



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO SOBRE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES DIETAS ALTAS EN GRASA EN ENTEROCOCOS INTESTINALES MURINOS

**PRESENTADA POR:
BEATRIZ SÁNCHEZ ARCAS**

**DIRIGIDA POR:
Dra. MAGDALENA MARTÍNEZ CAÑAMERO
Dr. ANTONIO COBO MOLINOS
Dr. ANTONIO GÁLVEZ DEL PÓSTIGO RUÍZ**

Jaén, febrero de 2020

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO SOBRE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES DIETAS ALTAS EN GRASA EN ENTEROCOCOS INTESTINALES MURINOS

Jaén, febrero 2020

Fdo: Beatriz Sánchez Arcas
Aspirante al grado de Doctora

VºBº de los directores del trabajo:

Fdo: Magdalena Martínez Cañamero

Fdo: Antonio Cobo Molinos

Fdo: Antonio Gálvez del Póstigo Ruíz

*Área de Microbiología. Departamento de Ciencias de la Salud. Facultad
de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.*

Los profesores D^a Magdalena Martínez Cañamero, D Antonio Cobo Molinos y D Antonio Gálvez del Póstigo Ruíz pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

CERTIFICAN: Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: *“Estudio sobre la influencia de diferentes dietas altas en grasa en Enterococos intestinales murinos”* presentado por D^a. Beatriz Sánchez Arcas, ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo así mismo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al grado de Doctora.

Jaén, febrero 2020

Fdo: Magdalena Martínez Cañamero

Fdo: Antonio Cobo Molinos

Fdo: Antonio Gálvez del Póstigo Ruíz

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad de Jaén (PP2009 / 13/03) y la Junta de Andalucía (PI Excelencia_2010 AGR 6340).

Índice

Resumen	7
Introducción	11
I. GÉNERO ENTEROCOCCUS.....	13
1.1. Enterococos en el medio ambiente	13
1.2. Características fenotípicas.....	15
1.2.1. Clasificación taxonómica	15
1.2.2. Genes de mantenimiento y MLST.....	18
1.3. Patogenicidad del género <i>Enterococcus</i>	19
1.3.1. Factores de virulencia en <i>Enterococcus</i>	21
1.3.2. Resistencia a antibióticos	26
1.4. Respuestas al estrés ambiental	27
1.4.1. Radiación UV y luz solar	28
1.4.2. Concentración de sales en el medio	29
1.4.3. Desinfección.....	30
II. ACEITE DE OLIVA Y MICROBIOTA INTESTINAL.....	33
1.5. Dieta mediterránea	33
1.6. Aceite de oliva y microbiota intestinal	37
Objetivos.....	51
2.1. Objetivo general.....	53
2.2. Objetivos específicos.....	53
Materiales y métodos	55
3.1. Aislamiento, mantenimiento y análisis bioquímico de las cepas a estudiar para la identificación de los enterococos.....	57

3.1.1.	<i>Aislamiento de cepas.....</i>	57
3.1.2.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	60
3.2.	Siembra de las cepas seleccionadas y preparación para MLST.....	63
3.3.	Obtención del ADN de cada cepa de enterococos para el estudio genético de patogenicidad.	64
3.3.1.	<i>Extracción del ADN.....</i>	64
3.3.2.	<i>Medición del ADN.....</i>	67
3.3.3.	<i>Observación del ADN en un gel de agarosa al 1%.....</i>	68
3.4.	Estudio genético de patogenicidad: PCR de factores de virulencia y revelado.....	68
3.5.	Producción de aminas biógenas	72
3.6.	Resistencia a antibióticos en placa y PCR	74
3.6.1.	<i>Resistencia a antibióticos en placa</i>	74
3.6.2.	<i>Resistencia a antibióticos mediante detección por PCR de genes implicados.....</i>	74
3.7.	Crecimiento frente a aceite de oliva virgen y refinado.....	80
3.8.	Producción de bacteriocinas	81
3.9.	Estudio estadístico	82
3.10.	Identificación mediante secuenciación ARNr 16S	84
3.10.1.	<i>Purificación de los productos de PCR</i>	86
3.10.2.	<i>Secuenciación de los productos de PCR.....</i>	86

3.11. Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).....	87
3.12. Estudio genético para la caracterización taxonómica MLST (Multilocus Sequence Typing).....	89
3.12.1. PCR para la caracterización taxonómica MLST y revelado.....	89
3.12.2. Purificación de los productos de PCR	92
3.12.3. Secuenciación de los productos de PCR.....	93
3.13. Estudio de los resultados de secuenciación: estudio de las cepas ST y estudio algorítmico eBURSTv3.....	93
3.13.1. Estudio de las cepas ST (sequence type) y estudio algorítmico eBURSTv3	95
3.14. Estudio proteómico de las cepas de <i>Enterococcus</i> de interés.....	95
3.14.1. Obtención de extractos proteicos de <i>Enterococcus</i>	95
3.14.2. Análisis del perfil unidimensional (1D) de los extractos de proteínas de <i>Enterococcus</i>	97
3.14.3. Análisis del perfil bidimensional (2D) de los extractos de proteínas de <i>Enterococcus</i>	98
3.14.4. Análisis de los extractos proteicos mediante Espectrofotometría de Masas Orbitrap y procesamiento de datos.....	100
3.15. Estudios comparativos con datos obtenidos a partir de heces de ratón mediante secuenciación masiva	100
Resultados.....	103
Parte I	105

4.1. Artículo publicado en International Journal of Molecular Sciences titulado “ <i>Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice</i> ” (2019).	105
Parte II	107
4.2. Producción de bacteriocinas	109
4.3. Estudio genético para la caracterización taxonómica MLST (Multilocus Sequence Typing) y estudio algorítmico eBURTSv3	110
4.4. Identificación y análisis de las secuencias ARNr 16S V3-V5	114
4.5. Caracterización comparativa de la proteómica de cepas de <i>Enterococcus</i>	118
4.5.1. Análisis del perfil unidimensional (1D) de los extractos de proteínas de <i>Enterococcus</i>	118
4.5.2. Análisis del perfil bidimensional (2D) de los extractos de proteínas de <i>Enterococcus</i> .	119
4.5.3. Análisis de los extractos proteicos mediante Espectrofotometría de Masas Orbitrap y procesamiento de datos	120
Discusión	125
Conclusiones	141
Bibliografía	146

Resumen

En el presente trabajo se ha realizado un estudio comparativo sobre riesgos potenciales en una colección de 50 enterococos aislados de heces de ratones que se alimentaron con una dieta estándar o con una dieta alta en grasa enriquecida con aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva refinado o mantequilla. Obtuvimos aislados a tiempo cero, después de seis semanas y después de doce semanas del inicio del experimento. Las cepas fueron evaluadas bioquímicamente y caracterizadas genéticamente. *E. faecalis* y *E. casseliflavus* fueron las especies aisladas con mayor frecuencia en cualquier dieta y tiempo. Aparte del hecho de no obtener aislados del grupo de aceite de oliva virgen durante el último balance, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las dietas en el porcentaje de resistencia a los antibióticos y en la presencia del gen de la proteína de superficie enterocócica (*esp*), así como una tendencia importante ($p < 0.1$) para el aumento a lo largo del tiempo de la presencia del gen de la tirosina descarboxilasa (*tdc*) en el grupo de aislados de la dieta estándar. Cuando se estudió la resistencia de las cepas al aceite de oliva virgen o refinado, solo el grupo de enterococos de las dietas ricas en grasas mostró un porcentaje significativamente mayor de resistencia al aceite de oliva refinado ($p < 0.05$), mientras que ambos tipos de aceite inhibieron igualmente aquellos aislados de la dieta estándar ($p > 0.05$). La evaluación de

producción de bacteriocinas mostró mayor cantidad de productoras en el grupo de aislados de la dieta rica en mantequilla y, en su mayor parte, fueron bacteriocinas activas frente a bacterias Gram positivas. Todas las cepas de la especie *E. faecalis*, quince en total, fueron sometidas a un estudio genético de caracterización taxonómica “Multilocus Sequence Type” (MLST) que reveló la presencia fundamentalmente de dos secuencias tipo, ST9 y ST40. Las cepas aisladas de la dieta estándar pertenecieron todas al ST9, mientras que las aisladas de mantequilla fueron clasificadas como ST40. Concluimos este trabajo con un estudio de proteómica realizado en dos de las cepas, que elegimos como representantes de cada uno de las dos secuencias tipo, con objeto de llevar a cabo un estudio comparativo entre sí a partir de los archivos obtenidos mediante espectrometría de masas tras ser enfrentados a la base de datos correspondiente de *Enterococcus faecalis*.

Introducción

I. GÉNERO *ENTEROCOCCUS*

1.1. Enterococos en el medio ambiente

Los enterococos son miembros importantes de las comunidades intestinales en muchos animales pero son también patógenos oportunistas que causan millones de infecciones anualmente en todo el mundo (Moellering, 1992; Morrison *et al.*, 1997). Su abundancia en heces de humanos y animales es alta por lo que presenta una buena correlación con la evaluación de salubridad de aguas dulces y marinas, llevando a su uso generalizado como herramienta para estimar la calidad de aguas de uso agrícola o para el consumo humano en todo el mundo (US Environmental Protection Agency, 2004; Wade, 2008).

Los estudios ecológicos de los enterococos describen a estas bacterias como un grupo microbiano ampliamente distribuido. Viven como comensales del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, siendo el coco Gram-positivo más abundante en los seres humanos (Tannock and Cook, 2002). También se encuentra en el intestino de los insectos (por ejemplo, *Drosophila*; Cox y Gilmore, 2007). Paralelamente se conoce su presencia en alimentos de origen animal y vegetal debido a su capacidad de sobrevivir a los

tratamientos térmicos y a condiciones ambientales adversas (Giard *et al.*, 2001) y están involucrados en el deterioro de alimentos (Franz *et al.*, 1999), en intoxicaciones alimentarias (Giraffa *et al.*, 1997; Gardini *et al.*, 2001) y en la propagación de resistencia a antibióticos a través de la cadena alimentaria (Murray, 1990; Giraffa, 2002).

Los enterococos se usan pues, con mayor frecuencia, como bacterias indicadoras fecales, o indicadores generales de contaminación fecal, por lo que hay que tenerlos en cuenta como patógenos por el efecto sobre la salud y la evaluación de riesgos de contaminación (Cizek *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2007; Schoen *et al.*, 2011; Tseng y Jiang, 2012). Los estudios de este grupo bacteriano, sin embargo, han demostrado que estas bacterias están ampliamente distribuidas en una gran variedad de hábitats, incluso en aquellos hábitats en los que hay poca o ninguna presencia de humanos o fuentes fecales de origen animal (Byappanahalli *et al.*, 2012). Estos hábitats extra entéricos incluyen tanto suelo como sedimentos tales como arena de playa, vegetación acuática y terrestre y ambientes acuáticos como ríos, lagos y arroyos. Junto con todo esto, también podemos tener en cuenta hábitats heterotérmicos, en los cuales las temperaturas son variables, en contraste con el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente, donde la temperatura es relativamente constante.

1.2. Características fenotípicas

El género *Enterococcus* pertenece a la división *Firmicutes*. Está formado por bacterias esféricas u ovoides, que crecen en parejas, formando diplococos, o en cadenas de longitud variable (Hardie y Whiley, 1997; Murray, 1990). Se caracterizan por ser bacterias Gram positivas, quimioorganotrofas, fermentativas u homofermentativas (produciendo ácido láctico), anaerobias facultativas, no esporuladas, catalasa y oxidasa negativas (aunque algunas especies producen pseudocatalasa) (Klein, 2003; Hardie and Whiley, 1997; Murray, 1990). La movilidad difiere entre especies, por ejemplo, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* son móviles mientras que *E. asinio* y *E. phoeniculicola* no lo son (Law-Brown and Meyers, 2003; de Vaux *et al.*, 1998). La pigmentación también difiere entre especies, por lo que algunas especies presentan pigmento (de color amarillo) como *E. sulfureus*, *E. casseliflavus* y *E. mundtii* (Martínez-Murcia and Collins, 1991). Suelen ser especies que se encuentran comúnmente entre las plantas (Aarestrup *et al.*, 2002).

1.2.1. Clasificación taxonómica

El género *Enterococcus* fue originalmente clasificado dentro del género *Streptococcus*, pero posteriormente, en 1984, se propuso una

división independiente cuando la hibridación de ADN-rRNA reveló que especies como *Streptococcus faecalis* y *S. faecium* (ahora *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, respectivamente) se relacionaban de manera distante taxonómicamente con la especie *Streptococcus bovis* (Collins *et al.*, 1984; Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984). Hoy día se conocen 36 especies diferentes de este género que se caracterizan por crecer en condiciones extremas de temperatura (entre 10 °C y 45 °C), en medios con una elevada concentración de sales (6.5% de NaCl), pH básico (9.6) y es capaz de sobrevivir a 60 °C durante 30 min (Collins *et al.*, 1986; Collins *et al.*, 1991). Otra prueba bioquímica muy frecuente es la prueba de hidrólisis bilis-esculina que consiste en determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el glucósido esculina en presencia de bilis (Mac Faddin and Jean F, 2003). También se utiliza el crecimiento selectivo en diferentes medios, entre los cuales destacan el Chromoagar o el KAA. Todo esto sin olvidar su identificación mediante la observación de las características de las colonias y la morfología de las células, la tinción de Gram y la producción de catalasa y oxidasa (Abriouel *et al.*, 2005).

En taxonomía se han adoptado las siguientes reglas de nomenclatura y terminología para nombrar a las especies de este género. Cuando se refiere a un miembro confirmado del género *Enterococcus*, se

emplea el nombre binomial (p. ej., *E. faecalis*) o el equivalente incluso en el caso de una especie desconocida (*Enterococcus* sp. o spp.). Cuando se refiere a organismos que se identifican solo por aislamiento y caracterización del fenotipo correcto en medio selectivo diferencial, se emplea el término genérico "enterococos" (World Health Organization, 2003). Es de destacar que el sistema de clasificación temprana propuesto por Sherman en 1937, todavía se usa ocasionalmente para diferenciar especies de enterococos, así como para identificar enterococos entre sí basándose en reacciones frente al grupo D o, en algunos casos, al grupo Q de antisueros (Murray, 1990; Nowlan and Deibel, 1967).

Se han empleado varias técnicas de genotipado con este grupo para obtener una identificación correcta a nivel de especie y a nivel de subespecie para estudios clínicos, ambientales o relacionados con la transmisión en alimentos, como por ejemplo el ribotipado (Moore *et al.*, 2005), REP-PCR o BOX-PCR (Nayak *et al.*, 2011), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Gordillo *et al.*, 1993; Tenover *et al.*, 1997), secuenciación de genes del rRNA 16S (Nayak *et al.*, 2011) y tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007). La técnica de REP-PCR se ha utilizado para estudiar genéticamente secuencias repetitivas del genoma y, en función del

tamaño de este y la ubicación de estos elementos repetitivos, se pueden generar patrones de bandas únicos (o "huellas digitales") para diferenciar entre cepas. Con estas técnicas se pueden identificar aislamientos con un 77% más de acierto con respecto a la secuenciación genética 16S rRNA, aumentando la discriminación entre aislamientos ambientales por ejemplo (Nayak *et al.*, 2011).

1.2.2. *Genes de mantenimiento y MLST*

Para el estudio de la evolución de la resistencia, al igual que de su virulencia, es importante descender hasta las secuencias y estructuras de los genes que rodean a los genes de resistencia. Estos genes participan en la captura de genes de resistencia, su movilización y establecimiento en el cromosoma bacteriano y forman parte de los elementos de transferencia horizontal. Un grupo de genes que se utilizan para estos estudios son los genes de mantenimiento y dispersión, cruciales para la estabilidad de los genes de resistencia y su movilización (Vicente *et al.*, 2006).

Los genes de mantenimiento son genes expresados por la interacción de la ARN polimerasa y el promotor y que no necesitan ningún tipo de regulación adicional a la del propio proceso. Estos genes se encuentran en todas las células en general y a niveles de expresión

muy bajos y constantes dentro de un mismo organismo, esto hace que su secuencia esté muy conservada. Gracias a ello, podemos utilizar dichos genes de mantenimiento para diversos estudios de resistencia y virulencia, siendo muy útiles para estudios de clasificación taxonómica de los diferentes organismos.

Una técnica muy usada para la clasificación taxonómica es la tipificación multilocus de secuencias, también conocida como MLST (MultiLocus Sequence Typing). Esta técnica se basa en la amplificación mediante PCR de fragmentos internos de varios genes de mantenimiento, siete en concreto. Se utilizan fragmentos internos de cada gen de entre 430 y 600 pares de bases. A esta PCR, le sigue la secuenciación de ADN de los productos de PCR, de manera que se estudian los diferentes alelos obtenidos de cada fragmento de cada gen enfrentándolos con todos los posibles alelos en una base de datos y se construye un perfil alélico del organismo, mediante el cual se puede realizar un rastreo en diferentes bases de datos obteniendo su clasificación taxonómica.

1.3. Patogenicidad del género *Enterococcus*

En general, los enterococos son bacterias comensales, que ayudan en el proceso de digestión y otras vías metabólicas intestinales. Algunos

enterococos como *E. faecium* y *E. faecalis*, se usan como probióticos para tratar la diarrea y mejorar la inmunidad del huésped (Franz *et al.*, 2011). Por regla general, los enterococos no producen enfermedades concretas en su hábitat natural, el intestino, pero en algunos casos la relación de comensal que se establece con el hospedador se rompe y produce un cuadro clínico (Jett *et al.*, 1994). De esta forma, mientras la mayoría de las especies de *Enterococcus* son organismos comensales, algunas especies son patógenas oportunistas en humanos. *E. faecalis* y *E. faecium* se han convertido en agentes etiológicos particularmente importantes de infecciones nosocomiales (Morrison *et al.*, 1997; Moellering, 1992), incluidas infecciones del tracto urinario, endocarditis, bacteriemia, infecciones neonatales, infecciones del sistema nervioso central (SNC) e infecciones abdominales y pélvicas (Moellering, 1992; Murray, 1990). Es por ello que este género bacteriano se ha convertido en la tercera causa más común de bacteriemia, infecciones quirúrgicas (siendo el género más citado bibliográficamente), infecciones en unidades de cuidados intensivos y se ha catalogado como la segunda causa de infecciones de tipo nosocomial en Estados Unidos (Poeta *et al.*, 2008), aumentando así, la mortalidad de los pacientes que se ven afectados por ellas.

1.3.1. Factores de virulencia en Enterococcus

La patogenicidad o capacidad de un microorganismo para producir una enfermedad se debe a los factores de virulencia que éste posea (Michanie, 2004). Los factores de virulencia son moléculas codificadas por el material genético del patógeno que favorecen su proliferación y aumentan su capacidad de infección en el hospedador. Estos factores se encuentran codificados por el genoma del microorganismo, pero también hay que tener en cuenta que la mayoría de bacterias poseen plásmidos además del propio genoma, que pueden ser los responsables de la codificación de estos factores de virulencia. Los plásmidos son fragmentos de ADN extracromosómico, normalmente circular aunque también se encuentran plásmidos lineales, presentes en el citoplasma de la bacteria y cuyo procesamiento (entendiéndose por éste replicación y transcripción) es independiente del ADN cromosómico. Una célula puede tener desde un plásmido hasta varios centenares. Estos plásmidos contienen algunos genes y pueden pasar de una bacteria a otra mediante transferencia por conjugación. En algunos casos codifican propiedades esenciales para la bacteria en cuestión como las principales características que determinan su patogenicidad. En algunas bacterias patógenas, todas estas características de

patogenicidad están codificadas en plásmidos (Huguet, J. *et al.*, 2002).

Los enterococos pueden tener diferentes genes que contribuyen directa o indirectamente a la virulencia (Eaton and Gasson, 2001; Franz *et al.*, 1999, 2001, 2003; Kayser, 2003). También pueden adquirir múltiples resistencias, gracias a los diferentes mecanismos de intercambio de ADN que puedan tener (como transferencia de plásmidos por conjugación, transposones y secuencias de inserción). Esto ha hecho que exista una preocupación por los riesgos de propagación de cepas potencialmente virulentas y sus resistencias a antibióticos (Franz *et al.*, 2003).

Concretamente, la especie *Enterococcus faecalis* muestra una plasticidad genética característica que le favorece habitar en diversos nichos ecológicos gracias a la supresión y/o expresión de genes determinados (Fisher *et al.*, 2009). Esta especie sintetiza un grupo de péptidos muy heterogéneos con actividad antibacteriana, considerados dentro de las bacteriocinas, también denominadas enterocinas, y que muestran un papel importante como agentes de defensa, haciéndolo virulento (Franz *et al.*, 2007). Por otro lado, la presencia de estos péptidos con actividad bactericida podrían dotar a

estas bacterias con un arma evolutiva adicional para sobrevivir en lugares o zonas colonizadas previamente por otros microorganismos competidores, ya sea por espacio como por los propios nutrientes, a los que puede de esta manera eliminarlos del ambiente. Es por ello, que podemos considerar la aportación que puede hacer el plásmido portador del gen de producción de enterocina, entre otras, como un factor de virulencia. Se sospecha que estos péptidos bactericidas podrían formar parte de las etapas iniciales de la infección en el hospedador, ya que producen una acción letal sobre la propia microbiota comensal con la que compiten para establecerse (Padilla *et al.*, 2006).

El conocimiento de la virulencia de los enterococos está incompleto debido a que son comensales normales del tracto gastrointestinal humano y tienen ciertos rasgos de virulencia que no se identifican fácilmente. Los enterococos son conocidos por su capacidad para intercambiar información genética por conjugación y este proceso tiene lugar en el tracto gastrointestinal (Eaton and Gasson, 2001). Los factores de virulencia estudiados en el presente trabajo son *agg* (proteína de agregación), *cob* (feromona sexual), *efaAfm* (adhesina), *efaAfs* (adhesina), *cpd* (feromona sexual), *ccf* (feromona sexual), *cyIM* (modificación de la hemolisina), *cyIA* (activación de la hemolisina),

cytB (transporte de la hemolisina), *esp* (proteína asociada a la pared celular), *gelE* (enzima gelatinasa).

El factor de virulencia *agg* es una proteína de agregación codificada por un gen que recibe el mismo nombre. Concretamente es una proteína de superficie que favorece la agregación de otras bacterias, facilitando así la transferencia de plásmidos que contienen tanto genes de virulencia como genes de resistencia a los antibióticos (Clewell, 1993). También facilita la adherencia de los enterococos tanto a células epiteliales como a intestinales. Además contribuye a evadir las defensas inmunológicas del individuo (Tendolkar *et al.*, 2004). El gen que codifica esta proteína está inserto en un plásmido inducible por feromonas. Su expresión aumenta la capacidad invasiva de las cepas patógenas pero, por el contrario, incrementa también las propiedades beneficiosas de cepas probióticas (Jacobsen *et al.* 1999; Marguet *et al.*, 2008). Los genes *efaAfm* y *efaAfs* codifican la síntesis de adhesinas, es decir, favorecen la adherencia de la bacteria tanto a superficies bióticas como abióticas. También participa en determinados momentos en la formación de biofilms (Padilla *et al.*, 2012) y están relacionadas con la endocarditis enterocócica (Singh *et al.*, 1998). El gen *cpd* es una feromona sexual que en determinadas condiciones induce la transferencia de plásmidos por un mecanismo

mediado por feromonas (Marguet *et al.*, 2008). Tanto el factor de virulencia *cob* como el *ccf* son feromonas sexuales quimiotácticas para leucocitos humanos. Además, facilitan la transferencia de plásmidos por conjugación (Eaton and Gasson, 2001; Quiñones, 2010). La expresión de la citolisina hemolisina está codificada por un operón formado por 8 genes, tres de los cuales son *cyIM*, *cyIA* y *cyIB* que codifican proteínas involucradas en la modificación post-transcripcional de cada subunidad, la secreción de los péptidos, la activación extracelular y además producir inmunidad frente a la propia toxina (Rojas, 2014). De manera que, *cyIM* modifica el producto obtenido del precursor de hemolisina, *cyIB* procesa el producto modificado por *cyIM* y lo transporta y *cyIA* activa la hemolisina. El gen *esp* codifica una proteína de superficie extracelular que promueve la adhesión, colonización y evasión del sistema inmune. También participa en la generación de biopelículas y aparentemente cumple un rol en la resistencia antimicrobiana (Padilla *et al.*, 2012). El gen *gel E* codifica una enzima gelatinasa, la cual, degradando la gelatina, promueve la adhesión, colonización y evasión del sistema inmune, promoviendo la llegada de neutrófilos a los tejidos colonizados por el microorganismo, modificando así la defensa del hospedador e induciendo la ausencia o acumulación de leucocitos en los tejidos colonizados (Garza-Velasco *et al.*, 2002).

También participa en la generación de biopelículas y aparentemente tiene importancia en la resistencia antimicrobiana (Padilla *et al.*, 2012).

1.3.2. Resistencia a antibióticos

De particular preocupación en salud pública es la resistencia intrínseca a los antibióticos. Es uno de los problemas más preocupantes en el género *Enterococcus* dada su gran resistencia adquirida a una amplia y variada gama de antibióticos unido a una elevada resistencia intrínseca (Sofianou *et al.*, 2004). Por otro lado, su patogenicidad se ha incrementado con el curso de los años (Elsner *et al.*, 2000). Ciertas especies presentan resistencia particularmente a los aminoglucósidos y cefalosporinas, o resistencia adquirida a muchos otros antibióticos, la mayoría derivados de la vancomicina (Morrison *et al.*, 1997; Tendolkar *et al.*, 2003).

Mientras *E. faecalis* es la especie más comúnmente implicada en infecciones nosocomiales, *E. faecium* ha demostrado mayor resistencia a más amplia gama de antibióticos (Tendolkar *et al.*, 2003; Morrison *et al.*, 1997) y *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans* y *E. gallinarum* se han aislado de pacientes diagnosticados con infecciones por enterococos (Murray, 1990).

La investigación y el estudio sobre diferentes factores de patogenicidad de *Enterococcus* han favorecido la determinación de diferentes tipos de vías que están implicadas en la virulencia de este microorganismo y que pueden aportar nuevos conocimientos a su biología patógena. En diferentes laboratorios a nivel mundial se ha estudiado la expresión de factores genéticos implicados en la patogenicidad de *Enterococcus* con la idea de dar a conocer su biología y poder llegar a entender su capacidad de infección en diferentes tipos de tejidos del hospedador (Fisher *et al.*, 2009; Poeta *et al.*, 2008). Hasta ahora, no se conoce exactamente el grado de implicación genética en la patogenia de esta especie y su capacidad de infección en hospitales, por lo que, es de interés vital el poder cuantificar la presencia de genes considerados como factores de virulencia tanto en las cepas comensales como en las clínicas y establecer el papel real que puedan jugar en la epidemiología de las enfermedades producidas por este género.

1.4. Respuestas al estrés ambiental

Estas bacterias se caracterizan por ser muy resistentes a condiciones hostiles, a esto se debe su potencial para colonizar hábitats tan diferentes. Esto es aprovechado en el laboratorio para su propia

identificación mediante diferentes pruebas bioquímicas basadas en la versatilidad de estos microorganismos. Cuando se liberan enterococos del tracto gastrointestinal a hábitats secundarios como el medio ambiente o aguas, vegetación acuática o sedimentos, estos están sometidos a una gran cantidad de estresantes bióticos y abióticos que generalmente conducen a una disminución de la población con el tiempo.

1.4.1. Radiación UV y luz solar

La luz del sol ha sido considerada como un posible factor estresante de bacterias desde al menos 1877 (Downes and Blunt, 1877). Los principales mecanismos de daño celular por luz solar en los microorganismos son la absorción directa de UV por su ADN produciendo mutaciones o el efecto indirecto de la formación de reactivos de oxígeno endógeno y exógeno.

El efecto de la luz como estresante fue estudiada en profundidad en 1929 (Gates, 1929), lo que condujo a estudios del mecanismo del daño del ADN por UV para la inactivación microbiana (Brandt and Giese, 1956; Dulbecco, 1950; Kelner, 1950). Muchos estudios han probado el efecto germicida (definido como una pérdida de capacidad de crecimiento) de la luz solar en enterococos (Sinton *et*

al., 2002, 1999, 1994). Sin embargo, el tiempo requerido para lograr una reducción del 90% en la concentración de enterococos viables (equivalente a una reducción de 1 log) varía ampliamente según la ubicación geográfica y factores estacionales, así como el diseño experimental (por ejemplo, la fuente del inóculo o propiedades fisicoquímicas del agua).

Por ejemplo, en aguas marinas y estuarinas inoculadas con aguas residuales con carga de enterococos, los valores del número de células varían de 2 h (Fujioka *et al.*, 1981) a 35 h (Kay *et al.*, 2005). En general, los estudios de enterococos de aguas salinas realizados en climas más cálidos, durante los meses de verano, y en aguas con turbidez relativamente baja demostró valores de células más bajos (muerte más rápida) que los encontrados para climas más fríos, en meses de invierno, y en aguas turbias (Kay *et al.*, 2005). Se observó una tendencia similar en agua dulce.

1.4.2. Concentración de sales en el medio

La capacidad de los enterococos de crecer en presencia de sal (6.5% NaCl) es una de las características distintivas del género. La mayor tolerancia a la concentración elevada de sal que presenta el género de los enterococos en comparación con la de los coliformes fecales

como *Escherichia coli*, probablemente contribuye a su mayor empleo como bioindicadores del riesgo para la salud humana en aguas que los miembros del grupo de los coliformes. Muchos estudios de campo (Viau *et al.*, 2011; Carr *et al.*, 2010; Dorsey *et al.*, 2010) demuestran una relación inversa entre la salinidad y la detección/supervivencia de enterococos. Un estudio realizado en corrientes marinas hawaianas influenciadas por la marea (rango de salinidad de 0.60 ‰ a 37.3 ‰) encontró una relación negativa entre las concentraciones de enterococos viables y parámetros fisicoquímicos del agua tales como la temperatura, salinidad y contenido de oxígeno disuelto (Viau *et al.*, 2011). Hallazgos muy similares a estos se encontraron para aguas costeras del río Mississippi (rango de salinidad de 0.00 ‰ a 26.4 ‰) así como para una marisma en California (rango de salinidad de 29,4 ‰ a 30,5 ‰) (Carr *et al.*, 2010; Dorsey *et al.*, 2010).

1.4.3. Desinfección

El tratamiento de las aguas residuales es una buena barrera para evitar la contaminación con patógenos de las aguas reutilizables. Las capacidades de los microorganismos para sobrevivir a la desinfección, varía tanto con el tipo de organismo como con el tipo de método de desinfección empleado. Aunque los coliformes fecales o coliformes totales son generalmente utilizados para evaluar la eficacia de la

desinfección de aguas (Harwood *et al.* 2005), algunos estudios sugieren que la supervivencia de los enterococos frente a la desinfección les hacen mejores indicadores de resistencia viral, por ejemplo, que los coliformes (De Luca *et al.*, 2008; Zanetti *et al.*, 2007), debido a que un tratamiento inadecuado de las aguas residuales puede permitir la proliferación tanto de estos enterococos, como a su vez, de otros patógenos, pudiendo pasar a las aguas ambientales. Esta respuesta pues, de los enterococos a los métodos de desinfección, pondrían en duda dichos métodos (Byappanahalli *et al.*, 2012).

La estrategia de desinfección más común en países desarrollados es la utilización de cloro (o derivados de cloro como las cloraminas) seguido de un tratamiento por irradiación con luz UV. En un estudio que evalúa la eficacia de la desinfección con cloro empleando varias concentraciones (de 11.8 mg / litro a 23.2 mg / litro, en forma de hipoclorito de sodio) para filtrar el efluente de aguas residuales esterilizadas, las concentraciones de enterococos disminuyeron en más de 5 logs después de 15 minutos de tratamiento (Berg *et al.*, 1978).

Se observaron resultados similares a los de Berg en un estudio casi 3 décadas después, cuando se comparó el uso de concentraciones de hipoclorito de sodio de 8.0 a 30.0 mg / litro, que fueron añadidas al efluente del tratamiento primario de aguas residuales junto con cultivos puros de organismos seleccionados (incluido *E. faecalis*) (Tree *et al.*, 2003). En ambos estudios, los enterococos mostraron una disminución rápida de células cultivables mostrando aproximadamente cinco logs de descenso después de 5 a 15 minutos de contacto con el derivado de cloro, dependiendo de la concentración de este (Tree *et al.*, 2003). Los resultados se extrapolaron a un escenario realista para observar la aplicabilidad, donde las concentraciones de enterococos en las aguas residuales influente y efluente desinfectadas se compararon durante seis tandas de recuperación de aguas residuales (cinco de las cuales utilizaron desinfección con cloro) (Harwood, 2005).

II. ACEITE DE OLIVA Y MICROBIOTA INTESTINAL

1.5. Dieta mediterránea

La dieta alude al conjunto, cantidad y mezcla de los alimentos que se consumen diariamente. De manera cotidiana, y en el caso de los humanos, la dieta se asocia erróneamente a la práctica de restringir la ingesta de comida o ingerir unos determinados tipos de alimentos para obtener sólo los nutrientes y energía necesarios y así, conseguir o mantener cierto peso corporal.

Una dieta equilibrada es el conjunto de sustancias que se ingieren como alimento habitualmente y que nos permiten mantener un estado de salud adecuado y nos aportan la cantidad de energía suficiente para soportar el gasto energético requerido diariamente. Esta dieta equilibrada debe de estar constituida por los macronutrientes principales como son los hidratos de carbono (incluyendo la fibra), la grasa y las proteínas en unas proporciones adecuadas. Las proporciones diarias establecidas para la población española son de un 50-60% de hidratos de carbono, un 10-12% de proteínas y un 30-35% de grasas (Mataix-Verdú *et al.*, 2009), las cuales, deben de estar repartidas entre las distintas ingestiones

diarias de la siguiente manera: del 15-20% en el desayuno, del 35-40% en la comida, el 10% en la merienda y del 15-20% en la cena.

Una de las dietas equilibradas por excelencia es la dieta mediterránea que se caracteriza por la abundancia de alimentos vegetales como pan, pasta, arroz, verduras, hortalizas, legumbres, frutas y frutos secos; un consumo moderado de pescado destacando el pescado azul, mariscos, aves de corral y productos lácteos (yogurt y quesos) y huevos; el consumo de pequeñas cantidades de carnes rojas y vino y, sobre todo, se caracteriza por el empleo de aceite de oliva como fuente principal de grasa (Mataix-Verdú *et al.*, 2009).

La grasa de la dieta juega un papel fundamental tanto en la alimentación como en la composición del organismo humano. Posee múltiples funciones como función energética, transporte de vitaminas liposolubles, síntesis de compuestos de gran importancia biológica como hormonas esteroideas, ácidos biliares o vitaminas. Además, la presencia de grasas en los alimentos les aporta palatabilidad otorgándole sus características organolépticas características.

Con el término general “grasa” se hace referencia a las grasas sólidas y con “aceite”, a las grasas líquidas a temperatura ambiente. Otra clasificación es la que se hace en función de su origen,

distinguiéndose entre vegetales, como aceite de oliva o girasol, y animales, como la mantequilla. Las grasas de origen animal son ricas en ácidos grasos saturados.

i. Aceite de oliva virgen extra

El aceite de oliva virgen extra es el de máxima calidad. Se obtiene directamente de aceitunas y sólo mediante procedimientos mecánicos. Su grado de acidez no puede exceder los 0.8º expresado en porcentaje de ácido oleico y su puntuación organoléptica dada por un panel de cata cualificado debe de ser igual o superior a 6.5 puntos.

ii. Aceite de oliva virgen

El aceite de oliva virgen sigue los mismos parámetros que el aceite de oliva virgen extra en cuanto a los métodos de obtención. La diferencia es que el umbral de acidez es más alto, no pudiendo superar los 2º de acidez y que la puntuación obtenida por un panel de cata cualificado debe de ser igual o superior a 5.5 puntos.

iii. Aceite de oliva refinado

El aceite de oliva es una mezcla de aceites de oliva refinados y aceite de oliva virgen. Los aceites de oliva refinados son obtenidos a partir de aceites defectuosos o “lampantes” (que no han alcanzado los

parámetros de calidad) que son refinados mediante procesos químicos y térmicos. Estos aceites refinados se mezclan con un pequeño porcentaje de aceite de oliva virgen (entre un 10-20%). Dependiendo del porcentaje de aceite de oliva virgen que contengan, obtenemos la clasificación de aceite de oliva suave (si el porcentaje de aceite de oliva virgen es bajo) y aceite de oliva intenso (si el porcentaje de aceite de oliva virgen es alto). El grado de acidez no puede superar los 1.5º (Datos del reglamento CE 1019/2002).

iv. Mantequilla

La mantequilla es la emulsión de agua en grasa, obtenida como resultado del desuero, lavado y amasado de los conglomerados de glóbulos grasos que se forman por el batido de la nata de leche y que es apta para el consumo, con o sin maduración biológica producida por bacterias específicas. Se trata de un alimento muy rico en grasas saturadas, colesterol y calorías. No debe de confundirse con la manteca vegetal, como la margarina, que es aceite vegetal sometido a un proceso de hidrogenización, provocando un alto contenido de ácidos grasos *trans*.

1.6. Aceite de oliva y microbiota intestinal

La popularidad de la dieta mediterránea está aumentando en los últimos años, tanto por sus características organolépticas como por los conocidos beneficios que aporta a nuestra salud. El principal componente, y más importante, de la dieta mediterránea es el aceite de oliva. Cada vez se conocen más estudios acerca de los beneficios que aporta el consumo de aceite de oliva como grasa principal de la dieta para la salud, ya que se ha relacionado con una disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y en la hipertensión (Williams, Fortmann y Terry, 1987), así como con un posible rol en la modulación de funciones cognitivas (Segarra *et al.*, 2011). Además, la dieta mediterránea caracterizada por el consumo de aceite de oliva como principal fuente de grasa combinado con un alto consumo de vegetales, frutas, legumbres, frutos secos y cereales, también se ha asociado con efectos positivos como la mejora de la salud cardiovascular, la reducción de la disminución cognitiva y un menor riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Ye *et al.*, 2013).

Durante los últimos años, ha habido numerosos estudios sobre el efecto de la dieta en la composición de la microbiota intestinal, definiendo diferentes enterotipos dependiendo de la dieta (Arumugam *et al.*, 2011) e incluso proponiendo un modelo

matemático que nos permita predecir la microbiota intestinal dependiendo de esta variable (Faith *et al.*, 2011). De esta manera, el efecto de la dieta sobre los taxones prevalentes en la microbiota intestinal y la posible influencia de un desequilibrio microbiano o disbiosis en la fisiología animal (Albenberg and Wu, 2014) han sido ampliamente reconocidos. Así, la microbiota intestinal tiene un papel esencial en la homeostasis del huésped, puesto que una ecología microbiana del intestino que esté alterada puede conducir a numerosos trastornos de diferentes tipos, no solo digestivos sino también metabólicos y cognitivos a través del eje intestino-cerebro (Prieto *et al.*, 2017). Por lo tanto, el estudio de la microbiota se ha convertido en un factor importante a ser considerado, ya que, si tenemos en cuenta que la microbiota intestinal está compuesta por un gran número de taxones con complejas relaciones ecológicas entre ellos y metabólicas con el huésped, tiene sentido pensar que los cambios en la microbiota podrían tener un efecto concomitante en el organismo del huésped (Sunkara *et al.*, 2018).

Si consideramos el intestino grueso como una especie de fermentador, parece razonable considerar que los alimentos y el tipo de dieta pueden ser el principal o uno de los principales factores que ejercen un efecto sobre la microbiota que prospera en su interior. Por lo tanto, cuando esta dieta produce ciertas consecuencias en el

organismo, no es ilógico considerar que estas variaciones pudieran producirse, al menos en parte, gracias al metabolismo bacteriano, siendo este paso necesario para el resultado fisiológico. Este supuesto es especialmente racional cuando las correlaciones entre los rasgos biológicos y la presencia bacteriana son estadísticamente significativas y, por lo tanto, se establece matemáticamente que este vínculo pueda de hecho ocurrir. Sin embargo, correlación no es necesariamente causalidad y las dos variables pueden cambiar concomitantemente por diferentes razones. Es decir, una variable ciertamente puede afectar a la otra y viceversa o, podría simplemente suceder que ambas estén igualmente afectadas por la dieta en cuestión, sin interacción alguna “causa-efecto” entre los taxones microbianos y la variable fisiológica (Martínez *et al.*, 2019).

Dentro de este campo de investigación, existe un marcado interés en dietas ricas en grasa debido a los efectos negativos que provocan en la salud, principalmente a través de su vínculo con el síndrome metabólico (Cani *et al.*, 2007). Varios estudios han informado que las dietas altas en grasa alteran la microbiota intestinal en ratones (Cani *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012; Neyrinck *et al.*, 2013) y, parece ser que estas alteraciones están relacionadas con algunos de los trastornos vinculados con el síndrome metabólico (Cani *et al.*, 2007; Le Roy *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010). La mayoría de estos estudios han

detectado cambios significativos en la microbiota intestinal debido al efecto de dietas ricas en grasas, pero estos estudios se basan principalmente o bien en grasas saturadas, o bien no diferencian entre tipos de grasa saturada/insaturada.

La microbiota intestinal tiene un papel muy importante en el desarrollo del síndrome metabólico y, a su vez, la microbiota intestinal, como ya hemos comentado anteriormente, se ve muy influenciada por el tipo de grasa predominante en la dieta. Hay evidencias crecientes que sugieren que el patrón de microbiota intestinal afecta al equilibrio energético del cuerpo (Ley *et al.*, 2006) lo que conduce significativamente al desarrollo de obesidad, inflamación asociada a la obesidad y resistencia a la insulina, todos ellos factores implicados en el desarrollo de síndrome metabólico (Shen *et al.*, 2013; Fava *et al.*, 2013; Le Roy *et al.*, 2013). Comparando dietas enriquecidas en ácidos grasos saturados con dietas con un alto porcentaje de grasas insaturadas, los ácidos grasos insaturados (es decir, el aceite de oliva) se han asociado con un menor efecto estimulante sobre el aumento de peso y la acumulación de lípidos hepáticos. Estos efectos se relacionan observando los cambios inducidos por la dieta en la microbiota intestinal (Prieto *et al.*, 2018; de Wit *et al.*, 2012). Existe un acuerdo general sobre la relación del consumo de aceite de oliva virgen en la dieta con una menor

incidencia del síndrome metabólico (Martínez-González and Martínez-Calvo, 2013). Estas propiedades beneficiosas se han atribuido a la materia insaponificable, principalmente al contenido de polifenoles (Prieto *et al.*, 2018; Grossi *et al.*, 2013).

A pesar de las evidencias que se aportan entre el vínculo que existe entre aceite de oliva virgen, microbiota intestinal y los diferentes factores que constituyen el síndrome metabólico, esto no había sido demostrado científicamente. Estudios recientes revelan que una dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra (AOVE) tiene un efecto distintivo en el microbioma intestinal en comparación con una dieta de mantequilla, y este efecto, está relacionado con los beneficios fisiológicos ejercidos por el AOVE (Prieto *et al.*, 2018; Hidalgo *et al.*, 2018). En uno de estos estudios, se reveló que entre las principales diferencias significativas que se pueden apreciar entre dos grupos de ratones alimentados con dietas ricas en AOVE y mantequilla están algunos valores fisiológicos, como la alteración de la presión arterial.

El estudio de la regulación de la presión arterial ha sido ampliamente analizado pero están surgiendo nuevos aspectos para su control continuamente, siendo los factores dietéticos de actual interés debido a su posible uso en estrategias terapéuticas para el

tratamiento de la hipertensión (Prieto *et al.*, 2018). Relacionando estos dos parámetros (grasa de la dieta y microbiota intestinal) en un estudio de tres grupos de ratones alimentados con dietas uno de mantequilla, otro de AOVE y un tercero con dieta estándar, se concluyó que el grupo de mantequilla obtuvo los valores más altos de presión arterial sistólica padeciendo una hipertensión que correlacionaba con un porcentaje mayor de *Desulfovibrio* en la microbiota intestinal, mientras que el grupo alimentado con AOVE, tenía unos valores de insulina plasmática más bajos correlacionado inversamente con la población de *Desulfovibrio* presente en su microbiota intestinal (Fig. 1). Esta familia bacteriana también correlacionaba con parámetros como el colesterol total (Prieto *et al.*, 2018). Además, los resultados del grupo alimentado con AOVE, sugirieron un aumento de la diversidad microbiana intestinal, resultados que conectan con los niveles bajos de presión arterial sistólica observados en estos animales al final del periodo de alimentación con estas dietas. Estos resultados son indicativos del vínculo que es probable que exista entre las dietas, ciertos parámetros fisiológicos y la prevalencia de un grupo taxonómico u otro como componentes de la microbiota intestinal apoyando la posibilidad de que alguno de los efectos propuestos para el AOVE

podría ser producido a través de la modulación de la microbiota intestinal (Prieto *et al.*, 2018).

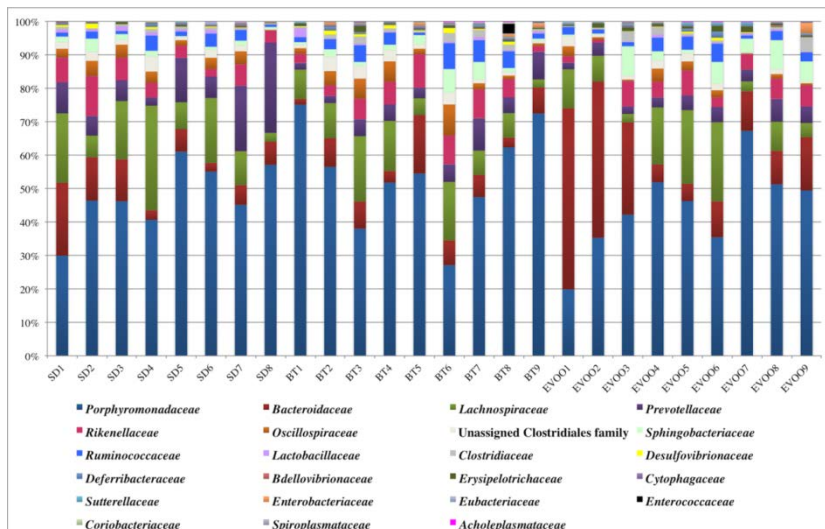


Fig. 1. Distribución de familias bacterianas como porcentaje del total de secuencias recuperadas de muestras fecales. Cada columna corresponde a un animal alimentado con una dieta enriquecida con mantequilla (BT), aceite de oliva virgen (EVOO) o pienso estándar (SD). La leyenda muestra, de izquierda a derecha y hacia abajo, el código de color de las 23 familias más prominentes (Prieto *et al.*, 2018).

De esta manera, queda demostrado la clara influencia beneficiosa del AOVE en la microbiota intestinal, en comparación con otras grasas, y sus beneficios para la salud.

En estos estudios siempre se utiliza el AOVE como grasa insaturada de la dieta, sin embargo, gran parte de la población consume aceite

de oliva después de ser sometido a un proceso depurativo que no sólo afecta a sus características organolépticas suavizando su sabor, sino que también elimina polifenoles y otros componentes minoritarios imprescindibles para el aporte de estos beneficios.

El aceite de oliva virgen extra se extrae mediante procedimientos exclusivamente mecánicos, como ya hemos mencionado anteriormente, conteniendo cantidades relativamente altas de polifenoles y tocofenoles, sin embargo, si la acidez es demasiado alta o no supera los parámetros de calidad exigidos, se somete a un tratamiento químico para mejorarlo, obteniéndose el aceite de oliva refinado, el cual tiene la misma composición de ácidos grasos que el aceite de oliva virgen extra pero pierde la mayoría de los componentes minoritarios en el proceso, así como la palatabilidad y el bouquet (Ramírez-Tortosa *et al.*, 1999). Es por eso, que para comercializarlo, se le agrega un 10-15% de aceite de oliva virgen extra, obteniendo así el aceite de oliva.

La pérdida de la porción insaponificable es importante, ya que, podría cambiar algunas de las propiedades saludables atribuida al aceite de oliva virgen. Esta importancia se magnifica por el hecho de que la comercialización de aceite de oliva refinado es significativa ya que, según el Ministerio de Agricultura (MAPAMA, 2017), hubo 60% de consumo de esta grasa *versus* 40% de consumo de aceites de oliva

virgen y extra durante 2016 en España, principal productor de aceite de oliva y uno de los principales consumidores de esta grasa en el mundo. Además, los consumidores estadounidenses prefieren el aceite de oliva refinado a algunos aceites de oliva vírgenes, probablemente debido a su sabor más suave, según una investigación reciente (Vázquez-Araújo *et al.*, 2015).

A pesar de todos estos hechos, pocos estudios científicos se habían centrado en la influencia del aceite de oliva refinado en la salud (Pacheco *et al.*, 2006; Ramírez-Tortosa *et al.*, 1999) y ninguno de ellos había estudiado su efecto sobre la microbiota intestinal hasta la publicación de investigaciones en este sentido de nuestro grupo de investigación (Martínez *et al.*, 2019)

Este análisis realizado incluyendo el aceite de oliva refinado en el estudio anterior de grupos de ratones sometidos a diferentes dietas ricas en diferentes grasas (aceite de oliva virgen extra y mantequilla), mostró como resultados claras diferencias tanto en el perfil de la microbiota fecal como en varias variables fisiológicas relacionadas con el síndrome metabólico. Algunas de estas variables mantienen correlaciones estadísticamente significativas con los porcentajes de varios taxones que aumentaron en el grupo alimentado con una dieta rica en mantequilla pero no en el grupo de dieta rica en AOVE. El

grupo de aceite de oliva refinado se comportó de manera diferente al grupo de AOVE en la mitad de las familias con diferencias estadísticamente significativas entre las dietas, con niveles comparativos más altos en tres familias: *Desulfovibrionaceae*, *Spiroplasmataceae* y *Helicobacteraceae*, que se correlacionan con el colesterol total (Martínez *et al.*, 2019) como ya hemos mencionado anteriormente. Estos resultados son nuevamente indicativos de un vínculo entre dietas específicas, ciertos parámetros fisiológicos y la prevalencia de algunos taxones, pero también respaldan la posibilidad de que los polifenoles y los componentes menores del AOVE estén involucrados en algunos de los efectos propuestos para esta grasa a través de la modulación de la microbiota intestinal (Martínez *et al.*, 2019).

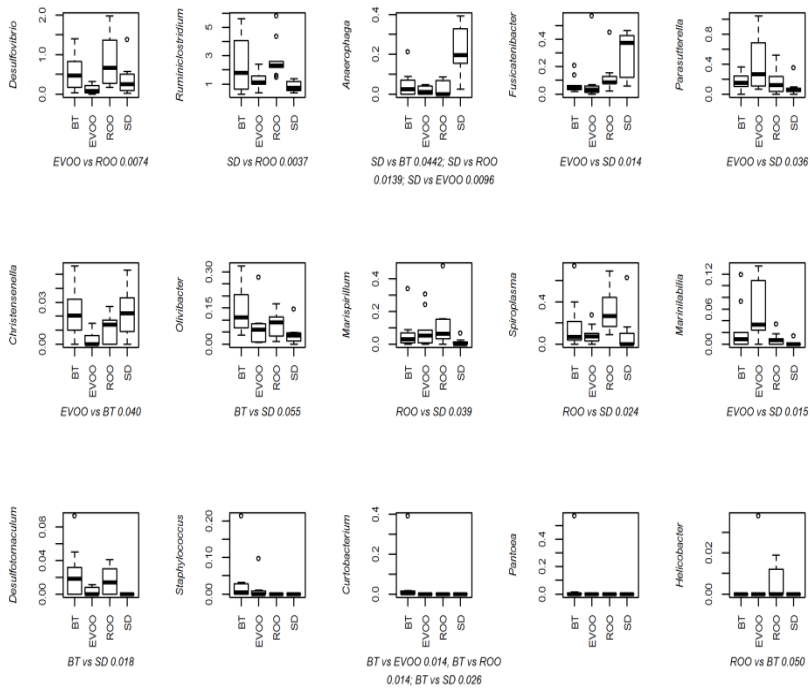


Fig. 2. Gráficos de cajas de presencia de los quince géneros con diferencias significativas ($p < 0.05$), en porcentaje de secuencias, después de la extracción de ADN de heces de ratones alimentados con las diferentes dietas. BT: dieta de mantequilla; EVOO: dieta de aceite de oliva virgen extra; ROO: dieta de aceite de oliva refinado; SD: pienso estándar. Valores de las dietas SD, EVOO y BT tomados de Prieto *et al.*, 2018. También se muestran comparaciones significativas por pares con valores de p ajustados (Martínez *et al.*, 2019).

Estos estudios presentados respaldan la evidencia de una relación entre dietas específicas, parámetros fisiológicos y algunos taxones

bacterianos. Además, al comparar dietas de AOVE y aceite de oliva refinado (AOR), el efecto de los polifenoles de aceite de oliva virgen se puso de manifiesto (Martínez *et al.*, 2019). Sin embargo, estas nuevas tecnologías solo pueden abordar taxones globales, sin proporcionar datos discriminatorios sobre cómo evolucionan las diferentes cepas de un determinado grupo bacteriano en respuesta a la dieta, a pesar de que este cambio a nivel de cepa es probablemente el primero en ocurrir en el intestino. Los microorganismos intestinales tienen que lidiar con la capacidad de autorregulación del sistema, con los alimentos disponibles y la competencia con otras bacterias por los recursos, y tendrán además que defenderse contra productos químicos o proteínas agresivas, todo lo cual dará lugar al desarrollo, por parte de muchos de estos grupos bacterianos, de estrategias y mecanismos de defensa. Entre estos mecanismos, podemos encontrar la expresión de factores de virulencia o la resistencia a los antibióticos. Estas armas defensivas afectarán inevitablemente al huésped, causando graves consecuencias clínicas.

Como ya se ha indicado anteriormente en esta misma sección, uno de los géneros mejor estudiados en este sentido es el género *Enterococcus*, en el que varios de estos factores son conocidos, por lo

que es un buen modelo de cómo ciertas dietas pueden proteger al huésped, promoviendo o no, el crecimiento de cepas con diferentes niveles de seguridad una vez que han llegado al intestino. Considerando el efecto antimicrobiano del aceite de oliva sobre los taxones bacterianos *in vitro* (Medina *et al.*, 2006) y, en un modelo murino (Martínez *et al.*, 2019), también es interesante evaluar su posible papel, cuando este aceite se incluye en la dieta, en la selección de las cepas que van a prosperar en el intestino del huésped.

En consecuencia, nuestro interés es abordar el nivel de seguridad de las cepas de enterococos aisladas de la microbiota intestinal mediante la evaluación de su resistencia a los antibióticos, factores de virulencia y la producción de aminos biógenas, así como en determinar en última instancia si hay diferencias estadísticamente significativas entre estos enterococos aislados de cuatro dietas diferentes.

Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar si hay diferencias entre las poblaciones de enterococos establecidas en el intestino tras el consumo de distintas dietas altas en diferentes tipos de grasa y si esta variación, afecta al estado tanto metabólico como endocrino del hospedador, explicando parte de los efectos beneficiosos del consumo de aceite de oliva virgen.

2.2. Objetivos específicos

1. Contribuir a establecer cómo influye una dieta rica en aceite de oliva virgen sobre la microbiota intestinal murina, en particular sobre el género *Enterococcus*, llevando a cabo estudios mediante índices estadísticos en los grupos de secuencias obtenidos por secuenciación masiva.
2. Construir colecciones de cepas aisladas a partir de las heces de ratones alimentados con diferentes dietas altas en grasa e identificar dichas cepas entre los diferentes OTUs (operational taxonomical units) obtenidos por secuenciación masiva.
3. Llevar a cabo una caracterización exhaustiva de la colección de cepas del género *Enterococcus* que permita identificarlas en la bibliografía científica o como de nueva descripción y que incluya al menos:

- Identificación taxonómica y genotipado de cepas
 - Estudio de la seguridad (sensibilidad a antibióticos, producción de aminas biógenas, presencia de factores de virulencia)
 - Producción de bacteriocinas
 - Comportamiento “*in vitro*” frente al aceite de oliva y sus polifenoles
4. Realizar un estudio proteómico de determinadas cepas de la colección que sean de un interés adicional.

Materiales y métodos

3.1. Aislamiento, mantenimiento y análisis bioquímico de las cepas a estudiar para la identificación de los enterococos.

3.1.1. Aislamiento de cepas

Las diferentes cepas de enterococos usadas en este estudio fueron aisladas de heces de distintos grupos de ratones sometidos a tres tipos diferentes de dietas altas en grasa (20%), enriquecidas respectivamente en mantequilla (BT), aceite de oliva refinado (ROO) y aceite de oliva virgen (EVOO), así como un grupo con dieta estándar (SD); y obtenidas a diferentes tiempos: Tiempo inicial (0 horas), tiempo intermedio (6 semanas) y tiempo final (12 semanas), algunas de ellas como parte de un estudio anterior (Hidalgo *et al.*, 2014) y otras en el marco del presente estudio.

Las cepas se aislaron en TSA (Scharlab) con 100 mg/L de polymixina B con objeto de seleccionar Gram positivos. Posteriormente se inocularon en TSB para que tras el crecimiento a 37°C durante 24 horas se pasaran a criotubos de glicerol para su conservación a -20°C.

Composición del Tryptic Soy Agar (TSA)	
Marca comercial: Scharlab	
Polisorbato 80	5 g/L
Histidina	1 g/L
Peptona de soja	5 g/L
Lecitina	0,7 g/L
Tiosulfato sódico	0,5 g/L
Peptona de caseína	15 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Agar	15 g/L
El TSB tendría la misma composición a excepción del agar	

De estos tubos, se inocularon 20 µl de cada cepa Gram positiva con morfología cocoidal en BHI (5 mL) y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Composición del Brain Heart Infusion (BHI)	
Marca comercial: Scharlab	
Infusión de cerebro y corazón sólidos	8 g/L
Digerido péptico de tejido animal	5 g/L
Digerido pancreático de caseína	16 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Glucosa	2 g/L
Fosfato disódico de hidrógeno	2,5 g/L
Agar	13,5 g/L
Ajustando el pH a 7,4 ± 0,2	

Posteriormente, se sembraron en medio selectivo KAA (Scharlab) para confirmar que se trataba de enterococos y que no había rastro de contaminación. Para ello, se confirmó el crecimiento de colonias grises con un halo negro tras 24-48 horas de incubación a 37°C. Todas las cepas que no cumplieron este requisito fueron descartadas. La siembra se realizó por el método de estrías por agotamiento para aislar colonias libres y observar dicha morfología y características.

Composición del Kanamycin A esculin Azide (KAA) Marca comercial: Scharlab	
Triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Citrato de sodio	1 g/L
Esculina	1 g/L
Citrato férrico amónico	0,5 g/L
Azida sódica	0,15 g/L
Sulfato de kanamicina	0,02 g/L
Agar	16 g/L

Una vez crecidas las cepas y confirmada su probable pertenencia al género *Enterococcus* por sus características de crecimiento, se realizó con ellas una colección que se conservó por duplicado mediante criopreservación con glicerol, a -20°C y a -80°C.

3.1.2. Pruebas bioquímicas

Utilizando técnicas de microbiología clásica, mediante pruebas bioquímicas, se procedió a la identificación de las cepas de interés que habían sido guardadas en criotubos a -20°C.

Las pruebas que se realizaron para su identificación fueron las siguientes:

1. Crecimiento en medio selectivo Chromagar para confirmar que no había habido contaminación durante el proceso de recuperación de las cepas. Las colonias tras ser incubadas a 37°C presentaron un color azul. Esto se considera positivo para *Enterococcus*.

Composición del Chromagar Marca comercial: Cultimed-Panreac	
Peptona	20 g/L
Extracto de levadura	20 g/L
Sales	25 g/L
Mezcla cromogénica	2,5 g/L
Agar	15 g/L

2. Crecimiento a temperatura de 10°C. *Enterococcus* crece bien a una temperatura baja de 10°C en BHI líquido. Aunque su

metabolismo se ralentiza, en 48 horas podemos observar crecimiento a esta temperatura. Crecimiento (turbidez en el medio) a 10°C se considera positivo para *Enterococcus*.

3. Crecimiento a temperatura de 40°C. *Enterococcus* crece bien a una temperatura extrema de 40°C en BHI líquido. Aunque su metabolismo se acelera drásticamente, en 16 horas podemos observar gran crecimiento a esta temperatura. Crecimiento (turbidez en el medio) a 40°C se considera positivo para *Enterococcus*.

4. Crecimiento en BHI saturado con 6.5% Cloruro sódico. *Enterococcus* crece bien en BHI líquido saturado con NaCl al 6.5%, no afectando a su metabolismo. En 24-48 horas podemos observar crecimiento en este estado. Crecimiento (turbidez en el medio) en BHI saturado con NaCl 6.5% se considera positivo para *Enterococcus*.

5. Crecimiento en BHI pH básico 9. *Enterococcus* crece bien en BHI líquido pH básico 9, no afectando a su metabolismo. En 24-48 horas podemos observar crecimiento en este estado. Crecimiento (turbidez en el medio) a pH básico 9 se considera positivo para *Enterococcus*.

6. Prueba de la catalasa. Ya que *Enterococcus* es una bacteria con morfología de coco y además es Gram positivo, es fácil de

confundir con otros géneros similares, tales como *Streptococcus* o *Staphylococcus*.

Aunque la disposición de las células es diferente para cada género, para evitar confusiones se realizó también la prueba de la catalasa, en la cual el género *Enterococcus* es negativo frente a *Staphylococcus* que es positivo. El procedimiento para dicha prueba es el siguiente:

- o Preparar un cultivo de la bacteria en medio sólido (BHA) inclinado de 24 horas de crecimiento (no más viejo).
- o Preparar un portaobjetos limpio y desengrasado.
- o Colocar una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10%.
- o Con el asa de siembra bien flameada, recoger masa bacteriana (3-4 colonias bien crecidas) y colocarlas sobre la gota de peróxido de hidrógeno.
- o Si se forman burbujas, es por acción de la enzima, siendo la muestra positiva.



Fig. 3. Imágenes de una prueba de catalasa. En la imagen superior se observa una reacción de catalasa positiva frente a una cepa de *Staphylococcus aureus*, mientras que en la imagen inferior se aprecia un detalle de un control negativo de una cepa de *Enterococcus faecalis*.

3.2. Siembra de las cepas seleccionadas y preparación para MLST

Para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los diferentes genes para el estudio de los alelos de *E. faecalis* por MLST, se puede usar de base ADN del microorganismo o podemos partir directamente de unos pocos microgramos de masa bacteriana sin lisar. En nuestro caso, hemos usado dicha masa bacteriana, a la cual se le han puesto los reactivos necesarios para amplificar cada

gen de los alelos. Para ello, sembramos las cepas seleccionadas y confirmadas como enterococos, en placas gruesas de TSA. La siembra se realizó por cruces, realizando cinco cruces por placa.

Las cepas se sembraron directamente desde los cultivos de BHI, excepto las que presentaban contaminación. En este caso, se picó una colonia del medio KAA para purificar el cultivo y eliminar posibles contaminaciones.

Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y, posteriormente, se mantuvieron en cámara fría hasta su uso.

3.3. Obtención del ADN de cada cepa de enterococos para el estudio genético de patogenicidad.

3.3.1. Extracción del ADN

Para obtener un pellet de células se cogió el cultivo de BHI (4 ml) crecido y se pusieron 1.5 mL de cada cepa en un tubo eppendorf previamente esterilizado y marcado con la nomenclatura de la cepa correspondiente. A continuación, se centrifugaron los tubos a 13.000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante obteniéndose un pequeño pellet de células precipitadas. Se volvió a repetir el proceso otra vez añadiendo otros 1.5 mL de BHI crecido con la cepa correspondiente en cada tubo eppendorf con el pellet anterior. Una

vez repetido el proceso de centrifugación, se obtuvo un pellet mayor en cantidad de células para obtener una concentración de ADN alta. Se secó el pellet, eliminando los restos de medio de cultivo BHI, invirtiendo el eppendorf sobre un papel de filtro absorbente y se congelaron los pellets a - 20°C con la finalidad de debilitar la pared celular. Posteriormente, pasadas 24 horas, se procedió a la extracción de ADN, para la cual se utilizó la técnica de extracción de ADN a partir de cultivo puro crecido en BHI (Fenol-cloroformo).

Protocolo de extracción de ADN a partir de cultivo puro (fenol-cloroformo)

Reactivos:

- Tampón de lisis: TELS (Tris, EDTA, Lisocima y Sacarosa)
(- 20º C)
- Mutanolisina (- 20º C)
- SDS 10%
- Fenol
- Cloroformo – Alcohol isoamílico (1:24) (4º C)
- Isopropanol (- 20º C)
- Etanol 70º (- 20º C)
- Tampón TE

Procedimiento:

- o Resuspender el pellet en 100 μL de tampón TES + 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de mutanolisina. Incubar 1 hora a 37^o C resuspendiendo cada 10 minutos.
- o Añadir 100 μL de SDS al 20% (comprobar que la muestra se torna transparente para verificar la correcta lisis).
- o Añadir 500 μL de fenol y 100 μL de cloroformo-alcohol isoamílico. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos. Separar las dos fases evitando coger las proteínas de la interfase (aparece como un anillo blanco). Repetir este proceso una vez más.
- o Añadir al ADN obtenido de la segunda centrifugación con fenol, 500 μL de cloroformo-alcohol isoamílico para realizar la última extracción. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
- o Pasar el sobrenadante (en el cual ya no se observa interfase) a un tubo que contenga 600 μL de isopropanol. Mezclar para la aparición de la hebra.
- o Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min.
- o Eliminar el sobrenadante. Añadir 600 μL de etanol 70^o e invertir para lavar el pellet.
- o Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min. Eliminar el etanol sin perder el pellet.

- o Secar invirtiendo el tubo sobre papel absorbente. Secar a 45º C durante 15 min.
- o Disolver en 40 µL de tampón TE y guardar a – 20º C. A veces también se puede añadir ARNasa.

3.3.2. Medición del ADN

Una vez extraído el ADN de las cepas a estudiar, se disolvió en TBE sin sales y se procedió a realizar la medición por NanoDrop para observar la concentración de ADN de partida, así como su pureza mediante la relación 260nm/280 nm de longitud de onda. El protocolo a seguir fue el siguiente:

- o Poner 1 µL de TBE en el lector del NanoDrop para hacer el blanco.
- o Limpiar el lector con 1 µL de agua destilada.
- o Poner 1 µL de la muestra que se desea medir.
- o Leer el resultado (concentración en ng/µl y pureza relación 260/280).

En base a la concentración obtenida, se procedió a su dilución en alícuotas a concentración de 10 ng/µL para el estudio de los genes de virulencia, patogenicidad y resistencia a antibióticos por PCR (concentración mínima necesaria).

3.3.3. Observación del ADN en un gel de agarosa al 1%

Tras la extracción del ADN, y de su medición de concentración y de pureza, se realizó un estudio del estado del ADN por visualización de la banda por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

- o Preparar un gel de agarosa al 1% con dos peines de 15 pocillos cada uno y dejar solidificar.
- o Montar la cubeta de electroforesis y la cuna con el gel y cubrir con tampón TBE para electroforesis.
- o Cargar 5-6 µl de producto de la extracción de ADN de cada muestra en cada pocillo del gel mezclado con tampón de carga (Azul con glicerol).
- o Correr con un campo eléctrico de voltaje 80, durante 30 minutos.
- o Revelar con Midori Green (Nippon Genetics Europe) bajo luz ultravioleta.

3.4. Estudio genético de patogenicidad: PCR de factores de virulencia y revelado

Una vez obtenido el ADN, y comprobado que no está degradado y a una concentración y pureza óptimos (por medición con Nanodrop y

observación en gel de agarosa), se realizaron PCR específicas para identificar diferentes genes de patogenicidad asociados a *Enterococcus* y se revelaron corriendo los productos en un gel de agarosa teñido con Midori Green, obteniendo así los resultados de presencia o no de estos genes en el genoma bacteriano.

Las secuencias génicas correspondientes a los factores de virulencia estudiados fueron los indicados en la tabla 1.

Tabla 1. Primers y productos de PCR para la detección de factores de virulencia (Eaton&Gasson, 2001)

GENE AND PRIMER	PRIMERS SEQUENCE	PCR PRODUCT (bp)
<i>agg</i>		
TE3	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1.553
TE4	AAACGGCAAGACAAGTAAATA	
<i>gelE</i>		
TE9	ACCCCGTATCATTGGTTT	419
TE10	ACGCATTGCTTTCCATC	
<i>cylM</i>		
TE13	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT	742
TE14	TGAGTTGGTCTGATTACATT	
<i>cylB</i>		
TE15	ATTCCTACCTATGTTCTGTTA	843
TE16	AATAAACTCTTCTTTCCAAC	
<i>cylA</i>		
TE17	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517
TE18	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	
<i>esp</i>		
TE34	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933
TE36	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	

<i>efaAfs</i>		
TE5	GACAGACCCTCACGAATA	705
TE6	AGTTCATCATGCTGTAGTA	
<i>efaAfm</i>		
TE37	AACAGATCCGCATGAATA	735
TE38	CATTCATCATCTGATAGTA	
<i>cpd</i>		
TE51	TGGTGGGTTATTTTCAATTC	782
TE52	TACGGCTCTGGCTTACTA	
<i>cob</i>		
TE49	AACATTGAGCAAAACAAAGC	1.405
TE50	TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	
<i>ccf</i>		
TE53	GGAATTGAGTAGTGAAGAAG	543
TE54	AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	

Esta tabla muestra el nombre de los genes que hemos estudiado, la secuencia de los primers en las dos direcciones (3' - 5' y 5' - 3'), así como el tamaño del amplicón.

Para la realización de la PCR se siguió el siguiente protocolo:

Reactivos (1x) para la reacción de PCR para la detección de factores de virulencia (Volumen final: 50 µL)	
ADN	2 µL (a concentración 10 ng/ µL)
Agua MQ	2,8 µL
Buffer	5 µL
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 25 mM	30 µL
Primer F1	2 µL
Primer R2	2 µL
dNTP's	6 µL

Taq polimerasa	0,2 µL
----------------	--------

Las condiciones de PCR fueron agrupadas por genes con idénticas condiciones de la siguiente forma: para el gen *agg*: desnaturalización inicial a 94°C 2 min, 55°C 2 min y 72°C 2 min; 29 ciclos a 94°C 15 s, 55°C 1 min y 72°C 2 min 30s; y una extensión de 72°C 2 min 30s. Para el gen *gelE*: desnaturalización inicial a 94°C 2 min, 51°C 2 min y 72°C 2 min; 29 ciclos a 94°C 15 s, 51°C 1 min y 72°C 30s; y una extensión de 72°C 1 min 30s. Para los genes *cpd*, *cylB* y *efaAfs*: desnaturalización inicial a 94°C 2 min, 53°C 2 min y 72°C 2 min; 29 ciclos a 94°C 15 s, 53°C 1 min y 72°C 47s; y una extensión de 72°C 1 min 30s. Para los genes *esp*, *cylA*, *cylM* y *efaAfm*: desnaturalización inicial a 94°C 2 min, 55°C 2 min y 72°C 2 min; 35 ciclos a 94°C 15 s, 55°C 1 min y 72°C 2 min; y una extensión de 72°C 5 min. Para el gen *cob*: desnaturalización inicial a 94°C 2 min, 51°C 2 min y 72°C 2 min; 30 ciclos a 94°C 15 s, 51°C 1 min y 72°C 1 min 30 s; y una extensión de 72°C 2 min 30 s. Para el gen *ccf*: desnaturalización inicial a 94°C 2 min, 57°C 2 min y 72°C 2 min; 30 ciclos a 94°C 15 s, 57°C 1 min y 72°C 35 s; y una extensión de 72°C 1 min 30 s.

Tras la PCR se reveló el producto para observar la presencia o ausencia del amplicón en gel de agarosa al 1.5 - 2%, dependiendo del

tamaño del amplicón, con Midori Green a 80V durante 40-45 min para observar en el transiluminador la banda correspondiente al gen.

3.5. Producción de aminos biógenas

El potencial para la generación de aminos biógenas se detectó mediante amplificación por PCR por duplicado de los genes de aminoácidos descarboxilasa *hdc* y *hdc2* (histidina descarboxilasa), *odc* (ornitina descarboxilasa) y *tdc* (tirosina descarboxilasa).

Las secuencias génicas correspondientes a los genes de aminoácidos descarboxilasa estudiados fueron los indicados en la tabla 2.

Tabla 2. Primers de PCR para la detección de aminos biógenas de *Enterococcus faecalis* (De las Rivas *et al.*, 2005; Martín-Platero *et al.*, 2009).

GEN Y PRIMERS	SECUENCIA DEL PRIMERS (5'-3')	PCR PRODUCT (pb)
<i>hdc</i>		
<i>hdc</i> -f	AGATGGTATTGTTTCTTATG	367
<i>hdc</i> -r	AGACCATACACCATAACCTT	
<i>hdc2</i>		
<i>hdc2</i> -f	AAYTCNTTYGAYTTYGARAARGARG	534
<i>hdc2</i> -r	ATNGGNGANCCDATCATYTTTGTGNC	
<i>odc</i>		
<i>odc</i> -f	GTNTTYAAYGCNGAYAARACNTAYTTYGT	1446
<i>odc</i> -r	ATNGARTTNAGTTCRCAYTTYTCNGG	
<i>tdc</i>		
<i>tdc</i> -f	GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCARG	924
<i>tdc</i> -r	CCRTARTCNGGNATAGCRAARTCNTRTG	

Esta tabla muestra el nombre de los genes que hemos estudiado, la secuencia de los primers en dirección 5'-3', así como el tamaño del amplicón obtenido.

Para la realización de la PCR se siguió el siguiente protocolo:

Reactivos (1x) para la reacción de PCR para la detección de aminas biógenas (Volumen final: 50µL)	
ADN	2 µL
Agua MQ	28,8 µL
Buffer	5 µL
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 25 mM	3 µL
Primer F1	2,5 µL
Primer R2	2,5 µL
dNTP's	6 µL
Taq polimerasa	0,2 µL

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: para el gen *hdc*: desnaturalización inicial a 94°C 1 min; 30 ciclos a 94°C 1 min, 55°C 1 min y 72°C 1 min; y una extensión de 72°C 1 min. Para el gen *hdc2*: desnaturalización inicial a 94°C 1 min; 30 ciclos a 94°C 1 min, 50°C 1 min y 72°C 1 min; y una extensión de 72°C 1 min. Para los genes *tdc* y *odc*: desnaturalización inicial a 94°C 1 min; 30 ciclos a 94°C 1 min, 52°C 1 min y 71°C 1 min; y una extensión de 71°C 1 min.

Tras la PCR se reveló el producto para observar la presencia o ausencia del amplicón en gel de agarosa al 1.5-2% con Midori Green a 80V durante 40-45 min para observar en el transiluminador la banda correspondiente al gen.

3.6. Resistencia a antibióticos en placa y PCR

3.6.1. Resistencia a antibióticos en placa

La susceptibilidad a los antibióticos de los aislados se determinó utilizando tiras ATB ENTEROC 5 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando como inóculo cultivos de medio BHI de las cepas estudiadas.

3.6.2. Resistencia a antibióticos mediante detección por PCR de genes implicados.

La resistencia a antibióticos de las cepas también fue estudiada por PCR para detectar la presencia de determinantes genéticos de resistencia. Los genes estudiados fueron: β -lactamasa de espectro extendido: *bla*-CTX –M, *bla*-CTX -M2 (Bertrand *et al.*, 2006), *bla*-PSE (Chiu *et al.*, 2006) y *bla*-TEM (Sáenz *et al.*, 2004); genes de resistencia a la tetraciclina de los grupos I (*TetB*, *TetC* y *TetD*) y II (*TetA*, *TetE* y *TetG*) (Guerra *et al.*, 2001; Sáenz *et al.*, 2004) y las bombas de exporte *acrB*, *mdfA* (Swick *et al.*, 2011) y *aadA1* (Guerra *et al.*, 2001).

Las secuencias génicas correspondientes a los genes implicados en resistencia a antibióticos estudiados fueron los indicados en la tabla 3.

Esta tabla muestra el nombre de los genes que hemos estudiado, la secuencia de los primers en dirección 5´-3´, así como el tamaño del amplicón obtenido.

Tabla 3. Primers de PCR para la detección de genes implicados en resistencia a antibióticos.

GEN Y PRIMERS	SECUENCIA DEL PRIMERS (5´-3´)	PCR PRODUCT (pb)
<i>bla-CTXM</i> bla-CTXM-f bla-CTXM-r	C(A/G)ATGTGCAG(C/T)ACCAAGTAACGC (A/G)ATATC(A/G)TTGGTGGTG	540
<i>bla-CTXM2</i> bla-CTXM2-f bla-CTXM2-r	ATGATGACTCAGAGCATTCG TCAGAAACCGTGGGTTAC	876
<i>bla-PSE</i> bla-PSE-f bla-PSE-r	GGCAATCACAACGATGATGCGT GGCTCAATACGGTCTAGACGAGT	156
<i>bla-TEM</i> bla-TEM-f bla-TEM-r	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC ACGCTCAGTGGAAACGAAAC	1150
<i>TetA</i> TetA-f TetA-r	GTAATTCTGAGCACTGTCGC CTGCCTGGACAACATTGCTT	937
<i>TetB</i> TetB-f TetB-r	CTCAGTATTCCAAGCCTTTG CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	416

<i>TetC</i>		
TetC-f	TCTAACAATGCGCTCATCGT	570
TetC-r	GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC	
<i>TetD</i>		
TetD-f	ATTACACTGCTGGACGCGAT	1104
TetD-r	CTGATCAGCAGACAGATTGC	
<i>TetE</i>		
TetE-f	GTGATGATGGCACTGGTCAT	1179
TetE-r	CTCTGCTGTACATCGCTCTT	
<i>TetG</i>		
TetG-f	AGCAGCCTCAACCATTGCCGAT	391
TetG-r	GGTGTTCCACTGAAAACGGTCCT	
<i>acrB</i>		
acrB-f	CTCTCAGGCAGCTTAGCCCTAA	107
acrB-r	TGCAGAGGTTCACTTTTGACTGTT	
<i>mdfA</i>		
mdfA-f	CATTGGCAGCGATCTCCTTT	103
mdfA-r	TTATAGTCACGACCGACTTCTTTCA	
<i>aad</i>		
aad-f	GTGGATGGCGGCCTG	282
aad-r	ATTGCCCAGTCGGCA	

Para la realización de la PCR se agruparon los genes que compartían las mismas condiciones y se siguieron los siguientes protocolos:

- o Protocolo para los genes *bla-CTX –M*, *bla-CTX -M2*, *bla-PSE* y *bla-TEM*:

Reactivos (1x) para la reacción de PCR para la detección de los genes <i>bla-CTX -M</i> , <i>bla-CTX -M2</i> , <i>bla-PSE</i> y <i>bla-TEM</i> implicados en resistencia a antibióticos (Volumen final: 50 µL)	
ADN	2 µL
Agua MQ	28,8 µL
Buffer	5 µL
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 25 mM	3 µL
Primer F1	2,5 µL
Primer R2	2,5 µL
dNTP's	6 µL
Taq polimerasa	0,2 µL

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 3 min; 35 ciclos a 94°C 30 segundos, 52°C 1 min y 72°C 1 min; y una extensión de 72°C 8 min.

Tras la PCR se reveló el producto para observar la presencia o ausencia del amplicón en gel de agarosa al 2% con Midori Green a 80V durante 40-45 min para observar en el transiluminador la banda correspondiente al gen.

- Protocolo para los genes de resistencia a la tetraciclina de los grupos I (*TetB*, *TetC* y *TetD*) y II (*TetA*, *TetE* y *TetG*):

Reactivos(1x) para la reacción de PCR para la detección de los genes resistencia a la tetraciclina de los grupos I (<i>TetB</i> , <i>TetC</i> y <i>TetD</i>) y II (<i>TetA</i> , <i>TetE</i> y <i>TetG</i>) implicados en resistencia a antibióticos (Volumen final: 50 µL)	
ADN	2 µL
Agua MQ	29,8µL
Buffer	5 µL
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 25 mM	3µL
Primer F1	2µL
Primer R2	2µL
dNTP's	6 µL
Taq polimerasa	0,2 µL

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 5 min; 35 ciclos a 94°C 1 min, 55°C 1 min y 72°C 1 min; y una extensión de 72°C 1 min 30 segundos.

Tras la PCR se reveló el producto para observar la presencia o ausencia del amplicón en gel de agarosa al 2% con Midori Green a 80V durante 40-45 min para observar en el transiluminador la banda correspondiente al gen.

- o Protocolo para los genes *acrB*, *addy* *mdfA*:

Reactivos(1x) para la reacción de PCR para la detección del genes <i>acrB</i> , <i>add</i> y <i>mdfA</i> implicados en resistencia a antibióticos (Volumen final: 50 µL)	
ADN	2 µL
Agua MQ	31µL
Buffer	5 µL
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 100mM	0,75µL
Primer F1	2,5µL
Primer R2	2,5µL
dNTP's (200pm)	6 µL
Taq polimerasa	0,25µL

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: para el gen *acrB*: desnaturalización inicial a 94°C 2 min; 30 ciclos a 94°C 1 min, 60°C 1 min y 72°C 30 segundos; y una extensión de 72°C 2 min. Para el gen *add*: desnaturalización inicial a 94°C 1 min; 37 ciclos a 94°C 1 min, 55°C 30 segundos y 72°C 1 min; y una extensión de 72°C 4 min. Para el gen *mdfA*: desnaturalización inicial a 94°C 2 min; 35 ciclos a 94°C 1 min, 58°C 1 min y 72°C 30 segundos; y una extensión de 72°C 2 min.

Tras la PCR se revelaron los productos para observar la presencia o ausencia del amplicón en gel de agarosa al 1.5% con Midori Green a 80V durante 40-45 min para observar en el transiluminador la banda correspondiente al gen.

3.7. Crecimiento frente a aceite de oliva virgen y refinado

El efecto antimicrobiano del aceite de oliva virgen y refinado sobre las cepas se midió mediante dos métodos.

En el primero, el método de las sobrecapas, se sembraron 150 µL de cultivo crecido "*overnight*" en placas de BHA (Scharlab) por triplicado. A continuación, se realizaron cultivos axénicos, agregando a cada placa 5 gotas de uno de los siguientes productos: aceite de oliva virgen; aceite de oliva refinado; una mezcla 50:50 de ácido cólico al 1% y aceite de oliva virgen o refinado; una mezcla 50:50 de 3% de lecitina y aceite de oliva virgen o refinado; una mezcla 50:50 de 1% de ácidocólico-3% de lecitina y aceite de oliva virgen o refinado. Las placas fueron incubadas durante 24 h 37 °C, evaluándose presencia o ausencia de crecimiento.

Para el segundo método, se usaron fragmentos de filtro. De nuevo, se sembraron 150 µL de cultivo crecido "*overnight*" en placas de BHA (Scharlab) por triplicado. Se colocaron fragmentos de filtro Whatman estéril de 2 cm² empapados en solución salina, aceite de oliva virgen o aceite de oliva refinado sobre las placas previamente sembradas. Se incubaron durante 24 h 37 °C y se evaluó el crecimiento microbiano debajo. Los resultados fueron definidos como "crecimiento", "inhibición parcial" o "inhibición total". La inhibición

parcial se definió como la situación en la que la superficie cubierta por la gota o el filtro no presenta un césped continuo de crecimiento bacteriano.

3.8. Producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica, sintetizadas por las bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos e impedir que colonicen su nicho biológico. Su producción por parte de las cepas estudiadas se evaluó de la siguiente manera:

Las cepas estudiadas se sembraron en medio BHA (Scharlab) tamponado con sales di-sodio hidrógeno fosfato anhidro y sodio di-hidrógeno fosfato 2-hidrato para evitar que los posibles ácidos derivados de la fermentación de azúcares bajen el pH, impidiendo el crecimiento de la bacteria, y dando lugar a un posible falso positivo por inhibición del crecimiento de la bacteria mediada por bacteriocina. Simultáneamente, sembramos en medio BHI la bacteria indicadora. Como bacteria indicadora utilizamos *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Enterococcus faecalis* S47, *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Escherichia coli* CECT 4972 y *Salmonella choleraesuis* CECT 4300, todas ellas adquiridas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Incubamos las placas con

los inóculos de las cepas estudiadas y los tubos con inóculo de las bacterias indicadoras a 37°C durante 24 horas.

Tras su incubación, se inoculó la bacteria indicadora en sobrecapas de BHA tamponado atemperadas a 55°C, se extendieron sobre las placas con las cepas crecidas y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Pasado este tiempo, observamos la aparición de halos en el crecimiento de la bacteria indicadora, lo que indica la producción de bacteriocinas por parte de la cepa sembrada en la capa base de BHA.

3.9. Estudio estadístico

El número de animales en este estudio (tres por dieta) se determinó en un trabajo anterior (Hidalgo *et al.*, 2014) donde todos los animales con la misma dieta se habían mantenido en la misma jaula hasta el momento en que se recogieron las heces. Puesto que asumíamos que el número de sujetos iba a ser estadísticamente bajo y considerando el hecho de que los ratones de una misma jaula no podían ser considerados al 100% como muestras independientes, dado la facilidad de los enterococos a resistir y contaminar el medio y ser compartidos por diferentes hospedadores, en los estudios estadísticos correspondientes a los apartados anteriores, decidimos

tomar las cepas como unidad muestral, obviando el ratón de donde se habían aislado.

Las unidades y las tablas de contingencia se diseñaron, de manera que, cada jaula (es decir, dieta) en un determinado momento era la base de una categoría diferente de la variable "dieta".

Para probar si la variable "especie" tiene o no la misma distribución en las diferentes categorías de la variable "dieta", y en las diferentes categorías de la variable "tiempo", para la prueba exacta de Fisher, se realizaron tablas de contingencia ya que algunos de los recuentos esperados estaban por debajo de 5 y, por lo tanto, la prueba de homogeneidad no es adecuada. Se llevaron a cabo análisis similares para identificar si había una influencia de "dieta" o "tiempo" en las variables *tdc* y *esp*, así como para estudiar si la "dieta" tenía una influencia en el "crecimiento / inhibición parcial" en los diferentes aceites y procedimientos.

Para investigar el efecto de las variables "dieta" y "tiempo" en el número de cepas de enterococos, se ajustó un modelo de regresión de Poisson. Como "dieta" y "tiempo" son variables categóricas, variables ficticias fueron incluidas en el modelo con el fin de evaluar el efecto que la presencia o ausencia de los diferentes niveles de las variables categóricas pueden tener en el número de cepas.

Para probar la igualdad de la distribución de la variable "% de resistencias a antibióticos" según el tipo de dieta, usamos la prueba de Kruskal-Wallis, ya que la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk rechazó la normalidad de la hipótesis. Se realizó el mismo procedimiento para estudiar la igualdad de la distribución de la variable " % de resistencias a antibióticos " según la variable "tiempo". Siempre que se detectaron diferencias significativas, aplicamos pruebas post hoc de Duncan para las comparaciones múltiples por pares con ajustes en los valores de p de Bonferroni.

Para estudiar si existen o no diferencias en el efecto antimicrobiano de ROO y EVOO dentro de cada dieta específica, se observó el crecimiento/ inhibición parcial de las cepas aisladas de ese grupo de ratones. Como los resultados son datos nominales emparejados, se usó la prueba de McNemar para verificar significancia estadística.

3.10. Identificación mediante secuenciación ARNr 16S

Para su secuenciación e identificación taxonómica a nivel de especie, se realizaron PCRs del gen ARNr 16S utilizando los primers 16S: AGAGTTTGATCMTGGCTC y 23R: CNCGTCTTCATCGCCT ambos en dirección 5'-3' para secuenciar los productos y obtener así la identificación de la cepa mediante un BLAST de su secuencia.

Para ello, se añadió el ADN en los tubos de PCR previamente identificados con la cepa a la que corresponden y se añadieron los siguientes reactivos hasta completar un volumen final de 50 μL :

Reactivos(1x) para la reacción de PCR para la identificación ARNr 16S (Volumen final: 50 μL)	
ADN	2 μL (a concentración 10 ng/ μL)
Agua MQ	28,8 μL
Buffer	5 μL
Cloruro de magnesio (MgCl_2) 25 mM	0,75 μL
Primer F1	2,5 μL
Primer R2	2,5 μL
dNTP's	6 μL
Taq polimerasa	0,25 μL

Las condiciones de PCR fueron para todos los genes las mismas: Desnaturalización inicial a 96°C 4 min; 30 ciclos de 96°C 10 segundos, 52°C 30 segundos y 72°C 2min; y una extensión de 72°C 4 min.

Una vez finalizada la PCR se reveló el producto para observar la presencia o no del amplicón. Para ello, se cargaron 5-6 μL de producto de PCR mezclado con tampón de carga (*Blue Juice Gel Loading Buffer*) en gel de agarosa al 1 % teñido con Midori Green, y se llevó a cabo una electroforesis durante 20 minutos a 80V para

observar en el transiluminador la banda correspondiente al amplicón y detectar si la PCR había funcionado. Una vez obtuvimos la banda con el amplicón se procedió a la purificación de los productos de PCR para su secuenciación.

3.10.1. Purificación de los productos de PCR

Para eliminar del producto de PCR los restos de primers, dNTP's, enzimas y demás reactivos utilizados previamente, se utilizó el reactivo *ExoStar* 1-Step (Illustra TM). El protocolo de utilización de dicho reactivo es el siguiente:

Reactivos(1x) para la purificación de productos de PCR con <i>ExoStar</i> 1-Step	
Producto de PCR	5 µL
<i>ExoStar</i> 1-Step	2 µL

Las condiciones de PCR para la purificación de productos de PCR's fueron las siguientes: 37°C 15 min; 85°C 15 min durante 1 solo ciclo y 4°C tiempo indefinido.

3.10.2. Secuenciación de los productos de PCR

Una vez obtuvimos los productos purificados, se enviaron a la empresa "Sistemas genómicos" (Valencia), para su secuenciación.

3.11. Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Una vez que tuvimos las cepas identificadas, se realizó el genotipado usando PCR de amplificación polimórfica al azar (RAPD). Esta técnica consiste en amplificar regiones del genoma bacteriano utilizando cebadores pequeños (secuencias nucleotídicas de 10 bases, escogidas de manera arbitraria). La electroforesis de los productos de PCR obtenidos por esta técnica permite obtener un perfil característico de la cepa ensayada.

Para ello, se añadió el ADN en los tubos de PCR previamente identificados con la cepa a la que corresponden y se añadieron los siguientes reactivos hasta completar un volumen final de 50 μL :

Reactivos(1x) para la reacción de PCR para el análisis RAPD (Volumen final: 50 μL)	
ADN	10 μL (a concentración 10 ng/ μL)
Agua MQ	23,7 μL
Buffer para RAPD	5 μL
Primer M13 (10pM)	5 μL
dNTP's (200 pM)	6 μL
Taq polimerasa	0,3 μL

El tampón para RAPD contiene KClO 5M, MgCl 30 mM y Tris-HCl 0,1M pH 9.

El primer utilizado fue el M13: 5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3' y las condiciones de PCR fueron: 35 ciclos de desnaturalización inicial 94°C 1 min, 40°C 20 segundos y 72°C 2 min; y una extensión final de 72°C 2 min.

Una vez finalizada la PCR se reveló el producto para observar la presencia o no del amplicón. Para ello, se cargaron 5-6 µL de producto de PCR mezclado con tampón de carga (*Blue Juice Gel Loading Buffer*) en gel de agarosa al 1 % teñido con Midori Green, y se llevó a cabo una electroforesis durante 20 minutos a 80V para observar en el transiluminador la banda correspondiente al amplicón y detectar si la PCR había funcionado.

Obtenida la banda con el amplicón, las muestras se revelaron en geles de agarosa (200 ml) al 2% bajo una corriente de 48V durante 16 horas. Las muestras de PCR fueron adicionadas de 5 µl de tampón de carga y se mezclaron bien, cargando un volumen final de 20 µl de la mezcla en cada pocillo. La tinción del gel se realizó en una solución de TBE 1x con bromuro de etidio al 2%, durante una hora. Posteriormente, el gel se observó en el transiluminador.

Las cepas se analizaron en un dendograma utilizando el Software BioNumerics.

3.12. Estudio genético para la caracterización taxonómica MLST (Multilocus Sequence Typing)

3.12.1. PCR para la caracterización taxonómica MLST y revelado

Este apartado se llevó a cabo en aquellas cepas que habían demostrado pertenecer a la especie *Enterococcus faecalis*. Para su caracterización taxonómica mediante MLST se realizaron PCRs específicas para comprobar la presencia o no de pequeños fragmentos de ciertos genes muy conservados en la especie *Enterococcus faecalis* y así verificar a qué genotipo de esa especie pertenecía cada aislado. En concreto, estudiamos 7 genes en cada cepa. Los productos obtenidos se revelaron en un gel de agarosa teñido con Midori Green, obteniendo así los resultados de presencia o ausencia de estos genes en el genoma bacteriano.

Las secuencias genéticas correspondientes a los fragmentos de los genes de *Enterococcus faecalis* que se estudiaron son:

- *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)
- *gyd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)

- *pstS* (transportador de fosfato para la unión a ATP)
- *gky* (glucoquinasa)
- *aroE* (siquimato-5-deshidrogenasa)
- *xpt* (xantinafosforibosiltransferasa)
- *yqiL* (acetil-CoAacetiltransferasa)

Tabla 4. Primers y productos de PCR para la caracterización taxonómica de *Enterococcus faecalis* (MLST data base)

GEN Y PRIMERS	SECUENCIA DEL PRIMERS (5'-3')	PRODUCTO DE PCR (pb)
<i>gdh</i>		
gdh-1	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
gdh-2	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd</i>		
gyd-1	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC	395
gyd-2	CATTTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>pstS</i>		
pstS-1	CGGAACAGGACTTTCGC	583
pstS-2	ATTTACATCACGTTCTACTTGC	
<i>gki</i>		
gki-1	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
gki-2	ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	
<i>aroE</i>		
aroE-1	TGGAAAACTTTACGGAGACAGC	459
aroE-2	GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	
<i>xpt</i>		
xpt-1	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	456
xpt-2	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
<i>yqiL</i>		
yqiL-1	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
yqiL-2	GAATATCCCTTCTGCTTGTGC	

En la tabla 4 se muestra el nombre de los fragmentos de genes que hemos estudiado, la secuencia de los primers en las dos direcciones (3'-5' y 5'-3), así como el tamaño del amplicón esperable.

Para la realización de la PCR, la extracción del ADN se llevó a cabo a partir de masa bacteriana de cada una de las cepas, sembradas en cruces en TSA, con palillos estériles.

En cada tubo de PCR identificado con la cepa a la que corresponde, se añadió masa bacteriana y los siguientes reactivos hasta completar un volumen final de 25 µL:

Reactivos (1x) para la reacción de PCR para la detección de genes MLST (Volumen final: 25 µL)	
Agua MQ	19 µL
Buffer	2,5 µL
Cloruro de magnesio (MgCl ₂) 25 mM	0,75 µL
Primer F1	0,75 µL
Primer R2	0,75 µL
dNTP's	1 µL
Taq polimerasa	0,125 µL

Las condiciones de PCR fueron para todos los genes las mismas: Desnaturalización inicial a 94°C 3 min; 35 ciclos de 94°C 3 segundos, 50°C 3 segundos y 72°C 3 segundos; y una extensión de 50°C 5 min

Una vez finalizada la PCR se reveló el producto para observar la presencia o no del amplicón. Para ello, se cargaron 5-6 µL de producto de PCR mezclado con tampón de carga (*Blue Juice Gel Loading Buffer*) en gel de agarosa al 0,8% teñido con Midori Green, y se llevó a cabo una electroforesis durante 20 minutos a 80V para observar en el transiluminador la banda correspondiente al gen.

3.12.2. Purificación de los productos de PCR

Para eliminar del producto de PCR los restos de primers, dNTP's, enzimas y demás reactivos utilizados previamente, se utilizó el reactivo *ExoStar 1-Step* (Illustra TM). El protocolo de utilización de dicho reactivo es el siguiente:

Reactivos(1x) para la purificación de productos de PCR con <i>ExoStar 1-Step</i>	
Producto de PCR	5 µL
<i>ExoStar 1-Step</i>	2 µL

Las condiciones de PCR para la purificación de productos de PCR fueron las siguientes: 37°C 15 min; 85°C 15 min durante 1 solo ciclo y 4°C tiempo indefinido.

3.12.3. Secuenciación de los productos de PCR

Una vez obtuvimos los productos purificados, se enviaron a la empresa “Sistemas genómicos” (Valencia), para su secuenciación.

3.13. Estudio de los resultados de secuenciación: estudio de las cepas ST y estudio algorítmico eBURSTv3.

Para el estudio de la secuenciación de los alelos de cada gen, se realizó una base de datos que contenía todos los alelos posibles de cada gen. Para ello, se utilizó el programa BioEdit.

Una vez que tuvimos la base de datos con todos los posibles alelos para cada gen (tabla 4), se introdujo nuestra secuencia problema, se alineó la secuencia y se comparó con todos los alelos posibles de ese gen, de manera que, al compararlos, fuimos eliminando los alelos que no coincidían con nuestra secuencia problema, hasta quedarnos con un alelo, cuya secuencia era exactamente igual a la nuestra, por lo que nuestra secuencia correspondería a ese alelo. Este procedimiento se realizó con todas las muestras secuenciadas.

Cuando tuvimos los 7 alelos de cada cepa, mediante la base de datos de MLST para *Enterococcus faecalis*, construimos el perfil alélico para cada cepa mediante la composición de una secuencia correspondiente a la alineación de los 7 alelos en un orden determinado. Esta secuencia la llevamos posteriormente a la base de datos de NCBI Blast y obtuvimos de qué genotipo se trataba en cada caso con un 100% de exactitud.

Tabla 5. Modelos de perfil alélico que muestra los alelos correspondientes a los siete genes para *Enterococcus faecalis* en la base de datos de MLST

Nombre del gen	gdh	gyd	pstS	gki	aroE	xpt	yqiL
Número de alelos MLST	77	29	78	79	82	69	77

3.13.1. Estudio de las cepas ST (sequence type) y estudio algorítmico eBURSTv3

Una vez identificadas las cepas por el NCBI Blast, usando la base de datos de MLST, identificamos a qué secuencias tipo (ST) correspondían cada cepa. Para ello usamos el Allelic Profile Query de MLST en el que se encuentran todas las cepas tipo de *Enterococcus faecalis* que están determinadas y secuenciadas.

Una vez identificadas dentro de la base de datos de Allelic Profile Query de MLST, se hizo el estudio algorítmico eBURST usando el programa eBURSTv3.

3.14. Estudio proteómico de las cepas de *Enterococcus* de interés

El estudio de proteómica se llevó a cabo en aquellas cepas seleccionadas por su especial interés y se llevó a cabo en el Centro de Instrumentación Científico Técnica (CICT) en colaboración con su personal.

3.14.1. Obtención de extractos proteicos de *Enterococcus*

Para la obtención de los extractos proteicos de las cepas seleccionadas, partimos de cultivos de estas cepas crecidos en BHI a partir de los cuales se obtuvieron *pellets* celulares en tubos falcon de

15 ml. Estos *pellets* fueron lavados con buffer tampón fosfato 20 mM pH 7,5 mediante centrifugación (4.000x g a 4°C durante 5 min). Posteriormente, los *pellets* fueron resuspendidos en buffer de homogenización (50 mM TRIS buffer pH 7,6, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 2mM DTT y una tableta de inhibidor de proteasas (Roche- 11697498001) por 50 mL de buffer) y de bolas de cristal (Sigma-G9268) equivalente al *pellet* de cada muestra. Se obtuvieron homogenados de los *pellets* mediante vortex (10 ciclos de 30 segundos a 4°C), sonicación (20 ciclos de 30 segundos a 4°C) (Sonicador Bioruptor® utilizado de las instalaciones del Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) de la Universidad de Jaén) y posterior centrifugación (10.000x g durante 5 min a 4°C) descartando los precipitados y quedándonos con los sobrenadantes.

Una vez tuvimos los sobrenadantes, hicimos precipitar las proteínas contenidas en estos sobrenadantes mediante el protocolo TCA-acetona (Wang, *et al*, 2006) que consiste en añadir por cada 500 µL de muestra, 1,5 mL de una disolución al 10% de ácido tricloroacético (TCA/acetona, 0,07% DTT). Posteriormente, los homogenados se incubaron a -20°C durante 1 hora y se centrifugaron a 10.000x g durante 5 min. Los *pellets* obtenidos se lavaron con un volumen de acetona a - 20°C igual al tampón TCA-acetona, es decir, 1,5 mL de acetona /500 µL de muestra y se centrifugaron a 10.000x g durante 5

min, repitiendo el lavado una vez más. Los precipitados obtenidos fueron secados en la cámara de flujo laminar y resuspendidos en buffer de resuspensión (9M de urea, 4% CHAPS, 2% IPG buffer, 100mM DTT y 0,001% de azul de bromofenol). Seguidamente, los extractos se centrifugaron a 13.000x g a 4°C durante 5 min y se recolectaron los sobrenadantes, estos serían nuestros extractos de proteínas.

3.14.2. Análisis del perfil unidimensional (1D) de los extractos de proteínas de Enterococcus

Los extractos de proteínas obtenidos fueron analizados en el CICT de la Universidad de Jaén, mediante geles de electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) unidimensionales (1D) con la finalidad de separar los diferentes tipos de proteínas de los extractos analizados mediante la diferencia de peso molecular entre las mismas. Para ello, se utilizaron dos soluciones: *resolving* y *stacking* cuya composición se detalla a continuación y se corrió mediante electroforesis a un voltaje constante de 100-150V.

Composición de la disolución "resolving"		Composición de la disolución "stacking"	
Agua Milli-Q	8,4 mL	Agua Milli-Q	5,7 mL
Acrilamida/ bis-arilamida	10,4 mL	Acrilamida/ bis-arilamida	1,7 mL
TRIS 15M, pH 8.8	6,5 mL	TRIS 15M, pH 6.8	2,5 mL
SDS 10%	260 µL	SDS 10%	100 µL
Persulfato amónico (APS) 10%	130 µL	Persulfato amónico (APS) 10%	50 µL
Tetramethylethylenediami de (Teemed)	13 µL	Tetramethylethylenediamide (Teemed)	5 µL

3.14.3. Análisis del perfil bidimensional (2D) de los extractos de proteínas de *Enterococcus*

Este análisis de los extractos de proteínas se llevó a cabo en el CICT de la Universidad de Jaén mediante geles de electroforesis desnaturizante en geles bidimensionales (2D) de poliacrilamida (SDS-PAGE) con la finalidad de separar las distintas proteínas de los extractos proteicos no sólo por su peso molecular (como ya hicimos en el análisis unidimensional) sino también por su punto isoelectrico (pI). En este caso, previamente a la electroforesis, los extractos se sometieron a un enfoque isoelectrico en tiras de inmobilinas (IPG) utilizando para ello un sistema de isoelectroenfoco. De manera que se añadió 2% de anfóteros a los extractos proteicos aplicados en el IEF focusing tray entre electrodos. Se retiró el plástico protector de la

tira con ayuda de unas pinzas y se depositó, con el gel hacia abajo, sobre el carril donde está la muestra (la posición correcta de la tira será haciendo coincidir sus extremos positivo y negativo con los electrodos correspondientes del IEF tray). Se añadió aceite mineral (parafina) sobre la tira y se aplicó el programa de IEF (esto varía en función de la tira que se utilice, así como, el volumen y la cantidad de proteína aplicada que también variará en función de la tira).

El protocolo de isoelectroenfoque usado para las tiras de inmobilinas de 7 cm fue el siguiente: rehidratación pasiva 12h a 20°C (sin pausa); 50V durante 10 h (rápido); 500V durante 1 h (rápido); 1000V durante 1 h (rápido); 4000V durante 30 min (lineal); 400V, 6000V durante 1 hora (rápido); 500V durante 99 h (rápido) (holdstep). Se utilizaron 150 µg de muestra en un volumen de 125 µL y 1 mL de aceite mineral.

Una vez finalizado el protocolo de isoelectroenfoque, se retiraron las tiras IPG retirando a su vez el aceite con cuidado de que las tiras no se dañaran y se incubaron en buffer de equilibrado I y II, respectivamente, durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación y lavando las tiras entre ambas incubaciones en solución de carrera 1X con las soluciones tamponadas I y II respectivamente.

Seguidamente, las tiras se aplicaron en el gel de poliacrilamida y se procedió con el protocolo descrito en el apartado anterior para el análisis del perfil unidimensional (1D). Los geles fueron comparados con el programa “PDQuestTM 2-D Analysis Software” (BioRad).

*3.14.4. Análisis de los extractos proteicos mediante
Espectrofotometría de Masas Orbitrap y procesamiento
de datos*

El análisis del proteoma de las muestras con su correspondiente procesamiento de datos, se llevó a cabo en el espectrofotómetro de masas Orbitrap del CICT de la Universidad de Jaén en colaboración con su personal. Para ello, se digirieron las muestras en una solución siguiendo el protocolo del kit FASP EXPEDEON y un desalado marcado por el protocolo de Pierce C18 Spin Columns de Thermo Fisher. Los resultados se introdujeron en una base de datos específica para el proteoma de *Enterococcus faecalis* disponible en Uniprot.org con el software Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher) usando el motor de búsqueda Sequest HT.

**3.15. Estudios comparativos con datos obtenidos a partir de
heces de ratón mediante secuenciación masiva**

Los estudios entre los diferentes OTUs (operational taxonomical units) obtenidos por secuenciación masiva se realizaron a partir de la

base de datos obtenida y publicada con anterioridad (Prieto et al. 2018). Para las comparaciones entre secuencias específicas se utilizó la herramienta en línea BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Para los estudios estadísticos se aplicó el test de Kruskal-Wallis, con comparaciones post-hoc múltiples si había diferencias significativas.

Resultados

Parte I

- 4.1. Artículo publicado en International Journal of Molecular Sciences titulado ***“Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice”*** (2019).



Article

Influence of the Type of Diet on the Incidence of Pathogenic Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Faeces in Mice

Beatriz Sánchez ¹, Antonio Cobo ^{1,†}, Marina Hidalgo ¹, Ana M. Martínez-Rodríguez ² , Isabel Prieto ³ , Antonio Gálvez ¹ and Magdalena Martínez-Cañamero ^{1,*}

¹ Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, Paraje de Las Lagunillas s/n, 23071 Jaen, Spain

² Departamento de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Jaén, Paraje de Las Lagunillas s/n, 23071 Jaen, Spain

³ Área de Fisiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén, Paraje de Las Lagunillas s/n, 23071 Jaen, Spain

* Correspondence: canamero@ujaen.es

† Current address: Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Campus de la Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain.

Received: 30 July 2019; Accepted: 28 August 2019; Published: 2 September 2019



Abstract: A comparative study on potential risks was carried out in a collection of 50 enterococci isolated from faeces of mice fed a standard or a high-fat diet enriched with extra virgin olive oil, refined olive oil or butter, at the beginning, after six weeks and after twelve weeks of experiments. Strains were biochemically assessed and genetically characterized. *E. faecalis* and *E. casseliflavus* were the most frequently isolated species in any diet and time points. Apart from the fact of not having isolated any strain from the virgin olive oil group during the last balance, we found statistically significant differences ($p < 0.05$) among the diets in the percentage of antibiotic resistance and in the presence of the enterococcal surface protein gene (*esp*), as well as a tendency ($p < 0.1$) for the presence of the tyrosine decarboxylase gene (*tdc*) to increase over time in the group of isolates from the standard diet. When the resistance of the strains to virgin or refined olive oil was studied, only the group of enterococci from high fat diets showed a significantly higher percentage of resistance to refined olive oil ($p < 0.05$), while both types of oil equally inhibited those isolated from the standard diet ($p > 0.05$).

Keywords: enterococci; virulence; antibiotic resistance; olive oil; high fat diets

1. Introduction

The intestinal microbial diversity will be determined by the interactions among the organisms that compose it, the genetics of the host and the diets applied [1]. Diet, in fact, has a marked influence on the intestinal microbiota of the host [2] and much attention has been drawn specifically on high fat diets (HFD) because of their influence on health [3]. While studying the dissimilar effect of fats with different degrees of saturation, we have previously reported several studies comparing the influence of virgin olive oil (EVOO) and butter (BT) on the intestinal microbiota of mice, both using genotyping methods [4] and massive sequencing [5]. In these works, we presented evidence supporting a link between specific diets, physiological parameters and some bacterial taxa. Moreover, by comparing EVOO and refined olive oil (ROO) diets, the possible effect of virgin olive oil polyphenols was uncovered [6]. These new culture-independent technologies can, however, address only global taxa, giving no discriminative data on how the different strains of a certain bacterial group are evolving

in response to the diet, even though this strain-level change is most probably the first one to occur in the bowels. Intestinal microorganisms will deal with the capacity of self-regulation of the system, the available food and the competition for resources, and will have to defend themselves against chemical products or aggressive proteins, which will lead to many of these bacterial groups to develop strategies and defence mechanisms. Among these mechanisms, we can find the expression of virulence factors or antibiotic resistance. These defensive weapons will inescapably affect the host, potentially causing serious clinical consequences.

One of the best-studied genera in this sense is the genus *Enterococcus*, in which several of these factors are known. Enterococci are intestinal bacteria widely known for their presence both in food and the oral-faecal route, and their utilization and safety remain a source of controversy [7]. As lactic acid bacteria, they have been important in food fermentations [8] and are also used as probiotics [7]. However, they are important nosocomial pathogens too, which prevents them from getting their GRAS (Generally Recognized as Safe) qualification [9]. This is worsened by their ability to survive adverse environmental conditions and heat treatments [10], which makes enterococci a widely distributed microbial group [11]. Enterococcal strains from food [12], environmental or clinical origins [13] are then very carefully studied to evaluate their safety.

Enterococcus is therefore a good model of how certain diets can protect the host, promoting, or not, the growth of strains with different levels of safety once they have reached the intestine. Considering the antimicrobial effect of olive oil on bacterial taxa in vitro [14] and, in a murine model [6], it is also interesting to evaluate its potential role, when included in the diet, in selecting the strains that are going to thrive in the intestines of the host. Consequently, our objective has been to carry out a study on the safety level of enterococcal strains, isolated from faeces of mice fed with standard chow or enriched with EVOO, ROO or BT, by evaluating their antibiotic resistance, virulence factors, and the production of biogenic amines, as well as to ultimately determine if there are statistically significant differences among these enterococci isolated from the four different diets.

2. Results

2.1. Isolation and Identification of Bacterial Strains

A previous collection of bacterial strains obtained from faeces of mice fed four different diets (SD, BT, EVOO and ROO) over a twelve-week period was screened for enterococcal phenotypic characteristics. All Gram positive cocci, facultative anaerobic, catalase negative, able to hydrolyse esculin in 40% bile salts and to grow from 10 to 45 °C, in a media containing 6.5% NaCl or buffered at pH 9.6, were selected and their r16S gene was sequenced. In total, a collection of 50 enterococcal strains was obtained. As shown in Table 1, most of them belonged to the species *E. faecalis* [15] and *E. casseliflavus* [16], followed by *E. gallinarum* [5], *E. hirae* [2] and one strain of *E. avium* and *E. durans* each. Twelve strains were obtained at the beginning of the experiment, eighteen after six weeks and twenty strains after twelve weeks. Most strains were obtained in the BT group [17] and the lowest number of strains was found in the EVOO group [6], mostly because no strains were isolated from faeces on this diet at the end of the experiment (Figure 1a,b). To confirm this result statistically, a Poisson's regression model was applied to the number of strains obtained based on two factors: diet and time (6 and 12 weeks). According to this model, the diet enriched with EVOO produced a significantly lower number of strains (23% lower; $p = 0.0221$). However, in spite of these dissimilarities, no significant difference was found in the species distribution of the strains with respect to diet or time when applied a Fisher's exact test for count data.

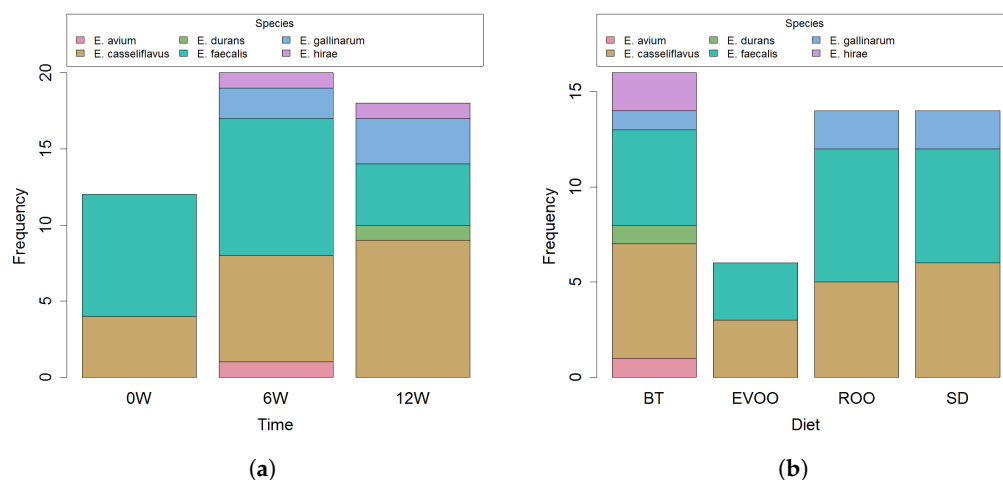


Figure 1. Bar plot of number of strains isolated within each species distributed according to time (a) and diet (b).

Table 1. Detection of virulence factors and biogenic amines gene products.

Species	Virulence Factors										Biogenic Amines	
	<i>agg</i>	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>cylM</i>	<i>cylB</i>	<i>esp</i>	<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>	<i>cob</i>	<i>cpd</i>	<i>ccf</i>	<i>tdc</i>
0S1-1 <i>E. faecalis</i>	+											
0S1-2 <i>E. casseliflavus</i>	+											
0S2-1 <i>E. faecalis</i>	+											
0B1-2 <i>E. casseliflavus</i>						+						+
0B2-4 <i>E. faecalis</i>						+						
0B3-1 <i>E. casseliflavus</i>						+						
0O5-2 <i>E. faecalis</i>						+					+	+
0O5-4 <i>E. faecalis</i>						+						+
0O7-3 <i>E. faecalis</i>						+						
0V3-1 <i>E. casseliflavus</i>						+						
0V5-1 <i>E. faecalis</i>						+						+
0V5-2 <i>E. faecalis</i>						+					+	+
6S3-3 <i>E. casseliflavus</i>					+		+	+				
6S3-4 <i>E. gallinarum</i>												+
6S4-1 <i>E. casseliflavus</i>												
6S4-2 <i>E. faecalis</i>						+					+	
6S5-1 <i>E. faecalis</i>						+						+
6S5-3 <i>E. faecalis</i>		+				+						+
6B1-1 <i>E. casseliflavus</i>						+						
6B1-2 <i>E. gallinarum</i>										+		
6B1-3 <i>E. hirae</i>						+						+
6B2-1 <i>E. faecalis</i>						+						+
6B3-1 <i>E. avium</i>						+						+
6B3-2 <i>E. casseliflavus</i>						+						
6O5-2 <i>E. faecalis</i>						+						+
6O5-3 <i>E. faecalis</i>						+						+
6O5-4 <i>E. faecalis</i>						+						+
6O6-1 <i>E. faecalis</i>						+						+
6O7-1 <i>E. casseliflavus</i>						+						
6V3-1 <i>E. casseliflavus</i>						+						
6V5-1 <i>E. faecalis</i>								+				+
6V6-1 <i>E. casseliflavus</i>	+					+						
12S6-2 <i>E. faecalis</i>												+
12S6-3 <i>E. casseliflavus</i>										+		+
12S7-2 <i>E. casseliflavus</i>												+
12S7-3 <i>E. gallinarum</i>						+						+
12S7-4 <i>E. casseliflavus</i>						+						+
12B1-3 <i>E. hirae</i>												+
12B1-4 <i>E. faecalis</i>						+	+					+
12B2-4 <i>E. casseliflavus</i>						+						+
12B2-5 <i>E. durans</i>												
12B3-2 <i>E. casseliflavus</i>						+						
12B3-4 <i>E. faecalis</i>												+
12B3-5 <i>E. faecalis</i>												+
12O5-1 <i>E. gallinarum</i>	+					+						
12O5-2 <i>E. casseliflavus</i>						+						
12O5-3 <i>E. gallinarum</i>												+
12O6-1 <i>E. casseliflavus</i>						+						+
12O6-3 <i>E. casseliflavus</i>												+
12O7-1 <i>E. casseliflavus</i>						+						

2.2. RAPD Classification

When subjected to RAPD-PCR genotyping, the fifty strains clustered in three different groups (Figure 2). Group 1 was deeply branched and included only five strains, all of which were isolated from standard diet fed mice. Group 2 contained 40% of the isolates, all of them from the SD group or from the other groups at $t = 0$. Finally, the third big cluster grouped the rest of the strains, 52%, most of them (21 out of 26) isolated from mice fed one of the three high fat diets (BT, EVOO or ROO).

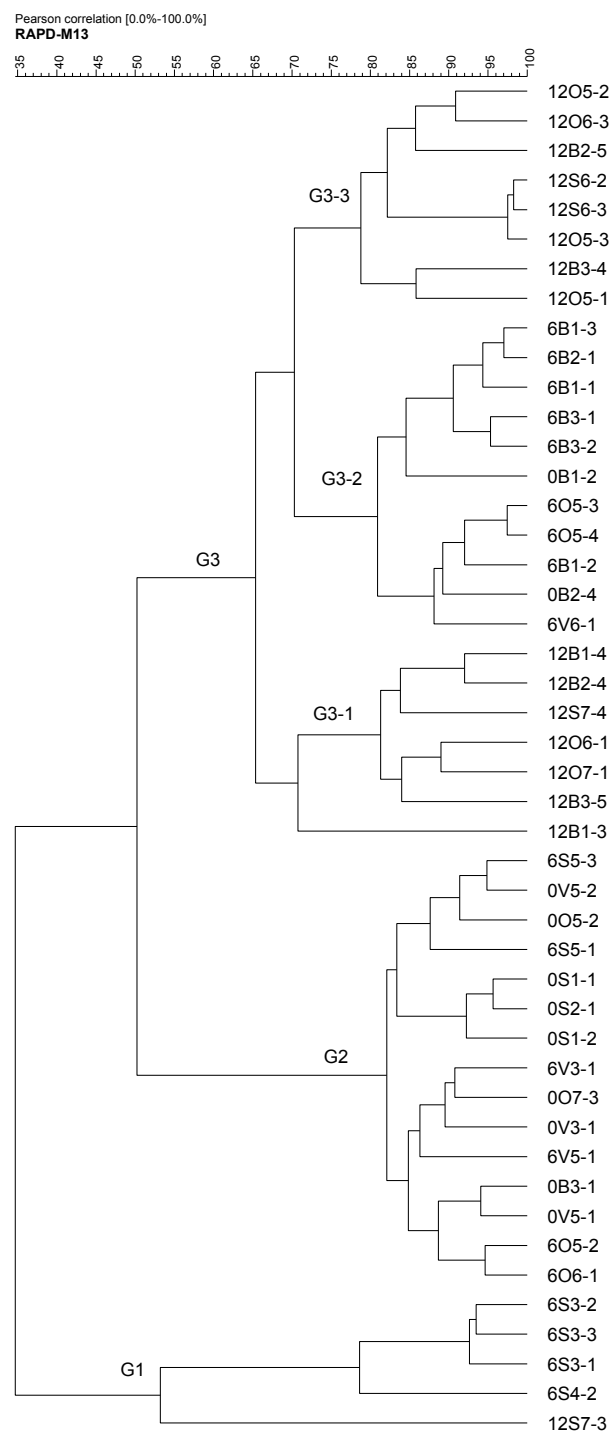


Figure 2. Pearson coefficient-based analysis of the RAPD profiles of the strains isolated. The initial number indicates the week of isolation.

2.3. PCR Amplification of Virulence Factors

Specific PCR reactions were performed to detect the presence of genes related to virulence factors (Table 1). Thirty-six isolates presented at least one virulence-related gene, out of which, six strains showed positive for two virulence factors and only one isolate presented three. Five strains showed positive for the aggregation substance gene (*agg*). Gelatinase gene (*gelE*) was amplified in only one isolate. Sex pheromone genes (*cpd* and *ccf*) were present in one and four strains, respectively, while *cob* was not detected. Of the cytolysin genes, only *cylB* was present, in only one strain, and genes related to cell wall adhesions (*efaAfs* and *efaAfm*) were detected in two strains each. In contrast, the gene coding for the enterococcal surface protein (*esp*) was present in most of the strains (62%).

Since the rest of virulence factors did not reach the number of positives needed for any statistical study, we centered our attention in the *esp* gene distribution. Contingent tables followed by Fisher's exact test were performed to compare the percentage of presence of the gene in the strains isolated at the three different time-points and between each two different time-points, but no signification was detected. On the contrary, we found signification when comparing in the same way the percentage of presence of *esp* in the strains among all diets ($p = 0.0234$; Figure 3a), with the lowest values obtained in the SD group. This difference turned out to be more significant when comparing the SD diet versus the three high fat diets ($p = 0.0037$; Figure 3b).

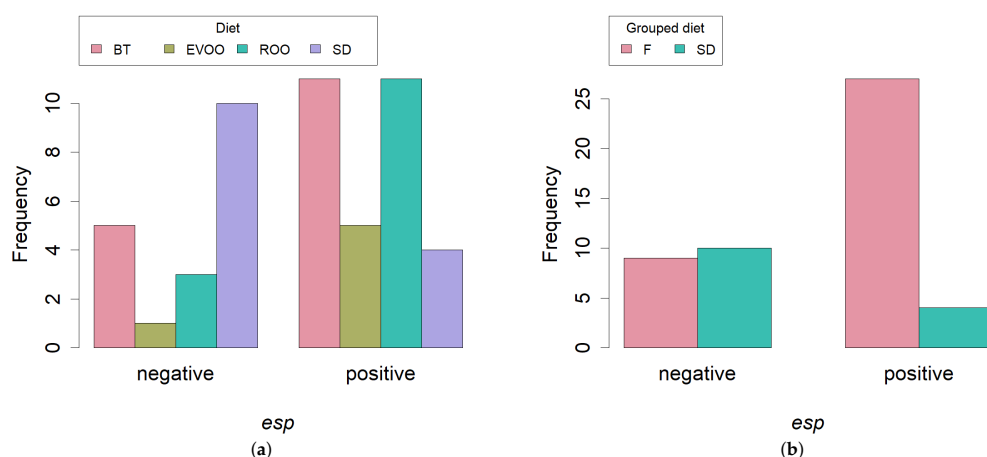


Figure 3. Bar plot of number of strains with presence (positives) or absence (negatives) of the gene *esp*, distributed among the four diets; (a) Fisher's exact test $p = 0.0234$ or between SD and high fat diets; (b) Fisher's exact test $p = 0.0037$. SD, standard diet; BT, butter enriched diet; EVOO, extra virgin olive oil enriched diet; ROO, refined olive oil enriched diet; F, all high fat diets.

2.4. Biogenic Amine Production

Possible production of biogenic amines was evaluated through PCR amplification of the genes coding for the corresponding carboxylases. No amplification products of the genes *hdc1*, *hdc2* or *odc* were obtained. However, 29 strains were positive in the case of the gene coding for tyrosine decarboxylase (*tyr*) (Table 1). Again, contingent tables followed by Fisher's exact test were performed in order to uncover differences among diets and also among all time-points. No significant differences were found in any case. When studying diets, a p -value of 0.4192 was obtained. When comparing data distribution between initial and final time points, the p -value, though still not significant, was lower ($p = 0.1362$) with five and thirteen positive strains, respectively (Figure 4a). Since there were no strains isolated in the EVOO group at 12 weeks, we lacked one time-point in the contingency table with respect to his diet. In fact, we have shown above that, on this diet, the number of strains is significantly smaller. Given that this could introduce an additional factor not relevant for the question asked and that this produces a sparse contingency table, we decided to repeat the statistical analysis

considering only those diets that present data along the three time points (SD, BT and ROO). In this case, the p -value ($p = 0.0968$) is significant at 90% (Figure 4b).

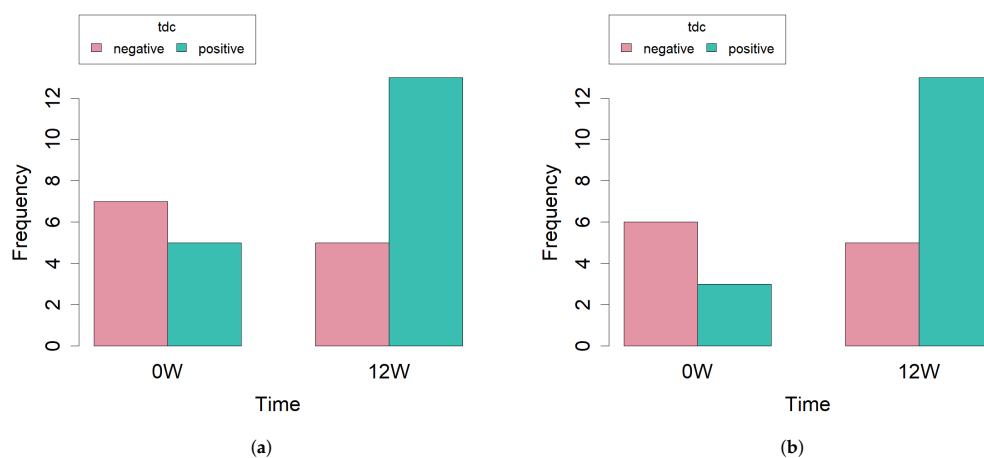


Figure 4. Bar plot of the number of strains with presence (positives) or absence (negatives) of the gene *tdc*, at the beginning or the end of the experiment considering strains from all diets; (a) Fisher's exact test $p = 0.1362$) or from all but an extra virgin olive oil enriched diet; (b) Fisher's exact test $p = 0.0968$).

2.5. Antibiotic Resistance

Resistance level was tested for fifteen different antibiotics and results were marked as R (resistance), I (intermediate) or S (susceptible) (Table 2). No antibiotic presented the same effect on all the strains; on the contrary, there was a high variability except in the case of kanamycin, norfloxacin and levofloxacin, where most strains were sensitive, with only five resistant strains against the first antibiotic and six strains against each of the other two. Thirty-one strains were resistant to five or more antibiotics, and three isolates had no resistance at all. Then, the percentage of antibiotics to which each strain was resistant was calculated and these data were grouped by diet and by time-point and were compared using a Kruskal–Wallis test. No significant differences were found among the three time-points, but there was significance when the diets were compared ($p = 0.0225$; Figure 5a). A pair comparison uncovered the fact that strains isolated from mice under SD diet presented less resistances than any of the three high fat diets, this difference being statistically significant when compared with the ROO diet ($p = 0.0140$). If the initial time point was not considered, the significance of the difference with the ROO diet improved ($p = 0.0039$), even reaching 90% significance also in the comparison between SD and BT ($p = 0.0804$; Figure 5b).

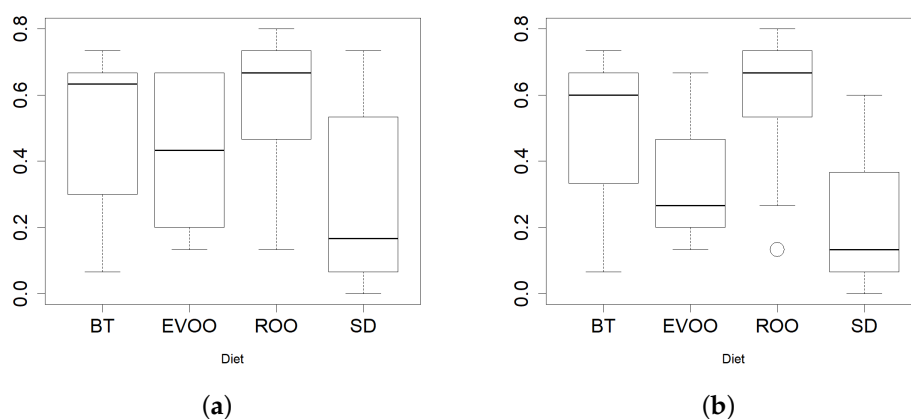


Figure 5. Boxplots of percentage of resistances in each strain grouped by diet considering all time-points; (a) p SD vs. ROO = 0.0225) or without initial time data; (b) p SD vs. ROO = 0.0039).

Table 2. Antibiotic resistance. R: Resistant I: Intermediate S: Susceptible. Antibiotics. PENP: penicillin pneumo; PENS: penicillin strepto; AMPE: ampicillin; CTXP: cefotaxim pneumo; CTXS: cefotaxim strepto; IMIE: imipenem; KAHES: kanamycin; GEHES: gentamycin; FQPR: norfloxacin; MXFPS: moxifloxacin; LVXS: levofloxacin strepto; LVXP: levofloxacin pneumo; ERYPS: erythromycin; TELPS: telithromycin; QDAE: quinupristin-dalfopristin; TEPS: tetracyclin; RFAPS: rifampicin; TSU: cotrimoxazol; LNZE: linezolid pneumo; LNZE: linezolid strepto; FOSP: fosfomycin; FURES: nitrofurantoin; VAN: vancomycin; TEC: teicoplanin.

Antibiotic Resistance															
	PEN	PENS	AMPE	CTXP	CTXS/IMIE	KAHES/GEHES	FQPR/MXFPS	LVXS/LVXP	ERYPS/TELPS	QDAE	TETPS/RFAPS	TSU/LNZE	LNZE	FOSP7FURES	VAN/TEC
0S1-1	R	R	I	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R
0S1-2	R	R	I	R	I	S	S	S	R	R	I	R	R	S	R
0S2-1	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
0B1-2	I	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
0B2-4	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
0B3-1	R	R	R	I	I	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R
0O5-2	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R
0O5-4	R	I	S	R	I	S	S	I	S	I	R	S	I	I	S
0O7-3	R	R	I	R	I	S	S	S	R	R	R	R	I	I	R
0V3-1	R	R	R	I	I	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R
0V5-1	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R
0V5-2	I	I	S	R	I	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S
6S3-3	R	R	I	I	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
6S3-4	I	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6S4-1	R	R	I	R	I	S	S	S	R	R	R	I	R	S	R
6S4-2	R	R	S	R	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
6S5-1	I	I	S	I	I	S	S	S	I	I	S	S	S	I	S
6S5-3	I	I	S	S	S	S	S	S	I	I	R	S	S	I	S
6B1-1	R	I	S	R	I	S	S	S	I	R	R	S	I	I	S
6B1-2	R	R	R	R	I	S	I	S	R	I	R	I	R	R	R
6B1-3	I	S	S	R	I	S	S	S	I	I	I	S	I	S	S
6B2-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	I	S	S	S
6B3-1	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R
6B3-2	R	I	S	R	I	S	S	S	R	R	R	S	S	I	S
6O5-2	R	R	R	R	I	S	S	R	R	R	R	I	R	R	R
6O5-3	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R
6O5-4	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R
6O6-1	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R
6O7-1	R	I	S	R	I	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S
6V3-1	R	R	R	R	I	S	I	S	R	R	R	I	R	R	R
6V5-1	I	I	S	R	I	S	S	S	R	R	R	S	S	I	S
6V6-1	I	I	S	I	I	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S
12S6-2	R	R	I	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R
12S6-3	I	I	S	R	I	S	S	S	I	I	I	S	S	I	S
12S7-2	I	I	S	R	I	S	S	S	I	I	I	S	S	I	S
12S7-3	R	R	S	I	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S
12S7-4	R	R	I	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R
12B1-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S
12B1-4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S
12B2-4	R	I	S	R	I	S	S	S	I	R	R	S	S	R	S
12B2-5	R	I	S	R	I	S	S	S	I	R	R	S	S	R	S
12B3-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S
12B3-4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S	I	I
12B3-5	I	I	S	I	I	S	S	S	I	S	R	S	S	I	S
12O5-1	R	R	S	R	I	S	S	S	R	R	R	I	R	I	S
12O5-2	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	I	R	R	R
12O5-3	I	S	S	R	I	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S
12O6-1	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R
12O6-3	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I	R	S	R
12O7-1	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R

Results on the genetic determinants of resistance for the isolates are shown in Table 3. All strains but one tested positive to at least one genetic determinant studied. Among the β -lactamase tested, *bla_{PSE}* and *bla_{TEM}* were the most frequent with presence in 23 and 24 strains, respectively, while *tetE* was the most prominent tetracycline resistance gene with 26 positives. Additionally, 34 strains presented genes for efflux pumps.

Table 3. Genetic determinants of resistance.

	β -Lactamases				Tetracyclines						Efflux Pumps		
					Group I			Group II					
	<i>bla_{CTX-M}</i>	<i>bla_{CTX-M2}</i>	<i>bla_{PSE}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>tetB</i>	<i>tetC</i>	<i>tetD</i>	<i>tetA</i>	<i>tetE</i>	<i>tetG</i>	<i>acrB</i>	<i>aadA1</i>	<i>mdfA</i>
0S1-1	+	+		+							+		+
0S1-2	+	+		+						+	+	+	+
0S2-1	+			+		+					+		+
0B1-2				+									
0B2-4			+						+				
0B3-1				+						+			
0O5-2			+					+	+				
0O5-4									+				
0O7-3	+			+						+	+	+	
0V3-1	+		+	+						+	+	+	
0V5-1									+		+	+	
0V5-2			+						+				
6S3-3		+	+					+	+		+		
6S3-4	+		+		+	+			+		+	+	+
6S4-1			+						+		+		
6S4-2		+	+					+			+		
6S5-1	+		+						+			+	
6S5-3	+	+						+	+		+		
6B1-1				+						+		+	
6B1-2			+						+	+			
6B1-3		+	+						+				
6B2-1	+		+	+					+				
6B3-1			+	+					+			+	
6B3-2		+		+							+	+	
6O5-2		+	+						+				
6O5-3	+	+	+						+				
6O5-4		+	+					+	+				
6O6-1			+						+		+	+	
6O7-1				+						+	+	+	
6V3-1				+							+	+	
6V5-1				+					+	+	+	+	+
6V6-1				+						+			+
12S6-2											+		+
12S6-3	+			+		+		+			+	+	+
12S7-2											+		+
12S7-3		+	+					+			+		
12S7-4		+									+		+
12B1-3	+		+						+	+			+
12B1-4									+			+	
12B2-4	+		+						+				
12B2-5			+						+		+		
12B3-2	+			+					+	+	+	+	
12B3-4				+					+	+			
12B3-5													
12O5-1				+						+		+	
12O5-2				+						+		+	
12O5-3				+								+	
12O6-1	+			+					+	+	+	+	
12O6-3			+	+						+		+	
12O7-1			+	+					+	+	+	+	

2.6. Growth with Virgin and Refined Olive Oil

Refined or virgin olive oil spotted directly on the lawn prevented any bacterial growth. Therefore, in order to see differences in the antimicrobial effect between both oils, we tried to emulate physiological conditions and made emulsions of the oils with cholic acid, lecithin or a mixture of both. Under these conditions, there was no total inhibition in any case and bacterial growth or partial inhibition alternated in all diets and with both types of oil (Table 4). When contingency tables were performed with these two options (growth/partial inhibition) and the four diets, no significant differences were detected among them.

When the antimicrobial effect of EVOO and ROO was checked with the filter paper technique, we found partial inhibition in all strains when confronted with virgin olive oil but growth/partial inhibition alternated again with refined olive oil (Table 4). The highest percentage of unaffected strains/the lowest percentage of partial inhibition was found in the group of isolates from the ROO diet (Figure 6a,b). Again, a contingency table was performed to check whether distribution of data among the diets was or not homogeneous, and these time differences were found at 90% of signification ($p = 0.0692$), confirming a strong tendency (Figure 6a).

Finally, each diet data were studied independently by means of a paired data analysis, with the McNemar's test and exact p -values, in order to check signification of the differences in growth/partial inhibition when facing refined or virgin olive oil with the different techniques. This analysis could not be performed in the strains isolated from the EVOO diet because of its low number. With respect to the other three diets, no significant differences were found in the case of lecithin, cholic acid or the mixture of both. However, when studying data using filter paper (Figure 6b), significant differences were found for the ROO diet isolates ($p = 0.0019$) and for the BT diet isolates ($p = 0.004$), indicating a significantly lower number of partially inhibited strains when growing with refined olive oil with respect to growing with virgin olive oil in both cases. However, no significant differences at 95% were found for the SD diet isolates ($p = 0.062$), indicating a higher number of partially inhibited strains.

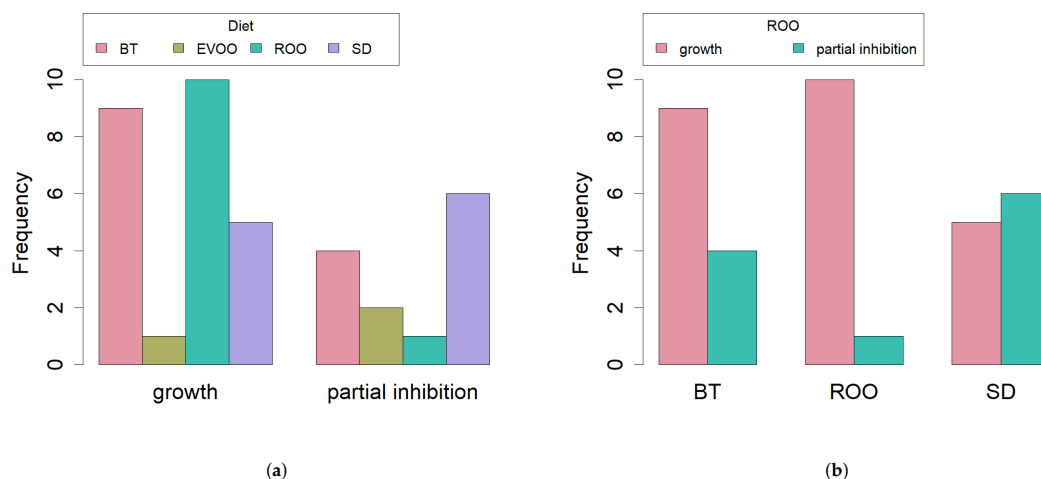


Figure 6. Bar plots of the number of strains with full growth or partial inhibition under refined olive oil; (a) according to diet (Fisher's exact test $p = 0.0692$); (b) paired data analysis of strains isolated from BT (McNemar's test $p = 0.0040$), ROO (McNemar's test $p = 0.0019$) and SD (McNemar's test $p = 0.062$). SD, standard diet; BT, butter enriched diet; EVOO, extra virgin olive oil enriched diet; ROO, refined olive oil enriched diet.

Table 4. Refined (ROO) and virgin olive oil (EVOO) antimicrobial activity. PI: Partial inhibition.

	Cholic Acid 1%		Lecitine 3%		Lecitine 3% + Cholic Acid 1%		Filter Paper	
	ROO	EVOO	ROO	EVOO	ROO	EVOO	ROO	EVOO
0S1-1	PI		PI	PI				PI
0S1-2				PI				PI
0S2-1								PI
0B1-2								PI
0B2-4	PI	PI	PI	PI				PI
0B3-1			PI					PI

Table 4. Cont.

	Cholic Acid 1%		Lecitine 3%		Lecitine 3% + Cholic Acid 1%		Filter Paper	
	ROO	EVOO	ROO	EVOO	ROO	EVOO	ROO	EVOO
0O5-2								PI
0O5-4			PI			PI		PI
0O7-3						PI		PI
0V3-1		PI						PI
0V5-1								PI
0V5-2	PI	PI		PI				PI
6S3-3				PI				PI
6S3-4								PI
6S4-1		PI		PI			PI	PI
6S4-2							PI	PI
6S5-1				PI				PI
6S5-3	PI			PI		PI	PI	PI
6B1-1								PI
6B1-2		PI						PI
6B1-3								PI
6B2-1	PI						PI	PI
6B3-1							PI	PI
6B3-2	PI	PI		PI			PI	PI
6O5-2	PI	PI	PI	PI		PI		PI
6O5-3	PI		PI					PI
6O5-4						PI		PI
6O6-1								PI
6O7-1								PI
6V3-1								PI
6V5-1						PI	PI	PI
6V6-1							PI	PI
12S6-2						PI	PI	PI
12S6-3							PI	PI
12S7-2								PI
12S7-3			PI				PI	PI
12S7-4								PI
12B1-3								PI
12B1-4								PI
12B2-4								PI
12B2-5								PI
12B3-2								PI
12B3-4						PI		PI
12B3-5							PI	PI
12O5-1		PI	PI	PI		PI		PI
12O5-2								PI
12O5-3						PI		PI
12O6-1						PI		PI
12O6-3								PI
12O7-1							PI	PI

3. Discussion

Since the development of culture-independent methods and massive sequencing technologies, the number of publications about gut microbiota and the effect of diets on the intestinal bacterial taxa has been ever increasing. This phenomenon has definitely been fuelled by the straightforwardness and high coverage of next generation sequencing, but this technique also has the drawback of only

being reliable in reaching taxon levels of genera and above. However, many of the traits important in food safety and human health are species or even strain specific. Therefore, it is important to turn back to culture-dependent techniques and strain characterization in order to address how diet and other possible factors affect strain selection and population dynamics in an intestinal environment.

One of the best bacterial groups to study these influences in is the genus *Enterococcus*. Enterococci are intestine dwellers [10], able to survive in varied environmental conditions and widely present in food and food fermentations [11]. They have coevolved with humans and are symbionts with us but can also bear important virulence factors and become dangerous nosocomial germs. It is therefore an interesting model to study how the organism copes to coexist with such a variety of beneficial and detrimental strains of the same species, presumably managing to select those that are more advantageous.

In this research work, a collection of enterococci isolated from mice fed standard chow or three fat-enriched diets were studied and evaluated for safety. The most evident result was the inability to isolate any strain from the EVOO fed mice after twelve weeks of diet, which gave place to a statistically significant lower total number of strains isolated from this group. This decrement did not correspond to a statistically different distribution of the species in any diet or time-point; we did not find differences in the species distribution probably due to the fact that all but two of the species found in our study were represented by a low number of isolates.

When studying the genetic diversity of the strains on the basis of a RAPD-PCR genotyping, three main groups of strains were found. Interestingly, all the strains isolated from HFD fed mice clustered together in G3. This group divided into three subgroups. Groups G3-1 and G3-3 included only strains isolated after twelve weeks of experiments, while G3-2 only had strains isolated after six weeks. Groups G1 and G2, on the contrary, comprised strains isolated from the SD fed group or from the other three groups but at the beginning of the experiment, before HFD were applied. This clustering indicates already a clear genotypic separation between SD and HFD and, additionally within the latest, between six and twelve weeks of HFD application.

Most of the strains (31) were positive for the gene encoding the enterococcal surface protein (*esp*), which is not surprising in strains from a faecal origin, since this protein is known to promote the primary attachment to biotic surfaces and to be involved in immune system evasion [18]. However, unexpectedly, the presence of the gene was significantly different in the various diets, this difference being greatest when comparing a standard diet against HFD fed mice. This could uncover the existence of a selecting force in those intestines with a high fat input in such a way that only the enterococci with an increased efficiency in their attachment to the host mucosa can thrive. HFD would therefore prove to have promoted the presence of one virulence factor and, in any case, it is further evidence of how diet can select the types of strains that live within the host.

The presence of decarboxylases is another undesired trait in enterococci in foods since they produce biogenic amines through amino acid decarboxylation [19] and ingestion of high amounts of these compounds can cause varied toxicological hazards [20]. In our strains, the only decarboxylase gene found was *tyr*, coding for tyrosine decarboxylase, which is very commonly found in food commodities [21,22]. No differences were found in the presence of *tyr* in the diverse diets, but there was a strong tendency to increase with respect to time, with signification at 90%. This tendency is worth considering further since it could be a trait related to the age of the host, with implications for the host's health since tyramine has been linked to hypertension and to an increment in glucose in serum [23].

When we set up the collection of strains to grow under a filter paper soaked in virgin olive oil, all of them were partially inhibited. However, when refined olive oil was used instead, a variable number of strains grew at a normal pace, showing no inhibition. This allowed us to make comparisons among the four groups of isolates from the different diets, uncovering a slight difference in the growth/partial inhibition distribution between diets, the strains isolated from ROO-fed mice being the least inhibited.

However, the most interesting result was obtained after searching for statistical signification in the growth behaviour of the strains within each diet. This would allow us to significantly state if the group of strains isolated from a certain diet was partially inhibited or not by refined olive oil, always in comparison to the partial inhibition exerted by virgin olive oil in all strains. A paired data analysis clearly stated that strains isolated from ROO and BT fed mice grew better in the presence of refined olive oil than in the presence of virgin olive oil, while strains isolated from standard fed animals were equally inhibited by both oils. This result is noteworthy since it could indicate an adaptation of the first two groups of strains to a fat-enriched environment, an adaptation that is, however, less useful when faced with virgin olive oil, where other antimicrobial factors are present in its unsaponifiable fraction, i.e., polyphenols [6,14,24].

To summarise, in this specific study, we have shown the influence of the type of diet on the selection of the virulence traits of the strains that thrive within the host. In the case we present, high fat diets seem to enhance the presence of a virulence trait (*esp*), increase the number of antibiotic resistances and improve the strain's adaptation to grow in a fatty environment. However, virgin olive oil appears once more to behave differently probably due to the additional antimicrobial activity conferred by its minority components, which eventually might have an effect on the intestinal enterococci. Although framed in a very specific experimental model, these are interesting preliminary data that open new research lines. More studies using wider cohorts and categories will reinforce and delimitate these results.

4. Materials and Methods

4.1. Isolation and Identification of Bacterial Strains

The bacterial strains used in this study belong to a collection obtained in a previous work [4]. Briefly, as described previously [4], twelve male Swiss Webster ICR (CD-1) mice (Harlan Laboratories) were divided into four groups and fed for three months with a standard chow (SD, standard laboratory mice diet A04, 3% fat, Panlab, Barcelona, Spain) or one of three high fat diets (standard chow supplemented with 20% of extra-organic virgin olive oil—EVOO, refined olive oil—ROO, or butter—BT). All experimental procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC and reviewed and approved by the Bioethics Committee of the University of Jaén. In the first, sixth and twelfth week of the experimental period, faecal samples were obtained and serial dilutions of faeces were used for plating on Tryptic Soy Agar (Scharlab, Barcelona, Spain) plus 100 mg/L polymyxin B, and on Bile Esculin Agar (Scharlab), in order to select for enterococci colonies.

Putative enterococci were selected according to observation of colony characteristics and cell morphology, Gram staining, catalase and oxidase production, growth at 10 °C and 45 °C, growth in the presence of 6.5% NaCl, at pH 9.6 and growth and esculin hydrolysis on bile-esculin agar (Scharlab). Genetic identification at species level was done by species-specific PCR and 16S rDNA sequencing as described elsewhere [25].

4.2. RAPD-PCR Amplification

Once the strain DNA was extracted, genotyping using randomly amplified PCR was carried out using the primers M13 and AP4 as described elsewhere [8]. The RAPD patterns obtained with all strains and each one of the primers were analyzed in a single dendrogram using BioNumerics software version 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) as also indicated in the above reference.

4.3. PCR Amplification of Virulence Factors

Specific PCR reactions were performed in duplicate to detect the presence of genes involved in the expression of cytolysin (*cylA*, *cylB* and *cylM*), the aggregation substance (*agg*), gelatinase (*gelE*), enterococcal surface protein (*esp*), cell wall adhesions (*efaAfs* and *efaAfm*), and sex pheromones (*cpd*, *cob* and *ccf*), as established by Eaton and Gasson [17]. The positive control used was the DNA of *E. faecalis*

P9091, since it contains in its genome all the virulence factors. In order to prove primer specificity, possible amplicons were checked by PCR simulators using *Enterococcus* and Bacteria genomic databases as templates (insilico.ehu.es and Primer-BLAST NCBI). This is also applicable to Sections 4.4 and 4.5.

4.4. Biogenic Amine Production

The potential for biogenic amine generation was detected by PCR amplification in duplicate of the amino-acid decarboxylase genes *hdc* (histidine decarboxylase), *odc* (ornithine decarboxylase) and *tdc* (tyrosine decarboxylase) as described before [26].

4.5. Antibiotic Resistance

The antibiotic susceptibility of isolates was determined using ATB ENTEROC 5 strips (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), following the manufacturer's instructions. The 50 isolates were also investigated by PCR for the presence of genetic determinants of resistance as well as presence of efflux pumps. Extended-spectrum β -lactamase: *bla*_{CTX-M} and *bla*_{CTX-M2} [27], *bla*_{PSE} [28] and *bla*_{TEM} [16], groups I and II tetracycline resistance genes [15], and efflux pumps *acrB*, *mdfA* [29] and *aadA1* [30] were tested.

4.6. Growth with Virgin and Refined Olive Oil

The antimicrobial effect of virgin and refined olive oil on the strains was measured by two methods. In the first one, the spot-on-a-lawn method, 150 μ L of overnight culture was plated per triplicate on Brain Heart Infusion agar (Scharlab) and 5 μ L axenic spots were added each containing one of the following: virgin olive oil; refined olive oil; a 50:50 mixture of 1% cholic acid and virgin or refined olive oil; a 50:50 mixture of 3% lecithin and virgin or refined olive oil; a 50:50 mixture of 1% cholic acid-3% lecithin and virgin or refined olive oil. Plates were incubated for 24 h at 37 °C and microbial growth was evaluated. For the second method, filter fragments were used. Again, 150 μ L of overnight culture was plated per triplicate on Brain Heart Infusion agar (Scharlab) and sterile 2 cm² Whatman filter fragments soaked in saline solution, virgin olive oil or refined olive oil were laid on top. Plates were incubated for 24 h at 37 °C and microbial growth was evaluated underneath. Results were defined as "growth", "partial inhibition" or "total inhibition". Partial inhibition was defined as that situation in which the surface covered by the drop or the filter does not present a continuous lawn of bacterial growth.

4.7. Statistical Studies

The number of animals in this study (three per diet) was determined in a previous work [4] where all animals on the same diet had been stabled in the same cage until the moment faeces were collected. In order to overcome the possibly low number of subjects, in this study, strains were taken as sampling units and contingency tables were designed where each cage at a certain time-point was the basis of a different category of the variable "diet".

To test whether or not the variable "species" has the same distribution in the different categories of the variable "diet", and in the different categories of the variable "time", the exact Fisher's test for contingency tables was performed as some of the expected counts were below 5 and therefore the χ^2 test of homogeneity is not suitable. Similar analyses were carried out to identify whether there was an influence of "diet" or "time" in the variables *tdc* and *esp*, as well as to study whether "diet" had an influence on "growth/partial inhibition" on the different oils and procedures.

To investigate the effect of the variables "diet" and "time" on the number of enterococci strains, a Poisson regression model was fitted. As "diet" and "time" are categorical variables, dummy variables were included in the model in order to evaluate the effect that the presence or absence of the different levels of the categorical variables may have on the number of strains.

To test equality of the distribution of the variable "% of antibiotic resistances" according the type of diet we used the Kruskal–Wallis test as the Shapiro–Wilk test of normality rejected the normality hypothesis. The same procedure was performed to study the equality of the distribution of the variable "% of antibiotic resistances" according to the variable "time". Provided that significant differences

were detected, we applied post hoc Duncan tests for pairwise multiple comparisons with Bonferroni's adjustment in the *p*-values.

To study whether or not there are differences in the antimicrobial effect of ROO and EVOO within each specific diet, only the growth/partial inhibition of the strains isolated from that group of mice was observed. As the results are paired nominal data, the McNemar test was used to check the statistical significance.

Author Contributions: Conceptualization, I.P. and M.M.-C.; Data curation, A.M.M.-R.; Funding acquisition, I.P. and M.M.-C.; Investigation, B.S., A.C. and M.H.; Methodology, A.M.M.-R., A.G. and M.M.-C.; Project administration, I.P. and M.M.-C.; Resources, A.G.; Supervision, A.C., A.G. and M.M.-C.; Validation, A.G. and M.M.-C.; Writing—Original draft, M.M.-C.; Writing—Review & editing, A.M.M.-R. and M.M.-C.

Funding: This research was funded by University of Jaén (PP2009/13/03) (to IP) and Junta de Andalucía (PI Excelencia_2010 AGR 6340) (to M.M.-C).

Acknowledgments: We would like to acknowledge Aceites Soler Romero for providing us with their extra virgin olive oil and Peter Cassidy for revising the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Zhang, C.; Zhang, M.; Wang, S.; Han, R.; Cao, Y.; Hua, W. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J.* **2010**, *4*, 232–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Albenberg, L.G.; Wu, G.D. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 1564–1572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hidalgo, M.; Prieto, I.; Abriouel, H.; Cobo, A.; Benomar, N.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut microbiota. Comparison to butter. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 553–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Prieto, I.; Hidalgo, M.; Segarra, A.B.; Martínez-Rodríguez, A.M.; Cobo, A.; Ramírez, M.; Abriouel, H.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Influence of a diet enriched in virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0190368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Martínez, N.; Prieto, P.; Hidalgo, M.; Segarra, A.B.; Martínez-Rodríguez, A.M.; Cobo-Molinos, A.; Ramírez, M.; Gálvez, A.; Martínez-Cañamero, M. Refined versus extra virgin olive oil high fat diet impact on intestinal microbiota of mice and its relation to different physiological variables. *Microorganisms* **2019**, *7*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Franz, C.M.; Huch, M.; Abriouel, H.; Holzapfel, W.; Gálvez, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 125–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ben Omar, N.; Castro, A.; Lucas, R.; Abriouel, H.; Yousif, N.M.K.; Franz, C.M.A.P.; Holzapfel, W.H.; Pérez-Pulido, R.; Martínez-Cañamero, M.; Gálvez, A. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* **2004**, *27*, 118–130. [[CrossRef](#)]
9. Ogier, J.C.; Serró, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *126*, 291–301. [[CrossRef](#)]
10. Tannock, G.W.; Cook, G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*; Gilmore, M.S., Ed.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2002; pp. 101–132.
11. Abriouel, H.; Ben Omar, N.; Cobo-Molinos, A.; Lucas López, R.; Grande, M.J.; Martínez-Viedma, P.; Ortega, E.; Martínez-Cañamero, M.; Gálvez, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *123*, 38–49. [[CrossRef](#)]

12. Pérez-Pulido, R.; Omar, N.B.; Lucas, R.; Abriouel, H.; Martínez-Cañamero, M.; Gálvez, A. Resistance to antimicrobial agents in lactobacilli isolated from caper fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2005**, *88*, 277–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cobo-Molinos, A.; Abriouel, H.; Omar, N.B.; López, R.L.; Galvez, A. Detection of ebp (endocarditis- and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *126*, 123–126. [[CrossRef](#)]
14. Medina, E.; de Castro, A.; Romero, C.; Brenes, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *12*, 4954–4961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ng, L.K.; Martin, I.; Alfa, M.; Mulvey, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes.* **2001**, *15*, 209–215. [[CrossRef](#)]
16. Sáenz, Y.; Briñas, L.; Domínguez, E.; Ruiz, J.; Zarazaga, M.; Vila, J.; Torres, C. Mechanisms of Resistance in Multiple-Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3996–4001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Eaton, T.J.; Gasson, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 1628–1635. [[CrossRef](#)]
18. Toledo-Arana, A.; Valle, J.; Solano, C.; Arrizubieta, M.J.; Cucarella, C.; Lamata, M. The enterococcal surface protein, esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4538–4545. [[CrossRef](#)]
19. Gardini, F.; Martuscelli, M.; Caruso, M.C.; Galgano, F.; Crudele, M.A.; Favati, F.; Guerzoni, M.E.; Suzzi, G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *64*, 105–117. [[CrossRef](#)]
20. Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M.C.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, M.T.; Hernández-Jover, T. Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann. Falsif. Expert Chim. Toxicol.* **1995**, *88*, 119–140.
21. Pérez-Pulido, R.; Abriouel, H.; Ben Omar, N.; Lucas, R.; Martínez-Cañamero, M.; Gálvez, A. Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 2070–2077. [[CrossRef](#)]
22. Giraffa, G.; Carminati, D.; Neviani, E. Enterococci isolated from dairy products: A review of risks and potential technological use. *J. Food Protect.* **1997**, *60*, 732–738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Shalaby, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* **1996**, *29*, 675–690. [[CrossRef](#)]
24. Pacheco, Y. M.; López, S.; Bermúdez, B.; Abia, R.; Muriana, F.J. Extra-virgin vs. refined olive oil on postprandial hemostatic markers in healthy subjects. *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 1421–1422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Abriouel, H.; Lucas, R.; Ben Omar, N.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Martínez-Cañamero, M.; Gálvez, A. Enterocin AS-48RJ: A variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* **2005**, *28*, 383–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Martín-Platero, A.M.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *132*, 24–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bertrand, S.; Weill, F.X.; Cloeckert, A.; Vrints, M.; Mairiaux, E.; Praud, K.; Dierick, K.; Wildemaue, C.; Godard, C.; Butaye, P.; et al. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 2897–2903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Chiu, CH.; Su, L.H.; Chu, CH.; Wang, M.H.; Yeh, C.M.; Weill, F.X.; Chu, C. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 2354–2358. [[CrossRef](#)]

29. Swick, M.C.; Morgan-Linnell, S.K.; Carlson, K.M.; Zechiedrich, L. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 921–924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Guerra, B.; Soto, S.M.; Argüelles, J.M.; Mendoza, M.C. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1305–1308. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Parte II

-
- 4.2. Producción de bacteriocinas**
 - 4.3. Estudio genético para la caracterización taxonómica MLST (Multilocus Sequence Typing) y estudio algorítmico eBURSTv3**
 - 4.4. Identificación y análisis de las secuencias ARNr 16 V3-V5**
 - 4.5. Caracterización comparativa de la proteómica de cepas de *Enterococcus***

4.2. Producción de bacteriocinas

Tras incubar las cepas estudiadas junto con los patógenos indicadores inoculados mediante sobrecapas y comprobar que había crecimiento, se midieron los halos desde el borde del crecimiento de la masa bacteriana de la cepa estudiada hasta el borde donde empezaba el crecimiento de la bacteria patógena indicadora, obteniéndose una medida del halo en mm. De todas nuestras cepas ensayadas, aquellas que desarrollaban un halo inhibidor fueron las siguientes (Tabla 6):

Tabla 6. Resultados de la producción de bacteriocinas de las cepas estudiadas mediante medición de halos de inhibición frente a bacterias patógenas indicadoras.

Bacterias patógenas indicadoras				
Cepas	<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 976	<i>Enterococcus faecalis</i> S47	<i>Escherichia coli</i> CECT 4972	<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032
S1-1	2 mm			
S5-1		3 mm		
6B1-2	2mm			
6B2-1		1 mm		
6B3-1		1 mm		
12B1-4	3mm			
12B3-5	2 mm			1 mm
6O5-3			1 mm	

6V5-1

2 mm

Se obtuvieron resultados positivos con todos los patógenos excepto con *Salmonella choleraesuis* CECT 4300, como puede apreciarse en la tabla. También se observa mayor sensibilidad a la acción microbiana de las bacteriocinas por parte de las bacterias Gram positivas, especialmente en el caso de *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

4.3. Estudio genético para la caracterización taxonómica MLST (Multilocus Sequence Typing) y estudio algorítmico eBURTSv3

Debido a la prevalencia de las cepas de *Enterococcus faecalis* en el conjunto de los enterococos de nuestra colección, decidimos llevar a cabo un genotipado mediante la técnica MLST con objeto de saber en qué secuencias tipo se encuadraban nuestros aislados.

Una vez secuenciados en cada cepa los 7 genes housekeeping de la técnica MLST, caracterizados y alineados con la base de datos, obtuvimos los siguientes perfiles alélicos (Tabla 7). En la Tabla 7 se incluye también una columna con los resultados de un análisis BLAST orientativo que realizamos con todas las secuencias, obteniendo una identidad del 100% en todos los casos.

Tabla 7. Genes relacionados con sus alelos correspondientes en cada una de las cepas estudiadas.

Cepa aislada	Genes y alelos							ST	Cepa determinada
	gdh	gyd	pst S	gki	aro E	xpt	yqil		
0S1-1	4	5	16	4	1	1	4	ST9	<i>Enterococcus faecalis</i> KB1
6S5-1	4	6	16	4	1	1	4	ST9	<i>Enterococcus faecalis</i> KB1
6S5-3	4	6	16	4	1	1	4	ST9	<i>Enterococcus faecalis</i> KB1
0B2-4	3	6	23	12	9	10	7	ST40	<i>Enterococcus faecalis</i> D32
6B1-2	3	6	23	12	1	14	7	ST150	<i>Enterococcus faecalis</i> 4928STDY7071263
12B2-4	3	6	23	12	9	10	7	ST40	<i>Enterococcus faecalis</i> D32
12B3-4	3	6	23	12	9	10	7	ST40	<i>Enterococcus faecalis</i> D32
12B3-5	3	6	23	4	9	10	7	ST40	<i>Enterococcus faecalis</i> D32
0O5-4	3	6	23	12	9	10	co rta	ST40	<i>Enterococcus faecalis</i> D32
0O7-3	4	6	16	4	1	1	4	ST9	<i>Enterococcus faecalis</i> KB1
6O5-3	3	6	23	12	9	10	7	ST40	<i>Enterococcus faecalis</i> D32
6O5-4	3	6	23	12	9	10	7	ST40	<i>Enterococcus faecalis</i> D32
6O6-1	3	6	23	12	9	10	7	ST40	<i>Enterococcus faecalis</i> D32
0V5-2	4	6	16	4	1	1	4	ST9	<i>Enterococcus faecalis</i> KB1
6V5-1	3	6	23	12	9	10	7	ST40	<i>Enterococcus faecalis</i> D32

Comparando las cepas desde el punto de vista de las dietas de las que procedían, podemos observar que tanto las cepas de los animales alimentados con aceite de oliva, refinado y virgen, como las de los alimentados con mantequilla presentaron mayoritariamente identidad con *Enterococcus faecalis* D32, mientras que las cepas de los animales alimentados con dieta estándar se identificaron con otro tipo de cepa, *Enterococcus faecalis* KB1. Tan solo dos de las cepas aisladas de dietas ricas en aceite de oliva virgen y refinado, 0V5-2 y 0O7-3, se relacionaron con la cepa presente de forma mayoritaria en el grupo estándar.

Si comparamos las cepas presentes en la microbiota intestinal en relación al tiempo de exposición de los animales a la dieta, podemos observar que en los animales del grupo estándar aparecieron siempre aislados relacionados con la cepa *Enterococcus faecalis* KB1, mientras que si observamos los animales tratados con dietas altas en grasa a diferentes tiempos, comprobamos que a tiempo 0 en mantequilla y refinado se aislaron sendas cepas del tipo *Enterococcus faecalis* D32, aunque en aceite de oliva refinado también apareció otra cepa alineada con *Enterococcus faecalis* KB1. Por último, al inicio del experimento encontramos un aislado tipo KB1 a partir de la dieta enriquecida en aceite de oliva virgen. Con el aumento del tiempo de exposición, a las 6 semanas observamos que en todos los animales

alimentados con aceite de oliva virgen o refinado, se detectaron en su microbiota intestinal cepas del tipo *Enterococcus faecalis* D32, frente al grupo estándar en el cual se mantenían solo aislados similares a la cepa *Enterococcus faecalis* KB1. Finalmente, a las 12 semanas sólo se detectaron dos cepas alineadas con D32 en la dieta alta en mantequilla, sin poderse aislar ningún *E. faecalis* de los otros tres grupos de ratones.

Usando la base de datos de MLST, relacionamos cada cepa obtenida con una secuencia tipo ST (sequence type), obteniendo como resultado que las cepas cuyo BLAST se corresponde con *Enterococcus faecalis* KB1 se relacionan con la secuencia tipo ST9, mientras que las cepas alineadas con *Enterococcus faecalis* D32 se relacionan con la secuencia tipo ST40. Finalmente, una tercera cepa, aislada sólo una vez del grupo de mantequilla a las 6 semanas, corresponde al tipo ST150.

Cuando incluimos estos datos en el algoritmo eBURSTv3, comprobamos que las cepas ST9 se agrupan en un mismo complejo clonal (CC9), mientras que las cepas ST40 y ST150 están relacionadas entre sí, perteneciendo al mismo complejo clonal CC40 (Figura 2).

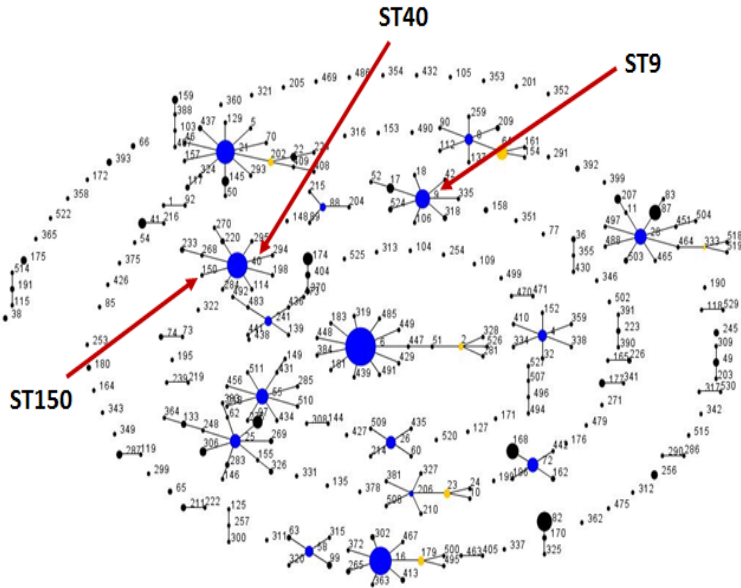


Fig. 3. Diagrama del estudio e-BURSTv3. Los ST que difieren en un alelo están conectados. Los colores indican los complejos clonales fundadores primarios (azul) y secundarios (amarillo). Las áreas de cada uno de los círculos indican la prevalencia del ST en la base de datos. Los ST 9, 40 y 150 están marcados con flechas.

4.4. Identificación y análisis de las secuencias ARNr 16S V3-V5

En paralelo al estudio anterior y puesto que disponíamos de un estudio metagenómico previo (Prieto *et al.*, 2018; Martínez *et al.*,

2019) intentamos localizar la cepa aislada a tiempo final 12B3-5 entre los OTU secuenciados.

Todas las secuencias metagenómicas anotadas como *E. faecalis* al final del experimento se sometieron a un análisis de Kruskal-Wallis para confirmar la mayor presencia de esta especie en el grupo de ratones alimentados con mantequilla, y la diferencia fue claramente significativa ($p = 0.014$) con comparaciones posteriores por pares que revelan diferencias significativas específicamente entre BT y SD ($p = 0.025$), aunque también se detecta una tendencia importante con significación al 90% ($p < 0.1$) entre BT y EVOO o BT y ROO. La Figura 3 muestra la representación de la gráfica de caja del porcentaje de secuencias de *E. faecalis* en los cuatro grupos.

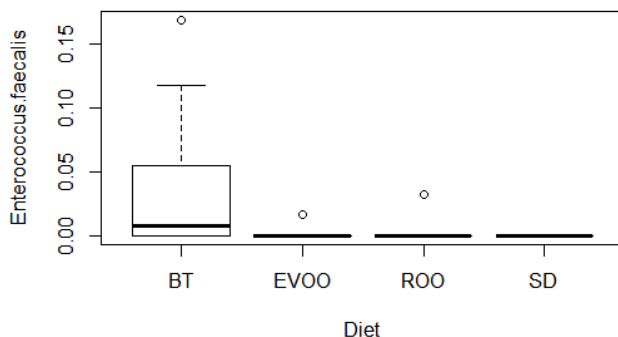


Fig. 4. Representación en diagrama de caja de la distribución porcentual de *E. faecalis* entre muestras fecales de ratones alimentados con una dieta enriquecida con mantequilla (BT), aceite de oliva virgen (EVOO), aceite de oliva refinado (ROO) o comida estándar (SD) ($p = 0.014$).

Para identificarla en los datos metagenómicos disponibles, la región V3-V5 del gen ARNr 16S de la cepa 12B3-5 fue secuenciada con objeto de poder alinear la secuencia resultante con las obtenidas previamente para *E. faecalis* por pirosecuenciación (Prieto *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2019). La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos al comparar 12B3-5 con todas las secuencias de *E. faecalis* presentes en el estudio metagenómico.

Tabla 8. Número de copias de la secuencia 12B3-5 ARNr 16S V3-V5 (entre paréntesis) con respecto a las copias totales de *E. faecalis* en los datos de muestras fecales metagenómicas (Prieto *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2019). BT: dieta enriquecida con mantequilla; EVOO: dieta enriquecida con aceite de oliva virgen; ROO: aceite enriquecido refinado; SD: dieta estándar. W: semanas de experimento.

Ratón	BT _{0w}	BT _{12w}	EVOO _{0w}	EVOO _{12w}	ROO _{0w}	ROO _{12w}	SD _{0w}	SD _{12w}
1	0	0	n.d.	0	0	0	0	0
2	11 (7)	0	n.d.	0	0	0	0	0
3	0	7 (7)	n.d.	0	0	0	0	0
4	1 (0)	0	0	2 (0)	0	0	0	0
5	0	22 (22)	0	0	0	0	0	0
6	2 (0)	0	0	0	0	0	0	0
7	n.d.	1 (1)	0	0	0	0	0	0
8	n.d.	5 (5)	0	0	0	3 (0)	0	0
9	0	14 (14)	n.d.	0	0	0		

Como se indica en la tabla, la mitad de las secuencias detectadas en muestras fecales de ratones alimentados con mantequilla a las 0 semanas correspondían a la de 12B3-5 y estaban restringidas a un solo ratón. Sin embargo, después de 12 semanas de experimento, todas las secuencias detectadas fueron idénticas, coincidían con la de nuestra cepa y se encontraron en cinco de los nueve ratones. Esto no

sucedió en las otras dietas donde *E. faecalis* se detectó solo en dos ratones, uno del grupo EVOO con dos secuencias y uno del grupo ROO con tres, y ninguna de ellas coincidía con la de 12B3-5. La dieta SD no presentó ninguna secuencia de *E. faecalis*.

4.5. Caracterización comparativa de la proteómica de cepas de *Enterococcus*

En base a los resultados obtenidos, se seleccionaron dos cepas, como representantes de los dos MLSTs mayoritariamente detectados, con objeto de llevar a cabo un estudio proteómico. Como representante del ST9 se eligió la cepa 0V5-2, mientras que la cepa 12B3-5 fue de nuevo seleccionada como representación del ST40.

4.5.1. Análisis del perfil unidimensional (1D) de los extractos de proteínas de Enterococcus

Los extractos proteicos de ambas cepas se compararon primero entre sí en un gel de electroforesis unidimensional obteniendo como resultados perfiles iguales, lo que cabía esperar por tratarse de la misma especie.

4.5.2. Análisis del perfil bidimensional (2D) de los extractos de proteínas de *Enterococcus*

Una vez comprobamos que los resultados del perfil unidimensional eran los esperados y el perfil proteico había sido satisfactorio, se revelaron los extractos en un gel de perfil bidimensional, obteniéndose los resultados que podemos observar en la Figura 4. El análisis comparativo realizado con el programa PDQuest™ puso de manifiesto 164 spots que no eran comunes para los dos geles, con 76 específicos para 12B3-5 y 88 para 0V5-2.

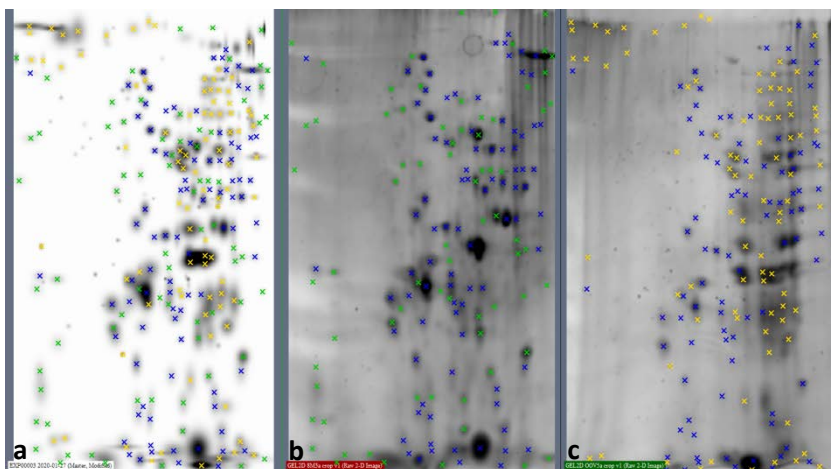


Fig. 5. Comparación de los spots obtenidos en el análisis bidimensional de los extractos proteícos. a) Superposición de ambos geles, b) 12B3-5, c) 0V5-2. Las cruces verdes marcan los spots específicos de 12B3-5; las cruces amarillas

marcan los spots específicos de 0V5-2; las cruces azules marcan los spots que son coincidentes.

4.5.3. *Análisis de los extractos proteicos mediante Espectrofotometría de Masas Orbitrap y procesamiento de datos*

La diferente migración de un importante número de péptidos en los geles 2D nos animó a utilizar la espectrometría de masas para obtener el perfil proteico de nuestras dos cepas. Los resultados obtenidos con esta técnica revelaron que el extracto proteico de la cepa 0V5-2 contenía 37910 péptidos que codifican 7708 proteínas. Mientras que del extracto proteico de la cepa 12B3-5, se obtuvieron 32333 péptidos que codifican 6431 proteínas.

Los archivos obtenidos para ambas cepas a partir de la base de datos de *E. faecalis* en Uniprot.org se compararon entre sí para poner de manifiesto péptidos que fueran específicos de una u otra. Como resultado se obtuvieron un total de 280 entradas no repetidas. Estos péptidos se agruparon de acuerdo con su posible función según la información disponible en la propia base de datos y en la bibliografía, siguiendo el protocolo establecido por Rosales, 2019. De acuerdo con ello se establecieron las siguientes categorías de funciones con las que las proteínas parecían estar relacionadas:

- o Bacteriófagos
- o ATP
- o Estructura celular
- o Defensa
- o Material genético
- o Metabolismo proteico
- o Reproducción
- o Transporte
- o Otras funciones más específicas
- o Proteínas sin caracterizar o con función desconocida

El análisis de las funciones de las proteínas procedentes de las cepas de *Enterococcus faecalis* 12B3-5 y OV2-5 se muestra en la Tabla 9 y se representa en las Figuras 5 y 6 respectivamente. La Tabla 9 indica los diferentes porcentajes de entradas específicas para cada cepa y categoría sobre el total de entradas singulares de la cepa y permite una comparación de cada categoría entre las dos cepas.

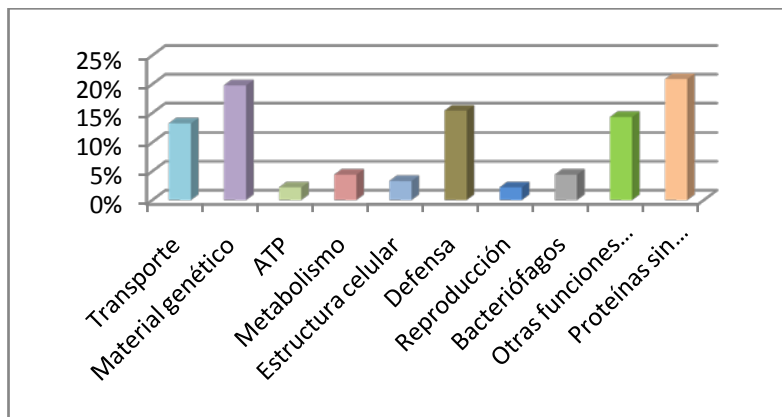


Fig. 6. Representación gráfica del porcentaje de entradas singulares para cada una de las categorías establecidas en la cepa 12B3-5 sobre el total de proteínas no compartidas.

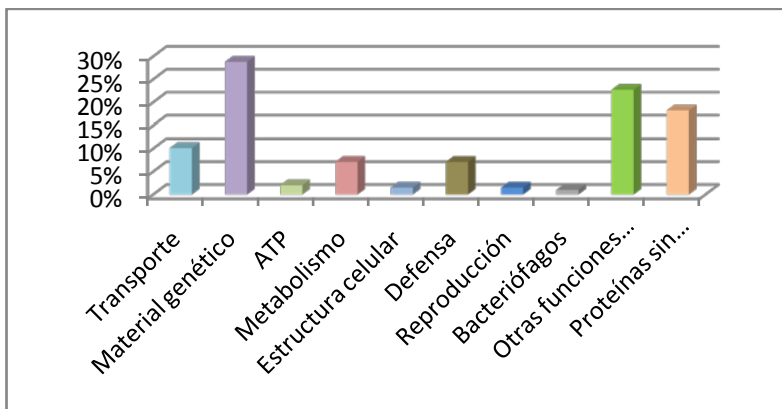


Fig. 7. Representación gráfica del porcentaje de entradas singulares para cada una de las categorías establecidas en la cepa 0V5-2 sobre el total de proteínas no compartidas.

Tabla 9. Porcentaje de entradas específicas clasificadas en cada una de las diferentes categorías en las cepas 12B3-5 y OV2-5.

FUNCIÓN		% 12B3-5	% OV5-2
	Transporte	13,2	10,1
	Material genético	19,8	28,8
	ATP	2,2	2,0
	Metabolismo	4,4	7,1
	Estructura celular	3,3	1,5
	Defensa	15,4	7,1
	Reproducción	2,2	1,5
	Bacteriófagos	4,4	1,0
	Otras funciones más específicas	14,3	22,7
	Proteínas sin caracterizar o con función desconocida	20,9	18,2
Todas		100%	100%

Como se observa en las dos gráficas y en la Tabla 9, ambas cepas tienen un perfil de distribución de entradas singulares similar, excepto en las categorías de estructura celular, defensa y bacteriófagos, donde los porcentajes correspondientes de la cepa

12B3-5 superan el doble de los de la cepa 0V5-2, siendo más de cuatro veces superior en el caso de la última categoría.

Discusión

Desde el desarrollo de los métodos independientes del cultivo y las tecnologías de secuenciación masiva, el número de publicaciones sobre la microbiota intestinal y el efecto de las dietas en los taxones bacterianos intestinales han ido en aumento. Este fenómeno definitivamente se ha visto impulsado por la sencillez y la alta cobertura de lo que se ha llamado “Next Generation Sequencing”, pero esta técnica también tiene el inconveniente de ser fiable sólo para taxones a nivel de género o superiores. Sin embargo, muchos de los rasgos importantes en la seguridad alimentaria y la salud humana vienen definidos a nivel de especie o incluso de cepas específicas. Por lo tanto, es importante volver a las técnicas dependientes del cultivo y a la caracterización de los aislados para abordar cómo la dieta y otros posibles factores afectan a la selección de cepa y la dinámica de la población en un ambiente intestinal. Uno de los mejores grupos bacterianos para estudiar estas influencias es el género *Enterococcus*. Los enterococos son habitantes del intestino (Tannock and Cook, 2002), capaces de sobrevivir en condiciones ambientales variadas y ampliamente presentes en alimentos y fermentaciones alimentarias (Abriouel *et al.*, 2008). Han evolucionado con los humanos y son simbioses con nosotros, pero también pueden portar importantes factores de virulencia y convertirse en gérmenes nosocomiales peligrosos. Por lo tanto, es un modelo interesante para estudiar

cómo el organismo se las arregla para coexistir con una variedad de cepas beneficiosas y perjudiciales de la misma especie, presumiblemente logrando seleccionar aquellas que son más ventajosas para él.

En este trabajo de investigación, se ha estudiado y evaluado la seguridad de una colección de 50 enterococos aislados de ratones alimentados con comida estándar o con tres dietas enriquecidas en diferentes tipos de grasa. El resultado más evidente ha sido la incapacidad de aislar cualquier cepa de los ratones alimentados con aceite de oliva virgen después de doce semanas de dieta, lo que dio lugar a un menor número total de cepas aisladas en este grupo de manera estadísticamente significativa. Esta disminución no correspondía a una distribución significativamente diferente de las especies con respecto a la dieta o al tiempo; no encontramos diferencias en la distribución de especies, probablemente, debido al hecho de que todas menos dos de las especies encontradas en nuestro estudio estaban representadas por un bajo número de aislamientos. Al estudiar la diversidad genética de las cepas sobre la base de un genotipado RAPD-PCR, se encontraron principalmente tres agrupamientos de cepas. Notablemente, todas las cepas aisladas de ratones alimentados con dietas enriquecidas en grasa (HFG) se agruparon en G3. Este grupo se dividió en tres subgrupos. Los grupos

G3-1 y G3-3 incluyeron solo cepas aisladas después de doce semanas de experimentos, mientras que G3-2 solo tenía cepas aisladas después de seis semanas. Los grupos G1 y G2, por el contrario, comprendían cepas aisladas del grupo alimentado con dieta estándar (SD) o de los otros tres grupos al comienzo del experimento, antes de aplicar las dietas altas en grasa. Este agrupamiento indica ya una clara separación genotípica entre SD y HFD y, adicionalmente en las últimas, entre seis y doce semanas de aplicación de HFD.

La mayoría de las cepas fueron positivas para el gen que codifica la proteína de superficie enterocócica (*esp*), lo que no es sorprendente en cepas de origen fecal, ya que se sabe que esta proteína promueve la unión primaria a las superficies bióticas y está involucrada en la evasión del sistema inmune (Toledo *et al.*, 2001). Sin embargo, inesperadamente, la presencia del gen fue significativamente diferente en las distintas dietas, siendo esta diferencia mayor cuando se compara una dieta estándar con ratones alimentados con HFD. Esto podría revelar la existencia de un proceso selectivo en los intestinos con alto aporte de grasa, de tal manera que solo los enterococos con una mayor eficiencia en su unión a la mucosa del huésped puedan prosperar. El hecho de haber tomado una dieta alta en grasa, por lo tanto, habría promovido la prevalencia de un factor

de virulencia y es una prueba más de cómo la dieta puede seleccionar los tipos de cepas que habitan dentro del huésped.

La presencia de descarboxilasas es otro rasgo no deseado de los enterococos en los alimentos, ya que producen aminas biógenas a través de la descarboxilación de aminoácidos (Gardini *et al.*, 2001) y la ingestión de grandes cantidades de estos compuestos puede producir diversos riesgos toxicológicos (Mariné-Font *et al.*, 1995). En nuestras cepas, el único gen de descarboxilasa encontrado fue *tyr*, que codifica la tirosina descarboxilasa, que se encuentra muy comúnmente en productos alimenticios (Pérez-Pulido *et al.*, 2006; Giraffa *et al.*, 1997). No se encontraron diferencias en la presencia de *tyr* en las distintas dietas, pero hubo una fuerte tendencia a aumentar con respecto al tiempo, con una significación del 90%, en la dieta estándar. Vale la pena considerar más esta tendencia puesto que podría resultar ser un rasgo relacionado con la edad del huésped, con implicaciones para su salud ya que se ha vinculado la tiramina con la hipertensión y con un aumento de la glucosa en sangre (Shalaby, 1996).

Cuando estudiamos el crecimiento de la colección de cepas bajo un papel de filtro empapado en aceite de oliva virgen, todas fueron parcialmente inhibidas. Sin embargo, cuando se usó aceite de oliva refinado (ROO), encontramos que un número variable de cepas

creció a ritmo normal, sin mostrar ninguna inhibición. Esto nos permitió hacer comparaciones entre los cuatro grupos de aislados de las diferentes dietas, descubriendo una ligera diferencia en la distribución de crecimiento/inhibición parcial entre las dietas, siendo las cepas aisladas de ratones alimentados con ROO las menos inhibidas. Sin embargo, el resultado más interesante se obtuvo después de estudiar la significación estadística al comparar el crecimiento en ambos aceites de las cepas dentro de cada dieta. Esto nos permitía establecer significativamente si el grupo de cepas aisladas de una dieta determinada había sido parcialmente inhibido o no por el aceite de oliva refinado, siempre en comparación con la inhibición parcial ejercida por el aceite de oliva virgen en todas las cepas. Es decir, sabríamos si las cepas aisladas de una determinada dieta crecen significativamente mejor con aceite de oliva refinado que con oliva virgen. Un análisis de datos apareados indicó claramente que las cepas aisladas de ratones alimentados con ROO y BT crecieron mejor en presencia de aceite de oliva refinado que en presencia de aceite de oliva virgen, mientras que las cepas aisladas de animales alimentados con dieta estándar fueron igualmente inhibidas por ambos aceites. Este resultado es notable, ya que podría indicar una adaptación de los dos primeros grupos de cepas a un ambiente enriquecido en grasa, una adaptación que, sin embargo, es

menos útil cuando se enfrenta con aceite de oliva virgen, donde otros factores antimicrobianos, principalmente polifenoles, están presentes en su fracción insaponificable (Martínez *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2006).

En resumen, en este estudio en concreto, hemos demostrado la influencia del tipo de dieta en la selección de los rasgos de virulencia de las cepas que prosperan dentro del huésped. En el caso que presentamos, las dietas altas en grasas parecen aumentar la presencia de un rasgo de virulencia (*esp*), aumentar el número de resistencias a los antibióticos y mejorar la adaptación de la cepa para crecer en un ambiente graso. Sin embargo, el aceite de oliva virgen parece volver a comportarse de manera diferente, probablemente debido a la actividad antimicrobiana adicional conferida por sus componentes minoritarios, que eventualmente podrían tener un efecto sobre los enterococos intestinales.

De todas las diferentes especies presentes en nuestra colección, *E. faecalis* nos pareció la más interesante, no sólo por ser la que presentaba mayor número de cepas, junto con *E. casseliflavus*, sino principalmente por haber presentado diferencias significativas entre dietas a nivel de secuencias ribosómicas en un estudio metagenómico. Además, *E. faecalis* es bien conocido por su prevalencia comensal y ambiental, pero también por el papel cada

vez mayor que ciertos genotipos tienen en infecciones oportunistas y nosocomiales. Por ello decidimos centrar la continuación de nuestro estudio en los aislados de esta especie, mediante un análisis más profundo usando la técnica “Multilocus Sequence Type” y mediante caracterización proteómica de determinadas cepas representativas. Cuando se sometieron al análisis MLST, todos los aislados pertenecían a tres tipos de secuencias: ST9, ST40 y ST150. Un análisis BLAST identificó todos los aislados de ST9 con *E. faecalis* KB1 (100% de identidad) mientras que los aislamientos ST40 eran 100% idénticos a *E. faecalis* D32. Un tercer aislado, presente sólo en un animal y genotipado como ST150, presentó 100% identidad con una cepa muy próxima a la D32, *E. faecalis* 4928STDY7071263. Dos STs diferentes nunca se aislaron del mismo animal en el mismo punto temporal, aunque una búsqueda en nuestra base de datos metagenómicos descubrió diferentes secuencias de *E. faecalis* en un ratón alimentado con mantequilla al comienzo del experimento, la mitad de ellas con una coincidencia del 100% con la secuencia V3-V5 de la cepa 12B3-5. A pesar de la variabilidad en el punto de partida, esta secuencia V3-V5 fue la única encontrada entre las lecturas en los datos metagenómicos de los animales alimentados con mantequilla al final del experimento.

Aunque los aislamientos comensales y clínicos de *E. faecalis* no parecen ser tan evolutivamente distintos como los conocidos de *E. faecium*, en ambas especies existen ciertos complejos clonales (CC) que parecen estar asociados de manera estadísticamente significativa con mayor número de aislados derivados de hospitales (Palmer *et al.*, 2014). Sin embargo, en el caso de *E. faecalis*, al contrario que en *E. faecium*, todos los CCs contienen tanto aislamientos clínicos como comensales y la incidencia de cepas invasoras oportunistas varía en las diferentes regiones geográficas publicadas. A pesar de esto, ciertos tipos de secuencias parecen estar más extendidos que otros en los informes de brotes nosocomiales. Inicialmente, se informó que CC9, el complejo clonal donde se agrupa ST9, estaba relacionado con cepas derivadas de hospitales (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006) con alta presencia de resistencias a antibióticos (McBride *et al.*, 2007). Sin embargo, en años posteriores, los estudios sobre las cepas recientemente aisladas en Europa pusieron de manifiesto el éxito epidemiológico de otras CCs, desplazando a CC9 como linaje potencialmente peligroso (Kuch *et al.*, 2012) y posicionando CC9 también como cepas comensales, aisladas por ejemplo de leche porcina (Jiménez *et al.*, 2013) o de aves migratorias (Ben Yahia *et al.*, 2018). Por su parte, ST40 ya se describió originariamente como el ST más frecuente en una gran colección (McBride *et al.*, 2007), se

definió como un clon epidémico emergente, probablemente el más frecuente en Europa Central (Kawalec *et al.*, 2007), y su presencia en los informes epidemiológicos se ha mantenido de forma constante en Europa (Song *et al.*, 2013; Werner *et al.*, 2012) y en otros lugares (Quiñones *et al.*, 2009). Más recientemente, un análisis exhaustivo de 42 aislamientos ST40 de diferentes fuentes y orígenes geográficos (Zischka *et al.*, 2015), incluida una cepa D32 cuyo genoma se había secuenciado completamente (Zischka *et al.*, 2012), proporcionó nueva información sobre esta secuencia tipo. Según estos autores, existe un alto nivel de similitud en toda la colección, y el estudio de sus diferencias indicó que la recombinación dentro del linaje clonal era menor que en otros CCs. No se encontraron diferencias entre cepas de antecedentes comensales y clínicos, o de origen animal o humano. Además, los autores mostraron que la cepa D32 tiene una mayor capacidad de adherencia a las líneas celulares humanas, un mayor potencial patogénico y un crecimiento más rápido en un modelo murino de bacteriemia en comparación con un ST40 no-D32. En nuestro caso, no se han encontrado diferencias entre estos dos conjuntos de cepas (ST9 y ST40), ni con respecto a la resistencia a los antibióticos, ni en los factores de virulencia o la producción de aminas biógenas, ni en la producción de bacteriocinas. A pesar de esto, es cierto que en concreto 12B3-5 (muy relacionada con D32) es

la única cepa que muestra actividad antimicrobiana contra ambos *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*, lo que podría indicar cierta capacidad para competir con otros taxones intestinales. La cepa 12B3-5 también alberga menos factores patogénicos que otras cepas, ya que es resistente solo a la rifampicina y es negativa para el factor *esp*, en contraste con la tendencia significativa que también hemos observado para las cepas aisladas de ratones alimentados con una dieta alta en grasas.

Para continuar nuestro estudio de manera más profunda, se eligieron dos cepas como representantes de sus respectivos STs para continuar con una caracterización proteómica. Los dos archivos obtenidos de las bases de datos correspondientes se compararon en busca de entradas no compartidas. Se encontraron un total de 280 entradas específicas de una de las dos cepas, se clasificaron de acuerdo con las supuestas funciones encontradas en la literatura y se contrastaron los porcentajes obtenidos con respecto al total de entradas no compartidas de cada archivo. Solo en tres categorías las cifras de una cepa excedieron el doble de la otra: el porcentaje de entradas relacionadas con la estructura celular, el de las relacionadas con bacteriófagos (cuatro veces más) y el de las de defensa, con un mayor porcentaje de 12B3-5 en todos los casos. La última categoría, defensa, parecía de especial interés para explicar el comportamiento

de una cepa que había sido capaz de sobrevivir y superar otros competidores en el entorno de hospedadores murinos que habíamos diseñado. Entre las entradas de 12B3-5 en esta categoría, aparecían varios péptidos con actividad antimicrobiana, como la proteína BacG (Rajavel *et al.*, 2013), involucrada en la síntesis del antibiótico dipeptídico ribosómicamente sintetizado por *Bacillus subtilis*; la proteína A de flujo de macrólidos de *E. faecalis* (Schwaige *et al.*, 2011), capaz de regular los niveles internos de macrólidos, o la proteína PcfF, un factor accesorio necesario para iniciar la transferencia del plásmido de resistencia a la tetraciclina pCF10 (Chen *et al.*, 2008). pCF10 es miembro de una familia de plásmidos conjugativos inducibles de *E. faecalis* que codifican para una feromona y que son determinantes en las relaciones ecológicas y la comunicación entre cepas en el entorno intestinal, contribuyendo a una mayor capacidad competitiva en el tracto gastrointestinal (Breuer *et al.*, 2018). En este sentido, igualmente se ha detectado la feromona sexual cAM373 (Clewell *et al.*, 1985). 12B3-5 también tiene péptidos como hidrolasas del tipo HAD y NUDIX, con papeles importantes en la desintoxicación xenobiótica y la protección contra el estrés oxidativo o por acumulación de metabolitos (Koonin y Tatusoz., 1994; Sharma *et al.*, 2011). En suma, todas estas entradas

nos diseñan una cepa capaz de competir con otros posibles rivales en un nicho intestinal.

Como resumen, nuestro estudio muestra, combinando datos dependientes de cultivo, metagenómicos y proteómicos en un modelo murino sometido a diferentes dietas, cómo dos conjuntos diferentes de aislados de *E. faecalis* estrechamente relacionados, enmarcados en dos MLST distintos, compiten para prosperar en sus huéspedes. A pesar de la circunstancia de que, a lo largo del experimento, en el grupo alimentado con dieta estándar solo se detecta ST9 y de que en la dieta enriquecida con mantequilla solo se aísla ST40, el hecho de encontrar ambos ST9 y ST40 en los otros dos grupos, así como la detección de diferentes secuencias metagenómicas incluso en el mismo hospedador, nos indica la posibilidad de que, en principio, ambos tipos MLST sean capaces de colonizar cualquiera de los cuatro grupos. Sin embargo, a pesar de esta variabilidad inicial, al final del experimento todos los aislamientos proceden exclusivamente del grupo alimentado con mantequilla y todos pertenecen al tipo ST40. Además, nuestro estudio metagenómico indica una homogeneidad total en todas las secuencias V3-V5 r16S detectadas en el balance final en este grupo, en coincidencia con la secuencia V3-V5 de la cepa ST40 aislada también en ese momento. Todos estos datos son indicativos de una

comunidad de *E. faecalis* que muestra cierta complejidad inicial pero que termina restringida a una sola dieta en la que un solo genotipo ha sido capaz de sobrevivir y desplazar a sus competidores. El presente estudio revela la existencia y la naturaleza de esta única cepa que logró prosperar. Si esto sucede debido a las características de las diferentes grasas, al arsenal de proteínas defensivas que la cepa posee o a una combinación de ambos factores, aún debe dilucidarse con seguridad.

Aunque este estudio está enmarcado en un experimento concreto, los resultados obtenidos constituyen datos interesantes con significación estadística que abren nuevas líneas de investigación. Análisis adicionales que utilicen cohortes y categorías más amplias reforzarán y delimitarán estos resultados.

Conclusiones

1. A partir de heces de ratones alimentados con diferentes dietas altas en mantequilla, aceite de oliva virgen, aceite de oliva refinado, así como con dieta estándar, se ha construido una colección de 50 cepas de enterococos, clasificadas en seis especies diferentes, con mayor presencia de *E. faecalis* y *E. casseliflavus*.
2. El porcentaje de resistencias a antibióticos es mayor en las cepas aisladas de dietas altas en grasa, con significación por pares entre los grupos estándar y aceite de oliva refinado. Además, se ha detectado una fuerte tendencia a que la presencia del gen para la tirosina descarboxilasa aumente a lo largo del período de alimentación en el grupo de la dieta estándar.
3. Al estudiar la capacidad de las cepas a crecer en presencia de aceite de oliva, el grupo de cepas aisladas de dietas altas en grasa mostró significativamente mayor porcentaje de crecimiento con aceite de oliva refinado que las cepas aisladas de dieta estándar. Con aceite de oliva virgen todas las cepas fueron inhibidas por igual.
4. Nueve cepas produjeron actividad antimicrobiana en medio tamponado. Cuatro de ellas pertenecían a la especie *E.*

- faecalis* y una de ellas, la cepa 12B3-5, mostró actividad frente a dos bacterias indicadoras.
5. En un estudio a partir de secuencias metagenómicas del gen ARNr 16S, el género *Enterococcus* no mostró diferencias significativas entre dietas, pero sí la especie *E. faecalis*, con diferencias por pares entre el grupo de mantequilla y la dieta estándar. La variedad de secuencias detectadas en esta especie se redujo a sólo una al final del experimento, idéntica a la secuencia V3-V5 de la cepa 12B3-5, siendo localizada en cinco animales diferentes, todos ellos del grupo de mantequilla.
 6. Todas las cepas de *E. faecalis* de la colección, menos una, pertenecen a las secuencias tipo MLST 9 y 40. Todas las cepas aisladas del grupo alimentado con la dieta estándar son ST9. Todas las cepas aisladas del grupo alimentado con dieta enriquecida en mantequilla son ST40, menos una que pertenece al mismo complejo clonal. Las cepas aisladas de los grupos con aceite de oliva virgen y refinado pertenecen a ambos ST, aunque ninguna se aisló al final del experimento.
 7. En un estudio proteómico comparativo entre dos cepas de *E. faecalis*, la cepa 12B3-5, del tipo ST40, presenta el doble de

proteínas específicas con funciones inferidas defensivas que la cepa 0V5-2, del tipo ST9.

Bibliografía

- Aarestrup FM, Butaye P, Witte W. (2002). Nonhuman reservoirs of enterococci, p 55–99. In Gilmore MS (ed), The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. ASM Press, Washington, DC.
- Abriouel H, Lucas R, Ben Omar N, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. (2005). Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. Systematic and Applied Microbiology.
- Abriouel H, Ben Omar N, Cobo-Molinos A, Lucas-López R, Grande MJ, Martínez-Viedma P, Ortega E, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. (2008). Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. Int. J. Food Microbiol. 123, 38–49.
- Albenberg LG, Wu GD. (2014). Diet and the intestinal microbiome: Associations, functions, and implications for health and disease. Gastroenterology, 146, 1564–1572.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. Nature, 473(7346), 174–180 (12).

- Badgley BD, Thomas FIM, Harwood VJ. (2011). Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. *Environ. Microbiol.* 3:932–942.
- Ben Yahia H, Chairat S, Hamdi N, Gharsa H, Ben Sallem R, Ceballos S, Torres C, Ben Slama K. (2018). Antimicrobial resistance and genetic lineages of faecal enterococci of wild birds: Emergence of *vanA* and *vanB2* harbouring *Enterococcus faecalis*. *Int J Antimicrob Agents.* 52(6):936-941.
- Berg G, Dahling DR, Brown GA, Berman D. (1978). Validity of fecal coliforms, total coliforms, and fecal streptococci as indicators of viruses in chlorinated primary sewage effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:880–884.
- Bertrand S, Weill FX, Cloeckaert A, Vrints M, Mairiaux E, Praud K, Dierick K, Wildemaue C, Godard C, Butaye P, Imberechts H, Grimont PA, Collard JM (2006). Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enteric* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *J. Clin. Microbiol.* 44, 2897–2903.

- Brandt CL, Giese AC. (1956). Photoreversal of nuclear and cytoplasmic effects of short ultraviolet radiation on *Paramecium caudatum*. J. Gen. Physiol. 39:35–751.
- Breuer RJ, Hirt H, Dunne GM. (2018). Mechanistic features of the enterococcal pCF10 sex pheromone response and the biology of *Enterococcus faecalis* in its natural habitat. J Bacteriol 200:e00733-17.
- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. (2012). Enterococci in the Environment. Microb. and Mol. Biology Reviews, 76(4), 685–706.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes, 56(7), 1761–1772.
- Carr MR, Wang SY, McLean TI, Flood CJ, Ellender RD. (2010). Salmonella rarely detected in Mississippi coastal waters and sediment. J. Appl. Microbiol. 109:2191–2199.
- Chen Y, Zhang X, Manias D, Yeo HJ, Dunne GM, Christie PJ.(2008). *Enterococcus faecalis* PcfC, a spatially localized substrate receptor for type IV secretion of the pCF10 transfer intermediate. Journal of bacteriology, 190(10), 3632-45.
- Chiu CH, Su LH, Chu CH, Wang MH, Yeh CM, Weill FX, Chu C. (2006). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enteric*

- serovar *Typhimurium* phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 44, 2354–2358.
- Cizek AR.(2008). Comparing the partitioning behavior of *Giardia* and *Cryptosporidium* with that of indicator organisms in stormwater runoff. Water Res. 42:4421– 4438.
 - Clewell DB, An FY, White BA, Gawron-Burke C. (1985).*Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn918). Journal of bacteriology, 162(3), 1212-20.
 - Clewell DB. (1993). Bacterial conjugation. ISBN 978-0-306-44376-3.
 - Collins MD, Jones D, Farrow JAE, Kilpper-Bälz R, Schleifer KH. (1984). *Enterococcus avium* nom.rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:220 –223.
 - Collins MD, Farrow JAE, Jones D. (1986). *Enterococcus mundtii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:8 –12.
 - Collins MD, Rodrigues UM, Pigott NE, Facklam RR. (1991). *Enterococcus dispar* sp. nov.: a new *Enterococcus* species from human sources. Lett. Appl. Microbiol. 12:95–98.

- Cox CR, Gilmore MS. (2007). Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. Infect. Immun. 75:1565–1576.
- Eaton TJ, Gasson MJ. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and environmental microbiology.
- De las Rivas B, Marcobal A, Muñoz R. (2005). Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. FEMS Microbiology Letters 244, 367–372.
- De Luca G, Sacchetti R, Zanetti F, Leoni E. (2008). Comparative study on the efficiency of peracetic acid and chlorine dioxide at low doses in the disinfection of urban wastewaters. Ann. Agric. Environ. Med. 15:217–224.
- de Vaux A, Laguerre G, Diviès C, Prévost H. (1998). *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). Int. J. Syst. Bacteriol. 48:383–387.
- de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, Oosterink E, Keshtkar S, Duval C. (2012). Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition

- by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver*, 303:589-599.
- Dorsey JH, Carter PM, Bergquist S, Sagarin R. (2010). Reduction of fecal indicator bacteria (FIB) in the Ballona Wetlands saltwater marsh (Los Angeles County, California, USA) with implications for restoration actions. *Water Res.* 44:4630–4642.
 - Downes A, Blunt TP. (1877). Researches on the effect of light upon bacteria and other organisms. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 26:488– 500.
 - Dulbecco R. (1950). Experiments on photoreactivation of bacteriophages inactivated with ultraviolet radiation. *J. Bacteriol.* 59:329 –347.
 - Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth RA. (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microb Infect Dis.*
 - Faith JJ, McNulty NP, Rey FE, Gordon, JI. (2011). Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science*, 333, 101–104.
 - Fava F, Gitau R, Griffin BA, Gibson GR, Tuohy KM, Lovegrove JA. (2013). The type and quantity of dietary fat and

carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *Int J Obes*, 37:216±23.

- Fisher K, Phillips C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol.*
- Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety. *International Journal of Food Microbiology*.
- Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vannanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. (2003). Enterococci in foods a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*.
- Franz CM, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev.*
- Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Galvez A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151:125–140.

- Fujioka RS, Hashimoto HH, Siwak EB, Young RH. (1981). Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. Appl. Environ. Microbiol. 41:690–696
- Gardini F, Martuscelli M, Caruso MC, Galgano F, Crudele MA, Favati F, Guerzoni ME, Suzzi G. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology.
- Garza-Velasco R, Hernández-Acosta K, Mejía-Chávez AG. (2002). Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*.
- Gates FL. (1929). A study of the bactericidal action of ultra violet light. I. The reaction to monochromatic radiations. J. Gen. Physiol. 13:231–248.
- Giard JC, Laplace JM, Rince A, Pichereau V, Benachour A, Leboeuf C, Flahaut S, Auffray Y, Hartke A. (2001). The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. Electrophoresis.
- Giraffa G, Carminati D, Neviani E. (1997). Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. Journal of Food Protection.

- Giraffa G. (2002). Enterococci from foods. FEMS Microbiology Reviews.
- Gordillo ME, Singh KV, Murray BE. (1993). Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subspecies differentiation of strains of *Enterococcus faecalis*. J. Clin. Microbiol. 31:1570–1574.
- Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C. (2013). The polyphenol oleuropein aglycone protects TgCRND8 mice against A β plaque pathology. PLoS One 8:e71702.
- Guerra B, Soto SM, Argüelles JM, Mendoza MC. (2001). Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enteric* serotype [4, 5, 12]. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1305–1308.
- Hardie JM, Whiley RA. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*, p 1S–11S. In Andrew PW, Mitchell TJ (ed), The biology of streptococci and enterococci. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.
- Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR, Rose JB. (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and

- public health protection. Appl. Environ. Microbiol. 71:3163–3170.
- Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Cobo-Molinos A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. (2014). Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut microbiota. Comparison to butter. Food Research International.
 - Hidalgo M, Prieto I, Abriouel H, Villarejo A, Ramírez-Sánchez M, Cobo-Molinos A, Benomar N, Gálvez A, Martínez-Cañamero M. (2018). Changes in Gut Microbiota Linked to a Reduction in Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Fed an Extra Virgin Olive Oil-Enriched Diet. Plants Foods for Human Nutrition, 73:1-6.
 - Huguet J, Huapaya B, Salazar E. (2002). Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. Revista peruana de medicina experimental y salud pública.
 - Jacobsen C, Nielsen R, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl Environ Microbiol, 65: 4949-4956.

- Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. (1994). Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev.
- Jiménez E, Ladero V, Chico I, Maldonado-Barragán A, López M, Martín V, Fernández L, Fernández M, Álvarez MA, Torres C, Rodríguez JM. (2013). Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. BMC Microbiology, 13-288.
- Kawalec M, Pietras Z, Danilowicz E, Jakubczak A, Gniadkowski M, Hyniewicz W, Willems RJL. (2006). Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: Characterization of epidemic clones. Journal of clinical microbiology, 147-153.
- Kay D, Stapleton CM, Wyer MD, McDonald AT, Crowther J, Paul N, Jones K, Francis C, Watkins J, Wilkinson J, Humphrey N, Lin B, Yang L, Falconer RA, Gardner S. (2005). Decay of intestinal enterococci concentrations in high-energy estuarine and coastal waters: towards real-time T90 values for modelling faecal indicators in recreational waters. Water Res. 39:655–667.

- Kayser FH. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*.
- Kelner A. (1950). Light-induced recovery of microorganisms from ultraviolet radiation injury, with special reference to *Escherichia coli*. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 26:189–199
- Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh E H, Kim D. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS One*, 7(10), e47713.
- Klein G. (2003). Taxonomy, ecology, and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88:123–131.
- Koonin EV, Tatusov RL. (1994). Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity: application of an iterative approach to database search. *Journal of molecular biology*, 244(1), 125-132.
- Kuch A, Willems RJ, Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Sundsfjord A. (2012). Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human

- Enterococcus faecalis* isolates from Europe. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(3):551–558.
- Law-Brown J, Meyers PR. (2003). *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the red-billed woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:683–685.
 - Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JL. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature, 444:1022±3.
 - Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C. (2013). Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. Gut, 62(12), 1787–1794.
 - Ma L, Kornacki JL, Zhang G, Lin CM, Doyle MP. (2007). Development of thermal surrogate microorganisms in ground beef for in-plant critical control point validation studies. J. Food Prot. 70:952–957.
 - Mac Faddin, Jean F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana.

- Marguet ER, Vallejo M, Olivera NL. (2008). Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. Acta bioquímica clínica latinoamericana, 42(4), 543-548
- Mataix-Verdú J, Palomeque-Messía F, Carpio-Dueñas A, Rodríguez-Navarrete G. (2009). El aceite de oliva: Su obtención y propiedades. 3ª Edición. Edita Fundación del Olivar. Jaén.
- Mariné-Font A, Vidal-Carou MC, Izquierdo-Pulido M, Veciana-Nogués MT, Hernández-Jover T. (1995). Les amines biogenes dans les aliments: leur signification, leur analyse. Ann. Falsif. Expert. Chim. Tox. 88, 119–140
- Martín-Platero A M, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. (2009). Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. International Journal of Food Microbiology 132, 24-32.
- Martínez N, Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Gálvez A, Martínez Cañamero M. (2019). Refined versus Extra Virgin Olive High-Fat Diet. Impacto on intestinal microbiota of mice and its relation to different physiological variables. Microorganisms.

- Martínez-González MA, Martín-Calvo N. (2013). The major European dietary patterns and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*, 14:265±71.
- Martínez-Murcia AJ, Collins MD. (1991). *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 80:69–73.
- McBride SM, Fischetti VA, Leblanc DJ, Moellering Jr RC, Gilmore MS. (2007). Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One*, 2(7):e582.
- Medina E, de Castro A, Romero C, Brenes M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 12, 4954–4961.
- Michanie S. (2004). *Listeria monocytogenes*: La bacteria emergente de los 80. Ganados & Carne. Buenos Aires, Argentina.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Informe del Consumo de Alimentación en España 2016; Servicio de Publicaciones del MAPAMA: Madrid, Spain, 2017.
- Moellering Jr RC. (1992). Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 15:58–62.

- Moore DF. (2005). Evaluation of antibiotic resistance analysis and ribotyping for identification of fecal pollution sources in an urban watershed. J. Appl. Microbiol. 99:618–628.
- Morrison D, Woodford N, Cookson B. (1997). Enterococci as emerging pathogens of humans, p 89S–99S. In Andrew PW, Mitchell TJ (ed), The biology of streptococci and enterococci. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom.
- Murray BE. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. Clinical Microbiology Reviews.
- Nayak BS, Badgley B, Harwood VJ. (2011). Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental *Enterococcus* isolates by BOX-PCR typing and 16S rRNA gene sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 77:5050–5055.
- Neyrinck AM, Van Hée VF, Bindels LB, De Backer F, Cani PD, Delzenne NM. (2013). Polyphenol-rich extract of pomegranate peel alleviates tissue inflammation and hypercholesterolaemia in high-fat diet-induced obese mice: Potential implication of the gut microbiota. British Journal of Nutrition. 109, 802–809.
- Nowlan SS, Deibel RH. (1967). Group Q streptococci. I. Ecology, serology, physiology, and relationship to established enterococci. J. Bacteriol. 94:291–296. 258. Obiri-Danso

- Pacheco YM, López S, Bermúdez B, Abia R, Muriana FJ. (2006). Extra-virgin vs. refined olive oil on postprandial hemostatic markers in healthy subjects. *J. Thromb. Haemost.* 4, 1421–1422.
- Padilla C, Lobos O, Brevis P, Abaca P, Hubert E. (2006). Plasmid-mediated bacteriocin production by *Shigella flexneri* isolated from dysenteric diarrhea and their transformation into *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.*
- Padilla C, Núñez M, Padilla A, Lobos O. (2012). Virulence genes and bacteriocins in *Enterococcus faecalis* strains isolated from different clinical samples in Maule Region, Chile.. *Revista chilena de infectología*, 29.
- Palmer KL, Schaik W, Willems RJL, Gilmore M. (2014). Enterococcal Genomics. *Enterococci*.
- Pérez-Pulido R, Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. (2006). Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food Chem. Toxicol.* 44, 2070–2077
- Poeta P, Igrejas G, Costa D, Sargo R, Rodríguez J, Torres C. (2008). Virulence factors and bacteriocin in faecal enterococci of wild boars. *J Basic Microbiol.*

- Prieto I, Segarra AB, Martínez-Cañamero M, De Gasparo M, Zorad S, Ramírez-Sánchez, M. (2017). Biodirectional as symmetry in the neurovisceral communication for the cardiovascular control: New insights. *Endocrine regulations*, Vol.51. Nº3, 157-167.
- Prieto I, Hidalgo M, Segarra AB, Martínez- Rodríguez AM, Cobo A, Ramírez M, Abriouel H, Gálvez A, Martínez-Cañamero M.(2018) Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLoS ONE* 13(1): e0190368.
- Quiñones D, Kobayashi N, Nagashima S. (2009). Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. Microbial drug resistance.
- Quiñones D. (2010). *Enterococcus* aislados en Cuba: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética.
- Rajavel M, Perinbam K, Gopal B. (2013). Structural insights into the role of *Bacillus subtilis* YwfH (BacG) in tetrahydrotyrosine synthesis. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(3), 324-332.

- Ramírez-Tortosa C, López-Pedrosa JM, Suarez A, Ros E, Mataix J, Gil A. (1999). Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: The Spanish Nutrition Study. *Br. J. Nutr.* 82, 31–39.
- Rojas Chávez FD. (2014). Determinantes de virulencia en enterococos asociados a patologías humanas: diferencias fenotípicas y moleculares entre aislados marinos y clínicos. Tesis doctoral.
- Rosales Sánchez EM. (2019). Caracterización proteómica y estudio comparativo de dos cepas de enterococos. Trabajo Fin de Máster. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén.
- Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, Coque TM, Cantón R, Baquero F, Murray BE, del Campo R, Willems RJ. (2006). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J. Clin. Microbiol.* 44:2220– 2228.
- Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. (2004). Mechanisms of Resistance in Multiple-

- Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Strains of Human, Animal, and Food Origins. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 3996–4001.
- Shalaby AR. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research International, Vol.29, Nr 7, pp.675-690.
 - Sharma A, Tendulkar AV, Wangikar PP. (2011). Structure based prediction of functional sites with potential inhibitors to Nudix enzymes from disease causing microbes. Bioinformation, 5(8), 341-9.
 - Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 34:31–34.
 - Schoen ME, Soller JA, Ashbolt NJ. (2011). Evaluating the importance of faecal sources in human-impacted waters. Water Res. 45:2670 –2680.
 - Schwaiger K, Hölzel C, Bauer J. (2011). Detection of thermacrolide-efflux protein A gene *mef* (A) in *Enterococcus faecalis*. Microb Drug Resist. 17(3):429-32.

- Segarra AB, Ruiz-Sanz JI, Ruiz-Larrea MB, Ramírez-Sánchez M, de Gasparo M, Banegas I. (2011). The profile of fatty acids in frontal cortex of rats depends on the type of fat used in the diet and correlates with neuropeptidase activities. *Hormone and Metabolic Research*, 43(2), 86–91.
- Shalaby AR. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29, 675–690.
- Shen J, Obin MS, Zhao L. (2013). The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med.* 34:39±58.
- Sherman JM. (1937). The streptococci. *Bacteriol. Rev.* 1:3–97.
- Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. (1998). Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J. Infect. Dis.* 178: 1416-1420.
- Sinton LW, Davies-Colley RJ, Bell RG. (1994). Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meat works effluents in seawater chambers. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2040–2048.
- Sinton LW, Finlay RK, Lynch PA. (1999). Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3605–3613.
- Sinton LW, Hall CH, Lynch PA, Davies-Colley RJ. (2002). Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and

- bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. Appl. Environ. Microbiol. 68:1122–1131.
- Sofianou S, Pournaras M, Gios A, Polyzou A, Maniatis A, Tsakris A. (2004). Substantially increased faecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary Greek hospital after a 4 year time interval. J Antimicrob Chemother.
 - Song X, Sun J, Mikalsen T, Roberts AP, Sundsfjord A. (2013). Characterisation of the plasmidome within *Enterococcus faecalis* isolated from marginal periodontitis patients in Norway. Plos one.
 - Sunkara T, Rawla P, Ofosu A, Gaduputi V. (2018). Fecal microbiota transplant—A new frontier in inflammatory bowel disease. J. Inflamm. Res. 11, 321–328.
 - Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. (2011). Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 921–924.
 - Tannock GW, Cook G. (2002). Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: Gilmore, M.S. (Ed.), The

Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance. ASM Press, Washington, D.C.

- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. (2003). Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:2622– 2636
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. (2004). Enterococcal surface protein, esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis* *Infect. Immunol.*
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 18:426–439.
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M. (2001). The enterococcal surface protein, esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67,4538–4545.
- Tree JA, Adams MR, Lees DN. (2003). Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2038–2043.
- Tseng LY, Jiang SC. (2012). Comparison of recreational health risks associated with surfing and swimming in dry weather

and post-storm conditions at southern California beaches using quantitative microbial risk assessment (QMRA). *Mar. Pollut. Bull.* 64:912–918.

- US Environmental Protection Agency. (2004). Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria. EPA
- Vázquez-Araújo L, Adhikari K, Chambers E, Chambers DH, Carbonell-Barrachina AA. (2015). Cross-cultural perception of six commercial olive oils: A study with Spanish and US consumers. *Food Sci. Technol. Int.* 21, 454–466.
- Viau EJ, Goodwin KD, Yamahara KM, Layton BA, Sassoubre LM, Burns SL, Tong HI, Wong SH, Lu Y, Boehm AB. (2011). Bacterial pathogens in Hawaiian coastal stream associations with fecal indicators, land cover, and water quality. *Water Res.* 45:3279–3290.
- Vicente AR, Santiago MG. (2006). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.
- Wade TJ. (2008). High sensitivity of children to swimming-associated gastrointestinal illness: results using a rapid assay of recreational water quality. *Epidemiology* 19:375–383.

- Werner G, Fleige C, Fessler AT, Timke M, Kostrzewa M, Zischka M, Peters T, Kaspar H, Schwarz S. (2012). Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D streptococci from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. Vet Microbiol. 2012 Nov 9;160(1-2):162-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.05.019.
- Williams T, Fortmann SP, Terry RB. (1987). Associations of dietary fat, regional adiposity, and blood pressure in men. Journal of the American Medical Association, 257, 3251–3256.
- World Health Organization. (2003). Microbial aspects of beach sand quality, p 118–126. In World Health Organization (ed), Guidelines for safe recreational water environments, vol 1. Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Ye X, Scott T, Gao X, Maras JE, Bakun PJ, Tucker KL. (2013). Mediterranean diet, healthy eating index 2005, and cognitive function in middle-aged and older Puerto Rican adults. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 113, 276–281.

- Zanetti F, De Luca G, Sacchetti R, Stampi S. (2007). Disinfection efficiency of peracetic acid (PAA): inactivation of coliphages and bacterial indicators in a municipal wastewater plant. *Environ. Technol.* 28:1265–1271.
- Zischka M, Kuenne C, Blom J, Dabrowski PW, Linke B, Hain T, Nitsche A, Goesmann A, Larsen J, Jensen LB, Witte W, Werner G. (2012). Complete genome sequence of the porcine isolate *Enterococcus faecalis* D32. *J Bacteriol*, 194(19):5490–1.
- Zischka M, Künne CT, Blom J, Wobser D, Sakingç T, Schmidt-Hohagen K, Wojtek-Dabrowski P, Nitsche A, Hübner J, Hain T, Chakraborty T, Linke B, Goesmann A, Voget S, Daniel R, Schomburg D, Hauck R, Hafez HM, Tielen P, Jahn D, Solheim M, Sadowy E, Larsen J, Jensen LB, Ruíz-Garbajosa P, Quiñones D, Mikalsen T, Bender J, Steglich M, Nübel U, Wittle W, Werner G. (2015). Comprehensive molecular, genomic and phenotypic analysis of a major clone of *Enterococcus faecalis* MLST ST40. *BMC Genomics*, 16-175.
- Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W. (2010). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME Journal*, 4(2), 232–241.