epithelial barrier and toxicity of ochratoxin A to Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2019;126:25–33.
 68. Brown S, Santa Maria JP, Walker S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2013 Sep 8;67(1):313–36.

9. ANEXOS

Anexo 1. Guía a seguir en la aplicación de la herramienta

1. Aislamiento de la bacteria
 2. Secuenciación, ensamblaje y anotación del genoma
 3. Análisis *in silico* del genoma
 - 3.1. Caracterización genética del genoma
 - 3.2. Detección de genes que ofrezcan resistencia a antibióticos
 - 3.3. Detección de genes que intervengan en la biosíntesis de compuestos beneficiosos como vitaminas
 - 3.4. Detección de genes que sinteticen enzimas bacterianas endógenas que participan en el metabolismo del carbono
 - 3.5. Detección de genes con actividad antimicrobiana (bacteriocinas)
 - 3.6. Detección de genes que permitan la resistencia al ambiente del tracto gastrointestinal y adhesión al epitelio intestinal
 4. Evaluación de la información obtenida para confirmar el uso de la cepa como probiótico
 5. Posteriores estudios que analicen el metatranscriptoma para evaluar el nivel de expresión de los genes identificados
-