

ECOPHYSIOLOGY AND PHYLOGENY OF *FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII* IN HEALTHY AND DISEASED GUT. APPLICATION IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE DIAGNOSTICS

Autora: Mireia López Siles

Directores: Dr. L. Jesús García Gil y

Dra. Margarita Martínez Medina

Centro de realización: Universitat de Girona

Faecalibacterium prausnitzii, un miembro del filo Firmicutes (Ruminococcaceae), es una de las especies más abundantes del tracto intestinal humano. En los últimos años se ha evidenciado que *F. prausnitzii* desaparece en pacientes que padecen enfermedad inflamatoria intestinal (EII), y se ha sugerido que su presencia es importante para mantener la homeostasis intestinal. Sin embargo, existe poca información sobre qué requerimientos nutricionales tiene este microorganismo, la diversidad genética que se incluye dentro de esta especie y cómo su abundancia se ve alterada en pacientes que sufren enfermedades del intestino. El objetivo principal de esta tesis fue comprender mejor la fisiología, diversidad y abundancia de *F. prausnitzii* en individuos sanos y pacientes con enfermedad intestinal.

En primer lugar se realizó una caracterización filogenética y fenotípica de varias cepas de esta especie obtenidas de individuos sanos (S). El análisis filogenético del gen del 16S rRNA mostró que las cepas actualmente aisladas de *F. prausnitzii* se dividen en dos filogrupos con un 97% de similitud en la secuencia de este gen. La caracterización fenotípica reveló que *F. prausnitzii* es una bacteria metabólicamente versátil, que puede crecer utilizando sustratos con un grado de complejidad variable, ya sean procedentes de la dieta o del huésped. Todas las cepas fueron extremadamente sensibles a sales biliares. En cambio, la sensibilidad a cambios en el pH del medio resultó ser variable en función de cada cepa. Estas características permiten explicar la elevada abundancia de *F. prausnitzii* en la comunidad microbiana del colon y a la vez, la elevada sensibilidad a pequeños cambios en las condiciones ecológicas del intestino sería una posible explicación para el hecho de que esta bacteria comensal se encuentre comprometida en un colon alterado.

Dado que las condiciones ambientales del intestino varían entre un intestino sano y enfermo, en segundo lugar, se quiso determinar si las personas que sufren un trastorno gastrointestinal tienen una población de *F. prausnitzii* asociada a la mucosa colónica diferente de la que presentan los individuos S a nivel de riqueza y composición. Se desarrolló un nuevo sistema de reacción en cadena de la polimerasa-electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE) específico para esta especie y dirigido al gen del 16S rRNA. Se analizó el perfil de la población de *F. prausnitzii* en biopsias colónicas de individuos S, y pacientes con trastornos intestinales tales como síndrome del intestino irritable (SII), colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC) y cáncer colorrectal (CCR). La riqueza de subtipos de *F. prausnitzii* fue menor en pacientes con EII que en individuos S. Las unidades taxonómicas operacionales (OTU) más prevalentes se detectaron en todos los grupos de individuos. No obstante, su distribución y la presencia de filotips específicos de cada enfermedad permitieron diferenciar las poblaciones de *F. prausnitzii* de EII y CCR respecto a las halladas en S. Estas evidencias han sido la base para la identificación de nuevos biomarcadores a cuantificar con el objetivo de asistir en la identificación de estados de enfermedad intestinal.

Por tanto, en la tercera parte de esta tesis, se exploró la aplicación de cuantificar *F. prausnitzii* como biomarcador de ayuda al diagnóstico o pronóstico de enfermedades intestinales. La cantidad de *F. prausnitzii* se determinó mediante nuevos ensayos de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) en biopsias de íleon, colon y recto de individuos S, SII, EII y CCR.

Se determinó la utilidad de *F. prausnitzii* y sus filogrupos como biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades intestinales. También se evaluó la utilidad de *F. prausnitzii* conjuntamente con la cuantificación de *Escherichia coli* (otro microorganismo extensamente descrito como miembro de la disbiosis que ocurre en EII), mediante el cálculo del índice *F. prausnitzii*-*E. coli* (índice F-E). Los pacientes con EC, CU y CCR presentan una menor cantidad de *F. prausnitzii* total y del filogrupo I en comparación con los individuos S. La

abundancia del filogrupo I fue un mejor biomarcador en comparación con la cantidad total de *F. prausnitzii* para discriminar los individuos S respecto a los pacientes con trastornos intestinales. El índice F-E permitió mejorar la discriminación obtenida entre grupos de pacientes. La disminución de filogrupo II se observó sólo en pacientes con EC y esta característica puede ser aplicada para mejorar la discriminación de pacientes con EC colónica (C-EC) de aquellos con colitis ulcerosa extensa (E3). La abundancia del filogrupo I disminuyó en pacientes con EC activa, mientras que los pacientes con resección intestinal mostraron una reducción en la cantidad de filogrupo II. Los tratamientos con mesalazina y inmunosupresores no permitieron restaurar la abundancia de ninguno de los dos filogrupos de *F. prausnitzii*.

Este trabajo aporta nuevos datos que permiten entender mejor la fisiología y distribución en el intestino de *F. prausnitzii*. Además, se ha evidenciado por primera vez que las poblaciones de esta especie están alteradas en situación de enfermedad intestinal. Los resultados obtenidos concuerdan con los datos previos sobre la comunidad microbiana de pacientes que padecen enfermedades intestinales, donde ya se había indicado que esta especie se encuentra disminuida. El presente trabajo permite dilucidar las posibles causas de este fenómeno. Finalmente en este estudio se han diseñado y optimizado nuevas herramientas moleculares, y se ha comprobado su capacidad para discriminar entre trastornos intestinales, lo que implica una estrategia prometedora para aplicar en un futuro en el campo del diagnóstico de las enfermedades intestinales.

ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* EN EL ÁMBITO HOSPITALARIO

Autor: Zaloa Bravo del Hoyo

Directores: Inés Arana Basabe

y Maite Orruño Beltran

Centro de realización: Facultad de Ciencia y Tecnología (UPV/EHU)

Acinetobacter baumannii es un importante patógeno nosocomial responsable de un gran número de brotes epidémicos

en los hospitales de todo el mundo. Este microorganismo es capaz de persistir bajo condiciones adversas durante largos periodos de tiempo debido a su resistencia a la desecación y a los antimicrobianos. Este trabajo doctoral pretende profundizar, desde un enfoque ecológico, en el conocimiento de la respuesta de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T al estrés inducido por factores abióticos y establecer las estrategias de supervivencia que le permiten persistir en condiciones propias del ambiente hospitalario. Los resultados de este estudio indicaron que cuando esta bacteria se encuentra sobre superficies sólidas es capaz de preservar su cultivabilidad y otras características celulares durante al menos 30 días. Sin embargo, la supervivencia como células en suspensión es dependiente de la temperatura que, a 37°C, induce un gran número de cambios en diferentes características celulares, como cultivabilidad, integridad de la membrana citoplasmática, morfología, tamaño o adherencia. Además, el análisis del subproteoma de las envueltas celulares de este microorganismo durante su exposición a condiciones adversas reveló, en términos generales, una gran estabilidad en las proteínas asociadas con el metabolismo, la estructura, la respuesta al estrés o la patogenicidad. Por otro lado, se analizó el efecto

de la exposición de *A. baumannii* a la radiación (visible o UV-C) y la acción de diferentes desinfectantes, agentes que indujeron la entrada de *A. baumannii* en el estado Viable No Cultivable. Aunque ninguno de los desinfectantes estudiados eliminó totalmente a este microorganismo, los resultados demostraron que la lejía fue el desinfectante más eficaz, sin embargo, los productos de amonio cuaternario testados podrían considerarse más adecuados al carecer de efectos negativos para los pacientes y personal hospitalario.

IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN *ESCHERICHIA COLI* Y *VIBRIO HARVEYI*

Autora: Claudia Parada Morais

Directora: Inés Arana Basabe

Codirectora: Maite Orruño Beltrán

Centro de realización y presentación:

Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (Leioa)

Las bacterias en los sistemas naturales están continuamente expuestas a cambios en las condiciones ambientales a los que hacen frente adoptando estrategias que aseguran

su perdurabilidad. Enfrentadas a la escasez de nutrientes y/o ayuno, poblaciones de *Vibrio harveyi*, bacteria autóctona del agua de mar y de *Escherichia coli*, bacteria entérica y autóctona a los sistemas acuáticos, mantienen su viabilidad, si bien experimentan pérdida de cultivabilidad, originando subpoblaciones de células viables no cultivables (VNC) y cultivables. Las condiciones de inducción del estado VNC en *V. harveyi* y los cambios morfológicos que experimenta difieren de los establecidos para *E. coli*. Estas diferencias también quedan reflejadas en la caracterización del subproteoma de las envueltas celulares. Así, aunque ambas bacterias conservan proteínas implicadas en el mantenimiento de la estructura celular, el transporte y la bioenergética, *E. coli* adopta una estrategia más conservadora manteniendo su perfil proteico, mientras que *V. harveyi* modifica la expresión de un gran número de proteínas. Estos resultados indican que ambas bacterias desarrollan estrategias de supervivencia distintas bajo condiciones de estrés. La estrategia de supervivencia de *E. coli* parece englobarse dentro del modelo *bust and boom*, suponiendo la adopción del estado VNC un proceso degenerativo. Por contra, para *V. harveyi* la estrategia basada en la adopción del estado VNC está detrás de la perdurabilidad de esta bacteria en el medio natural.

Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

SEM@foro publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM (secretaria.sem@semicrobiologia.org) o al Director Editorial (m.sanchez@umh.es) por correo electrónico, siguiendo el formato: Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación (si es distinto) y Resumen (máximo, unas 200 palabras).

SEM@foro se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la Microbiología.

Los resúmenes de tesis dirigidas por miembros de la SEM no serán publicados en esta sección. Se recomienda enviar a la sección "Nuestra Ciencia" un resumen de alguno de los artículos producidos por la tesis.