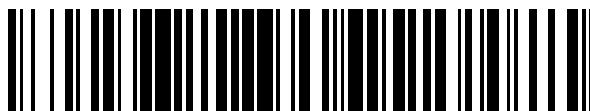


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 590**

51 Int. Cl.:

C12N 1/08 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C07K 14/335 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2007 E 07748543 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2040723**

54 Título: **Bacteria del ácido láctico con tolerancia al ácido aumentada**

30 Prioridad:

05.06.2006 US 446648

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.03.2013

73 Titular/es:

**BIOGAIA AB (100.0%)
Kungsbrogatan 3A
112 27 Stockholm , SE**

72 Inventor/es:

CONNOLLY, EAMONN

74 Agente/Representante:

ES 2 398 590 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Bacteria del ácido láctico con tolerancia al ácido aumentada.

5 Antecedentes de la invenciónCampo técnico

10 En 1908, el biólogo ruso Eli Metchnikoff atribuyó las largas vidas de ciertos ciudadanos búlgaros y rusos al consumo de grandes cantidades de productos de leche fermentada. El organismo clave en estos alimentos se identificó más tarde como *Lactobacillus acidophilus*, una bacteria productora de ácido láctico. Las bacterias productoras de ácido láctico se denominan así por su capacidad para producir lactato. Sin embargo, la producción de lactato es sólo uno de los muchos beneficios derivados de esta clase de bacterias.

15 Basándose en el trabajo de Metchnikoff y otros, los científicos desarrollaron la idea de microorganismos probióticos, alimentando directamente levaduras y bacterias productoras de ácido láctico vivas a animales para mejorar su salud y rendimiento. Los beneficios observados pueden resultar de: 1) competición por sitios de unión en el tubo digestivo, 2) competición por nutrientes esenciales, 3) producción de sustancias antimicrobianas, 4) aumento del crecimiento de bacterias beneficiosas y 5) estimulación del sistema inmunitario.

20 Algunas bacterias patógenas reducen la capacidad de un animal para absorber nutrientes alterando el revestimiento del intestino delgado. Estudios indican que las bacterias productoras de ácido láctico se unen al intestino delgado y producen sustancias para evitar que organismos patógenos se unan a la pared intestinal. Además, la unión de las bacterias beneficiosas puede aumentar el área superficial de absorción del intestino delgado y potenciar la actividad enzimática para una mayor absorción de nutrientes por el animal.

25 Las bacterias, tanto promotoras de la salud como patógenas, requieren ciertos nutrientes para el crecimiento. Las bacterias productoras de ácido láctico pueden utilizar vitaminas, aminoácidos u otros nutrientes que podrían de otro modo apoyar el crecimiento de bacterias dañinas.

30 Una parte importante de la investigación se ha centrado en la capacidad de los cultivos microbianos para alimentación directa para producir sustancias que inhiben los organismos patógenos. Los ácidos láctico, acético y fórmico reducen el pH intestinal para crear un ambiente inadecuado para los organismos dañinos. Las bacterias productoras de ácido láctico también secretan peróxido de hidrógeno, dando como resultado condiciones desfavorables para organismos que requieren oxígeno.

35 Se han identificado dos grupos de sustancias antimicrobianas, sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular, por ejemplo, reuterina, producida por *L. reuteri*; y bacteriocinas. Las bacteriocinas son sustancias producidas por microbios que inhiben el crecimiento de bacterias que a menudo están relacionadas genéticamente. Las bacteriocinas son polipéptidos y sus propiedades inhibitoras se destruyen por las proteasas, mientras que la reuterina, una sustancia antimicrobiana de amplio espectro, no es un polipéptido y su actividad antimicrobiana no se ve afectada por proteasas.

40 Se han usado cepas de una amplia variedad de especies de *Lactobacillus*, incluyendo *L. reuteri* en formulaciones probióticas. *Lactobacillus reuteri* es uno de los colonizadores que se producen de manera natural del tracto gastrointestinal de animales y se encuentra de manera rutinaria en los intestinos de animales sanos, incluyendo seres humanos. Se sabe que tiene actividad antimicrobiana. Véanse, por ejemplo los documentos de patente estadounidense n.ºs 5.439.678, 5.458.875, 5.534.253, 5.837.238 y 5.849.289. Cuando se hacen crecer células de *L. reuteri* en condiciones anaerobias en presencia de glicerol, producen la sustancia antimicrobiana conocida como β -hidroxi-propionaldehído (3-HPA).

45 La investigación ha documentado la capacidad de bacterias productoras de ácido láctico para inhibir *E. Coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*. La reducción de organismos que provocan diarrea es especialmente importante en neonatos y animales jóvenes.

50 Las modificaciones genéticas de cepas de *Lactobacillus* van normalmente dirigidas a la mejora o el aumento de características específicas de la cepa, tales como la producción de compuestos antagonistas de patógenos comunes de los alimentos, la capacidad para metabolizar colesterol o para tolerar ácido o bilis, y capacidades potenciadoras de la respuesta inmunitaria (Kullen, M. J. y T. R. Klaenhammer. 1999. Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria, págs. 65-83. En G. Tannock (ed.), Probiotics: A Critical Review, Horizon Scientific Press, Wyomondham, R.U.). En condiciones ideales, estas cepas modificadas beneficiarían al huésped. Sin embargo, en condiciones naturales, el rendimiento de las cepas modificadas de *Lactobacillus* se ve frecuentemente afectado por plásmidos autóctonos, especialmente en los que las manipulaciones están mediadas por plásmido. La incompatibilidad entre los plásmidos autóctonos y los plásmidos introducidos es uno de los principales factores que contribuyen a la inestabilidad del plásmido dentro de un huésped (Posno, M., R.J. Leer, N. van Lwijk, M.J.f. van Giezen, P.T.H.M. B. C. Lokman y P.H. Pouwels. 1991. Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived

from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1822-1828).

La mayoría de las cepas de *Lactobacillus*, independientemente de su origen (plantas, comida, ensilado, masa madre de levadura o tracto gastrointestinal), albergan al menos un plásmido autóctono, y a menudo más (Pouwels, P. H. y R. J. Leer. 1993. Genetics of lactobacilli: Plasmids and gene expression. Antonie van Leeuwenhoek 64, 85-107). Estos plásmidos pueden no sólo interferir en la estabilidad del plásmido recombinante, sino que también pueden albergar rasgos no deseados, por ejemplo, resistencia a antibióticos (Posno et al., 1991) y puede resultar ventajoso o incluso necesario eliminar cualquiera de los plásmidos autóctonos de este tipo.

Muchos antibióticos y sustancias antimicrobianas han estado presentes de manera natural en la naturaleza durante millones de años y el ser humano ha usado antibióticos y antimicrobianos para inhibir el crecimiento de bacterias u otros microbios y para tratar infecciones bacterianas o microbianas en seres humanos, otros animales y en cultivo tisular. Sin embargo, el uso de antibióticos o antimicrobianos tiene el efecto no deseado de seleccionar bacterias u otros microbios que son resistentes a aquellos antibióticos o antimicrobianos que se administran o aplican. Como resultado, los regímenes de tratamiento pueden verse afectados adversamente o, en algunos casos, hacerse ineficaces.

Se ha notificado recientemente que *L. reuteri* ATCC 55730 es resistente frente a lincomicina y también que contiene el gen de resistencia *InuA* (Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C. y Meile, L. 2006. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. Syst Appl Microbiol. 29(2):145-155). Se buscó este gen en el genoma de la cepa y se identificó como el marco de lectura abierto Ir2105 en el plásmido pLR585. El plásmido también alberga genes que codifican para una proteína de resistencia a múltiples fármacos (Ir2089) y un exportador de antibióticos policétidos (Ir2096 y Ir2097). Ninguno de los genes en el plásmido tiene ninguna conexión o relevancia obvia de importancia para las características probióticas conocidas o la tolerancia al ácido de la cepa.

Existe una necesidad, especialmente en la industria de los probióticos, de usar lactobacilos que toleren bien los ácidos con el fin de que tales cultivos en diversas formulaciones no sólo pasen a través del entorno ácido del estómago para alcanzar el resto del intestino en números suficientes, sino también para poder crecer y colonizar el estómago, para poder ejercer su efecto probiótico por todo el tracto gastrointestinal. Cuando se usan cepas que toleran escasamente el ácido, es necesario ingerir números más elevados de bacterias, lo que conduce a un coste más elevado. Además, mucho esfuerzo se dirige a proteger los cultivos del pH ácido por varios medios, lo que también aumenta el coste. Existe, por tanto, un interés en la industria por tener cepas que toleren bien los ácidos, y por consiguiente, por métodos que mejorarán la tolerancia al ácido de las cepas existentes. Un ejemplo de un método para mejorar la tolerancia al ácido de las bacterias del ácido láctico se facilita en la solicitud de patente US20050158423 A1, en el que se usan cepas que portan plásmidos que codifican para pequeñas proteínas de choque térmico, y también se facilitan métodos para transferir tales plásmidos a una bacteria del ácido láctico. Sin embargo, esto está en contraste con la presente invención en la que se elimina un plásmido para aumentar la tolerancia al ácido de la cepa.

Otros objetos y características de las invenciones resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Muestra la detección de plásmidos con PCR. Los números representan: 1, *L. reuteri* DSM 17938; 2, *L. reuteri* DSM 17686; 3, *L. reuteri* ATCC 55730; y 4, *L. reuteri* DSM 20016 (control negativo). Los plásmidos analizados son: a, pLR580; b, pLR581; c, pLR584; y d, pLR585.

Figura 2. Muestra la detección del gen de resistencia *InuA*. 1, DSM 17938; 2, DSM 17686; 3, ATCC 55730; 4, DSM 20016

Figura 3. Tolerancia al ácido de ATCC 55730 (izquierda), DSM 17686 (centro) y DSM 17938 (derecha) en barras. Las columnas muestran la proporción de bacterias supervivientes (media de cuatro repeticiones). Las barras de error indican la desviación estándar, una estrella un valor $p < 0,05$ y tres estrellas $p < 0,001$.

Sumario de la invención

Se obtuvo una cepa derivada de *L. reuteri* ATCC 55730 segregando los dos plásmidos pLR581 y pLR585. Esta cepa es mucho más sensible a tetraciclina y lincomicina que la cepa progenitora. La cepa sometida a segregación doble se depositó en la DSMZ y se denominó *L. reuteri* DSM 17938. *L. reuteri* DSM 17938 tiene el mismo perfil de rep-PCR (PCR repetitiva), patrón de fermentación, producción de reuterina, morfología, velocidad de crecimiento, adhesión a la mucosidad y tolerancia a la bilis que *L. reuteri* ATCC 55730. Sin embargo, la cepa sometida a segregación crece a una densidad más elevada y sobrevive mejor en condiciones ácidas. Cuando las cepas se cocultivan DSM 17938 es también más competitiva.

Por tanto, la invención se refiere a una nueva cepa, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, que es un ejemplo de cepas sometidas a segregación de plásmido de bacterias del ácido láctico modificadas de tal modo que presentan una mejor tolerancia al ácido. Se describe un procedimiento para modificar tales cepas. La invención también se refiere a una composición que contiene la cepa. Otros objetos y características de las invenciones resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

La cepa de *L. reuteri* DSM 17938 (depositada en la DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) el 6 de febrero de 2006, según el tratado de Budapest) se deriva de *L. reuteri* ATCC 55730 segregando los dos plásmidos pLR581 y pLR585. Tiene el mismo perfil de rep-PCR, patrón de fermentación, producción de reuterina, morfología, velocidad de crecimiento, adhesión a la mucosidad y tolerancia a la bilis que ATCC 55730 pero es mucho más sensible a tetraciclina y lincomicina que la cepa progenitora. Sorprendentemente, se encuentra que *L. reuteri* DSM 17938 y DSM 17686 provocan un aumento en tolerancia al ácido debido a la eliminación de plásmido mediante segregación. Es más competitiva en experimentos de cocultivo, lo que puede explicarse por una mejor supervivencia a pH ácido.

Un objeto de esta invención es eliminar un plásmido de una bacteria del ácido láctico para que tolere mejor los ácidos y de esta manera sobreviva mejor en el intestino y por consiguiente sea más beneficiosa para la salud del ser humano. Esto se ha mostrado en la cepa de *L. reuteri* DSM 17686 y en la nueva cepa de *L. reuteri* DSM 17938. Parece ser un fenómeno general y previamente desconocido en lactobacilos que la eliminación de un plásmido, que no codifica para nada relacionado con la tolerancia al ácido, dará lugar a una nueva cepa que es más estable frente a los ácidos. Se ha usado este efecto en el presente documento para preparar lactobacilos más tolerantes al ácido.

Otros objetos y características de la invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Segregación de pLR585 de DSM 17686

Se realizó la segregación de plásmido mediante formación y regeneración de protoplastos, esencialmente como se describe en Vescovo *et al.* (Vescovo, M., Morelli, L., Cocconcelli, P.S. y Bottazzi, V. 1984. Protoplast formation, regeneration and plasmid curing in *Lactobacillus reuteri*. FEMS Microbiol Lett 23:333-334). Se diluyó un cultivo durante la noche de *Lactobacillus reuteri* DSM 17686 hasta una DO600 = 0,1 en un cultivo MRS de 10 ml (Oxoid, Lenexa, KS, EE.UU.) y se hizo crecer a 37°C hasta una DO600 = 0,7-0,8. Se recogieron las células mediante centrifugación a 3000xg durante 10 minutos y se lavaron en 10 ml de agua Nanopure. Se recogieron de nuevo las células mediante centrifugación y se resuspendieron en 2 ml de tampón de protoplastos (tampón fosfato 0,2 M, sacarosa 0,5 M, MgCl₂ 20 mM; pH 7,0). Se mezclaron las células con un volumen igual de 10 mg ml⁻¹ de lisozima en tampón de protoplastos y se incubó a 37°C durante 1 h. Se recogieron los protoplastos mediante centrifugación a 3000xg durante 15 minutos y se lavaron con 20 ml de tampón de protoplastos. Se recogieron de nuevo los protoplastos mediante centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de tampón de protoplastos tras lo cual se llevó a cabo una observación microscópica.

Se sembraron en placa las diluciones en tampón de protoplastos en agar MRS con sacarosa 0,5 M para regeneración. Se sembraron en placa las diluciones en agua Nanopure en agar MRS para evaluar el número de células completas que quedaron. Se determinó el número de ufc tras una incubación anaerobia durante la noche a 37°C y de nuevo tras una incubación durante la noche adicional. Se llevaron las colonias regeneradas a agar MRS con y sin 8 µg ml⁻¹ de lincomicina. Se identificaron los candidatos sometidos a segregación de plásmido mediante ausencia de crecimiento en placas de MRS con lincomicina.

Resultado:

Confirmación de la segregación de pLR585

Se analizaron los plásmidos de DSM 17938 con PCR (figura 1). Tanto pLR585 como pLR581 estaban ausentes, mientras que se hallaban todavía los otros dos plásmidos. Por tanto, en DSM 17938 hay segregación tanto del plásmido de tetW pLR581 como del plásmido de InuA pLR585. La ausencia de InuA en DSM 17938 se detectó también mediante PCR (figura 2).

Ejemplo 2

Determinación de concentraciones inhibitorias mínimas de lincomicina

Se hicieron crecer las bacterias en caldo MRS durante 16 h a 37°C. Tras la dilución hasta 10⁵ ufc ml⁻¹, se puso 1 µl de cada cepa bacteriana en placas de MRS que contenían lincomicina o clindamicina (concentraciones de 0, 0,125,

0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Tras la adsorción de las gotas, se incubaron las placas en atmósfera anaerobia a 37°C durante 24 h. Se definió la CIM como la concentración más baja de antibiótico para la que no hubo crecimiento bacteriano visible. Se sometieron a prueba las CIM frente a tetraciclina con Etest (AB Biodisk) en bacterias que crecían en placas de agar MRS (Oxoid) según las instrucciones del fabricante.

5

Resultado:

La segregación de pLR585 dio como resultado una disminución de CIM desde >16 hasta 0,25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de lincomicina, próximo al nivel del control negativo DSM 20016. El valor ya bajo valor de CIM frente a la clindamicina no cambió. También se sometieron a prueba las CIM frente a tetraciclina con E-test y se halló que eran de 12-16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para DSM 17938 y DSM 17686 y >256 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para ATCC 55730.

10

Tabla 1

Cepa	DSM 17938	DSM 17686	ATCC 55730	DSM 20016	1063
CIM de lincomicina ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0,5	>16	>16	0,25	>16
CIM de clindamicina ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	>16

15 Ejemplo 3

Patrón de fermentación y producción de reuterina

Se determinaron los patrones de fermentación usando api 50 CHL (bio-Mérieux) según las instrucciones del fabricante. Para detectar la producción de reuterina, se hicieron crecer en primer lugar las bacterias durante 48 h en placas de MRS (inoculadas en líneas). Se cubrieron entonces las placas con agar-glicerol 500 mM (agar al 1%) y se incubaron a 37°C durante 30 min. Se detectó la reuterina mediante la adición de 5 ml de 2,4-dinitrofenilhidrazina (el 0,1% en HCl 2 M). Tras 3 min. de incubación, se vertió la disolución y se añadieron 5 ml de KOH 5 M. Las zonas rojas alrededor de las colonias muestran que se ha producido reuterina.

20

25

Resultado:

Se comparó el patrón de fermentación de DSM 17938 con DSM 17686 y ATCC 55730 usando API 50 CHL y no pudo detectarse ninguna diferencia. Todas las cepas fermentaron L-arabinosa, ribosa, galactosa, glucosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, rafinosa y gluconato y fueron negativas para el resto de las pruebas. También la producción de reuterina fue de la misma magnitud para las tres cepas.

30

Ejemplo 4

Crecimiento y cocultivo

Se detectó el crecimiento mediante inoculación de un cultivo durante la noche hasta una DO de 0,1 en caldo MRS en tubos precalentados hasta 37°C. Se incubaron los tubos a 37°C y se tomaron muestras para medir la DO600 nm durante 8 h. Se analizó cada bacteria por triplicado. Se realizó el cocultivo de las bacterias mezclando cantidades iguales de cultivos durante la noche de ATCC 5730, DSM 17686 y DSM 17938 en tubos precalentados con caldo MRS. Se incubó la mezcla a 37°C durante la noche y después volvió a inocularse a un nuevo tubo con MRS. Se repitió este procedimiento tres veces. Al inicio y después de cada cultivo se analizaron las muestras sembrando diferentes diluciones del cultivo en placas de MRS y después llevando las colonias a tres placas de MRS; una sin antibióticos, una que contenía 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de lincomicina y una que contenía 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de tetraciclina. Se consideró que las colonias que crecían sólo en MRS eran DSM 17938, se consideró que aquéllas que crecían en MRS con lincomicina eran DSM 17686 y se consideró que aquéllas que crecían en las tres placas eran ATCC 55730.

40

45

Resultado:

Se comparó el crecimiento de las cepas DSM 17938 y DSM 17686 con ATCC 55730. No pudo detectarse ninguna diferencia en el tiempo de generación, sin embargo, ambas cepas sometidas a segregación crecieron a una densidad significativamente más alta que ATCC 55730. Las DO finales fueron: para ATCC 55730, 4,78±0,13; para DSM 17686, 5,89±0,28; y para DSM 17938, 6,00±0,26. Se cocultivaron también las tres cepas en caldo MRS durante aproximadamente 30 generaciones (3 reinoculaciones). Los resultados muestran claramente que las cepas sometidas a segregación tienen una ventaja cuando crecen *in vitro*. Se inocularon conjuntamente cantidades iguales de las cepas, pero al final del experimento la mezcla consistía en un 56% de DSM 17938, un 38% de DSM 17686 y sólo un 6% de ATCC 55730. La razón de esto puede ser que las cepas sometidas a segregación crecen a una DO más elevada o posiblemente sobrevivan mejor en fase estacionaria. Por tanto, la pérdida de dos plásmidos puede

50

55

haber dado como resultado una carga disminuida (menos ADN para replicar) y de esta manera una mayor capacidad competitiva.

Ejemplo 5

5

Unión a la mucosidad

Se usó mucosidad de intestino delgado de cerdo. Se disolvieron material de mucosidad y BSA y se diluyeron en PBS y se inmovilizaron en pocillos de microtitulación (Greiner) mediante incubación de 100 μl de disolución durante 3 h a temperatura ambiente con rotación lenta. Las concentraciones finales fueron de una DO280 de 0,1 para el material de mucosidad y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para BSA. Se bloquearon los pocillos con 0,2 ml de PBS complementado con Tween 20 al 1% durante 1 h, y entonces se lavaron con PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST). Se hicieron crecer las bacterias en caldo MRS durante 16 h a 37 °C, se lavaron una vez en PBST y se diluyeron hasta una DO600 de 0,5 en el mismo tampón. Después de eso se lavaron los pocillos con PBST y se examinó el grado de unión con un microcopio invertido. Se analizaron todas las bacterias por triplicado.

Resultado:

Se comparó la capacidad de unión a la mucosidad de las cepas DSM 17938 y DSM 17686 con ATCC 55730. No pudo detectarse ninguna diferencia en la unión.

Ejemplo 6

25

Tolerancia al ácido

Con el fin de someter a ensayo la supervivencia a pH bajo, se hicieron crecer durante la noche las cepas de *L. reuteri* ATCC 55730, DSM 17686 y DSM 17938 a 37°C en MRS. Se añadieron 5 μl de las bacterias a 10 ml de MRS precalentado y se incubaron a 37°C hasta que se alcanzó una DO600 de 1,0. Tras la adición de 800 μl de un cultivo de DO 1,0 a 8 ml de jugo estomacal sintético (8,3 g l^{-1} de proteosa peptona (Oxoid), 3,5 g l^{-1} de glucosa, 2,05 g l^{-1} de NaCl, 0,6 g l^{-1} de KH_2PO_4 , 0,11 g l^{-1} de CaCl_2 , 0,37 g l^{-1} de KCl, ajustado a pH 2,0 con HCl), una modificación de Cotter et al. sin enzimas (Cotter, P. D., Gahan, C. G. y Hill, C. 2001. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. Mol Microbiol 40: 465-475). Se incubaron los tubos a 37°C y se retiraron las muestras tras 1, 20, 50 y 90 minutos. Se diluyeron las muestras en PBS y se extendieron en placas de MRS, que se incubaron anaeróticamente durante 24 horas a 37°C. Se repitió el experimento en dos ocasiones y se analizaron cada vez las muestras por duplicado. Se sometió a prueba estadísticamente la diferencia entre las cepas mediante la prueba de la t de Student.

Resultado:

Se hicieron crecer las tres cepas hasta una DO600 de 1,0 (fase exponencial media a tardía) y después de eso se expusieron a pH ácido. Tanto DSM 17938 como DSM 17686 sobrevivieron mejor que ATCC 55730 tras 50 min. de incubación a pH 2,0, con tasas de supervivencia del 41, del 28 y del 20%, respectivamente (figura 3). Las diferencias fueron significativas con valores p de 0,0006 (DSM 17938 frente a ATCC 55730) y 0,04 (DSM 17686 frente a ATCC 55730). La razón de esto se desconoce. Un mejor supervivencia a pH ácido puede ser una explicación de porqué las cepas sometidas a segregación fueron más competitivas en los experimentos de cocultivo.

Ejemplo 7

50

Tolerancia a la bilis

Se hicieron crecer las bacterias durante 16 h en caldo MRS a 37°C. Se diluyeron las suspensiones bacterianas en PBS hasta aproximadamente 103-106 ufc ml^{-1} . Se añadieron gota a gota 10 μl de cada dilución a placas de MRS con diferentes concentraciones de bilis bovina (0, 0,5, 1, 2, 4 y 6%; Sigma B3883). Se analizaron dos duplicados de cada bacteria. Se incubaron las placas durante 72 h a 37°C en una atmósfera anaerobia. Se contaron las colonias y se estimó la tolerancia a la bilis comparando el número de colonias en las placas con bilis con la placa de MRS sin bilis. También se sometieron a prueba bacterias en fase exponencial (DO 0,5) de la misma manera.

Resultado:

Se compararon las tolerancias a la bilis bovina de las cepas sometidas a segregación DSM 17938 y DSM 17686 con ATCC 55730. Se sometieron a prueba las bacterias en fases de crecimiento tanto estacionario como exponencial (DO600 de 0,5). Toleran la bilis bien cuando están en fase estacionaria, pero la supervivencia y crecimiento fueron mucho más bajos en fase exponencial. Sin embargo, no pudo detectarse ninguna diferencia en la tolerancia entre las cepas.

REIVINDICACIONES

1. Cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
2. Composición que comprende un cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.

Figura 1

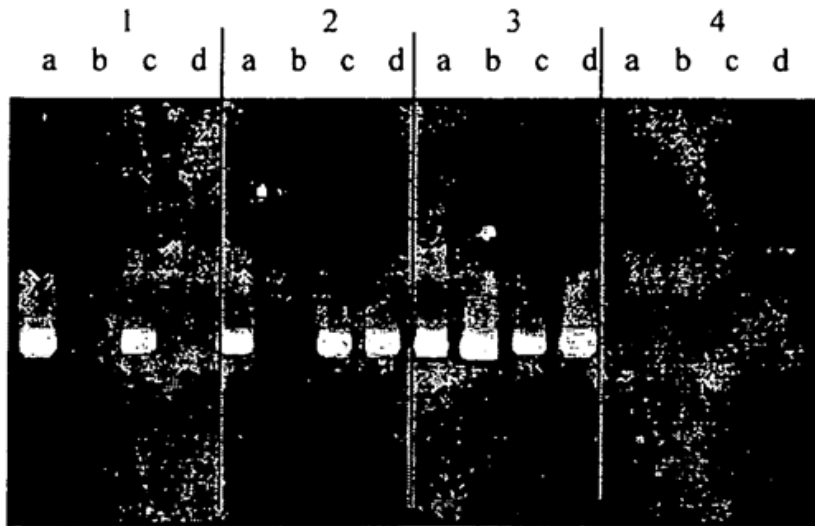


Figura 2



Figura 3

