

2025

Análisis genotípico de especies de Lactobacilli
de origen intestinal con potencial probiótico.

Ing. En Tecnología Ambiental
Francisca Guadalupe Arcos García



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Química

“Análisis genotípico de especies de Lactobacilli de
origen intestinal con potencial probiótico”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Francisca Guadalupe Arcos García

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Querétaro, Qro. Enero, 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Análisis genotípico de especies de Lactobacilli de origen intestinal con potencial probiótico”

PROTOCOLO DE TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Francisca Guadalupe Arcos García

Dirigido por:

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Presidente

Dra. Estela Vázquez Barrios
Secretario

Dra. Dulce María Rivera Pastrana
vocal

MIM. David Gustavo García Gutiérrez
Suplente

Dra. Karla Isabel Lira de León
Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario
(Mes y año)
México.

DEDICATORIA

A ti Diego porque con tu bondad, tu risa y mil ocurrencias me inspiras y me haces feliz cada día. Esta tesis no solo es el fruto de mi esfuerzo, sino también de tu constante compañía y comprensión.

Con todo mi amor,

Mamá.

AGRADECIMIENTOS

A la vida, por cada momento de fortaleza y debilidad, de alegría y tristeza, que me han enseñado a valorar y disfrutar lo realmente importante.

A mi bebé, por todos los días que fue el primero y el último en el kínder, por madrugar y desvelarse conmigo y aun así tener siempre una sonrisa, besos y abrazos para mí sin importar las circunstancias.

A mi mamá y mi hermana, por estar siempre conmigo y siempre apoyarme en todas las decisiones que he tomado y jamás dudar de mí... las amo.

A mi familia (Abuela, tía Ely, Alejandros, mamá Carmelita, Mariana, Moni y Diana), por inspirarme, a motivarme, hacer ver las cosas desde otro enfoque y esperarme siempre con amor.

A mis amigos de la maestría y del laboratorio que se han convertido en mi segunda familia, por todo el apoyo durante este trayecto y las veces que estuvieron en el rol de niños. ¡Agradecida infinitamente con todos ustedes!

A mi asesor de tesis, el Dr. Gerardo Nava por todas las oportunidades brindadas, por guiarme a lo largo de esta Maestría con sus valiosos consejos, infinita paciencia y gran empatía. Pero, sobre todo por creer en mí en los momentos más difíciles. Su apoyo ha sido fundamental para alcanzar este logro.

A los docentes de la Maestría que contribuyeron a mi formación académica.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por brindarme la oportunidad de ser parte de esta maestría y por contribuir de manera significativa a mi desarrollo profesional.

A CONACyT, por el apoyo económico brindado a lo largo de esta Maestría.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	10
II. ANTECEDENTES	11
2.1. Composición de la microbiota intestinal	11
2.2. Diversidad de Lactobacilli en el intestino	13
2.3. Principales beneficios a la salud del hospedador, asociados al género Lactobacilli	14
2.4. Potencial probiótico de <i>L. plantarum</i>	16
2.4.1 Características generales	16
2.4.2 Características bioquímicas y moleculares	16
2.4.3 Efecto probiótico de <i>L. plantarum</i> en la salud humana, producción avícola, porcina, bovina y alimentaria	17
2.5 Potencial probiótico de <i>L. reuteri</i>	19
2.5.1 Características generales	19
2.5.2 Características bioquímicas y moleculares	19
2.5.3 Efecto probiótico de <i>L. reuteri</i> en la salud humana, producción avícola, porcina, bovina y alimentaria	20
2.6 Potencial probiótico de <i>L. salivarius</i>	22
2.6.1 Características generales	22
2.6.2 Características bioquímicas y moleculares	22
2.6.3 Efecto probiótico de <i>L. Salivarius</i> en la salud humana, producción avícola, porcina y bovina y alimenticia	23
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo General	26

4.2 Objetivos Específicos	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Selección de especies de Lactobacilli reportados en la literatura	27
5.2. Análisis de especificidad y cobertura de iniciadores de especies de Lactobacilli	27
5.1. Diseño de iniciadores para especies de Lactobacilli	27
5.3. Estandarización de iniciadores de PCR para la detección de especies de Lactobacilli	28
5.1.1. Material biológico.....	28
5.1.1.1. Identificación de muestras ideales para aislamiento de especies de Lactobacilli.....	28
5.1.1.2. Aislamiento de especies de Lactobacilli.....	28
5.1.1.3. Extracción de DNA.....	28
5.1.1.4. Identificación las especies de Lactobacilli.....	29
5.1.2. Selección de temperaturas óptimas de alineación de iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de especies de Lactobacilli	29
5.2. Estandarización y validación de ensayos de qPCR para la detección y cuantificación de especies de Lactobacilli	30
5.2.1. Análisis de sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad.....	30
5.2.2. Análisis de especificidad.....	31
5.3. Detección y cuantificación de especies de Lactobacilli en muestras de heces provenientes de sistemas de producción animal.	31
5.3.1. Material biológico.....	31
5.3.2. Implementación de ensayos de qPCR para la identificación y cuantificación de especies de Lactobacilli en muestras clínicas provenientes de sistemas de producción animal.	31

5.4. Análisis Estadístico	32
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1. Identificación de especies de <i>Lactobacillaceae</i> prevalentes en el intestino de aves y mamíferos.	33
6.2. Principales especies de Lactobacilli con potencial probiótico	37
6.3. Aislamiento de especies de Lactobacilli a partir de probióticos comerciales, muestras intestinales de aves y mamíferos	39
6.4. Desarrollo de un ensayo molecular para la identificación y cuantificación de <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> y <i>L. salivarius</i>	41
6.5. Estandarización de ensayos de qPCR para la identificación y cuantificación de <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> y <i>L. salivarius</i>	42
6.5.1. Estandarización de temperaturas de alineación de iniciadores de qPCR empleando ADN de aislamientos.	42
6.5.2. Validación de ensayos de qPCR para la detección y cuantificación de <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> y <i>L. salivarius</i>	42
6.6. Detección y cuantificación de <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> y <i>L. salivarius</i> en muestras fecales provenientes de sistemas de producción animal.	43
VII. CONCLUSIONES	47
VIII. BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nomenclatura de especies de Lactobacilli del tracto gastrointestinal.	Pág.13
Cuadro 2. Especies de Lactobacilli presentes en diferentes organismos.	Pág. 14
Cuadro 3. Principales beneficios de especies Lactobacilli en el hospedador.	Pág. 15
Cuadro 4. Aplicación de <i>L. plantarum</i> con beneficio probiótico en la salud humana, producción animal e industria alimentaria.	Pág. 18
Cuadro 5. Aplicación de <i>L. reuteri</i> con beneficio probiótico en la salud humana, producción animal e industria alimentaria.	Pág. 21
Cuadro 6. Aplicación de <i>L. salivarius</i> con beneficio probiótico en la salud humana, producción animal e industria alimentaria.	Pág. 24
Cuadro 7. Gradientes de temperatura de alineación de iniciadores de PCR utilizados.	Pág. 30
Cuadro 8. Especies de Lactobacilli prevalentes en el intestino de aves y mamíferos.	Pág. 35
Cuadro 9. Abundancia relativa* de especies de Lactobacilli en el intestino delgado de aves y mamíferos.	Pág. 36
Cuadro 10. Especies de Lactobacilli y número de artículos científicos publicados describiendo su potencial probiótico.	Pág. 38
Cuadro 11. Identificación de especies de Lactobacilli recuperadas de probióticos comerciales y muestras intestinales de pollos y mamíferos.	Pág. 40
Cuadro 12. Iniciadores de PCR identificados y modificados para detección y cuantificación de <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> y <i>L. salivarius</i> .	Pág. 41
Cuadro 13. Temperaturas de alineación seleccionadas para el protocolo de PCR.	Pág. 42
Cuadro 14. Parámetros obtenidos en las curvas de iniciadores de qPCR.	Pág. 43

Cuadro 15. Prevalencia de <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> y <i>L. salivarius</i> en heces de bovino, cerdo y pollos.	Pág. 43
--	---------

ÍNDICE DE FIGURAS

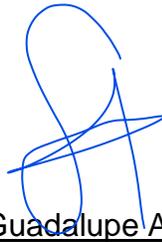
Figura 1. Abundancia relativa del filo Bacillota presente en la microbiota intestinal.	Pág. 11
Figura 2. Prevalencia de especies de Lactobacilli en el intestino en diferentes organismos.	Pág. 12
Figura 3. Abundancia relativa de la familia <i>Lactobacillaceae</i> en el intestino de aves y mamíferos.	Pág. 34
Figura 4. Abundancia absoluta de <i>Lactobacillaceae</i> y especies de Lactobacilli en muestras de heces de bovino, cerdo y pollo.	Pág. 44
Figura 5. Abundancia relativa de especies de Lactobacilli en muestras de heces de bovino, cerdo y pollo.	Pág. 45

ABREVIATURAS Y SIGLAS

<i>ADN</i>	Acido desoxirribonucleico
<i>FOS</i>	fructooligosacáridos
<i>GABA</i>	Ácido Gamma-Aminobutírico
<i>GOS</i>	Galactooligosacáridos
<i>LDL</i>	Lipoproteína de baja densidad
<i>LMM</i>	Laboratorio de Microbiología Molecular
<i>LPSN</i>	Lista de Nombres de Procariontes con Estatuto en la Nomenclatura
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>PCR</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>qPCR</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'F' and 'G' intertwined.

Francisca Guadalupe Arcos García

RESUMEN

El establecimiento de la microbiota intestinal es de suma importancia para la nutrición y salud del huésped, en particular las especies del género *Lactobacilli* que producen metabolitos que facilitan la digestión y absorción de nutrientes, promueven el desarrollo del sistema inmune y la mucosa intestinal. Por estas razones, en los últimos años se ha incrementado el interés por desarrollar cultivos probióticos a base de *Lactobacilli* y evaluar su impacto sobre la fisiología intestinal de mamíferos y aves. Basado en esta premisa, el objetivo fue identificar las especies de *Lactobacilli*, con potencial probiótico y prevalentes en el intestino, para desarrollar ensayos de PCR enfocados a su detección y cuantificación. Para cumplir esta meta, se realizaron estudios bioinformáticos para identificar la prevalencia, abundancia y potencial probiótico de especies de *Lactobacilli*. El presente trabajo reveló que la familia *Lactobacillaceae* es uno de los miembros más abundantes (45% - 20%) de la microbiota intestinal, de pollos, bovinos y humanos. Además, se identificó que *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* y *L. fermentum* son especies de *Lactobacilli* más abundantes (6% a 16%) en el intestino de humanos, bovinos, cerdos y pollos. En análisis exhaustivo de la literatura reveló que *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius* son de las principales especies de *Lactobacilli* con potencial probiótico. Por tal motivo se desarrollaron e implementaron ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) enfocados a la detección y cuantificación de estos grupos bacterianos. La implementación de estos ensayos reveló que *L. reuteri* y *L. salivarius* son las especies más prevalentes en el intestino de bovinos, cerdos y pollos con abundancias relativas que varían entre 4 – 11 UFC \log_{10}/g ; en contraste, el presente estudio reveló que *L. plantarum* no fue una especie prevalente en las muestras de bovino, cerdo y pollo analizadas. Estos ensayos moleculares podrían ser implementados como una herramienta microbiológica para estimar el nivel de colonización y proliferación de cultivos probióticos y su impacto en la fisiología intestinal.

Palabras claves: Microbiota intestinal, *Lactobacilli*, probióticos.

ABSTRACT

The establishment of the gut microbiota is fundamental for host nutrition and health, in particular species of Lactobacilli. The Lactobacilli species produce metabolites that facilitate digestion and absorption of nutrients, promote development of the immune system and the intestinal mucosa. For these reasons, in recent years, there is an increasing interest in developing probiotic cultures based on Lactobacilli cultures. Based on this premise, the objective of the present project had two important objectives, first, to identify Lactobacilli species with probiotic potential and the most prevalent in the intestinal tract of mammalian and avian species; and second, to develop PCR assays for the detection and quantification of the selected Lactobacilli species. To achieve these goals, bioinformatics studies were conducted to identify the prevalence, abundance, and probiotic potential of Lactobacilli species. This analysis revealed that the family *Lactobacillaceae* is one of the most abundant (45%-20%) members of the gut microbiota of chickens, cattle, and humans. Additionally, it was identified that *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, and *L. fermentum* are the most abundant (6% to 16%) Lactobacilli species in the intestinal tract of humans, cattle, pigs, and chickens. An exhaustive analysis of the literature revealed that *L. plantarum*, *L. reuteri*, and *L. salivarius* are the main Lactobacilli species with probiotic potential. For these reasons, quantitative PCR (qPCR) assays focused on the detection and quantification of these bacterial groups were developed and implemented. The implementation of these assays revealed that *L. reuteri* and *L. salivarius* are the most prevalent species in the intestines of cattle, pigs, and chickens, with relative abundances ranging from 4 – 11 Log₁₀ CFU/g; in contrast, this study revealed that *L. plantarum* was not a prevalent species in the analyzed samples of cattle, pigs, and chickens. These molecular assays could be implemented as a microbiological tool to estimate colonization and proliferation of probiotic cultures and evaluate their impact on intestinal physiology.

Keywords: Intestinal microbiota, Lactobacilli, probiotics.

I. INTRODUCCIÓN

Lactobacilli, género del filo Bacillota (anteriormente conocido como Firmicutes), son bacterias anaerobias facultativas, Gram positivas, no formadoras de esporas, de forma bacilar; este género es un miembro importante de la microbiota gastrointestinal de mamíferos y aves, que mantiene una relación simbiótica con el hospedador (Hammes y Hertel, 2015). Las diferentes especies de Lactobacilli sintetizan metabolitos bacterianos que mejoran la digestión y absorción nutrientes, protegen contra la invasión de patógenos, promueven la actividad del sistema inmune, regulan el metabolismo de grasas y estimulan la angiogénesis intestinal (Matos y Leulier, 2014). Estos beneficios han generado que las especies de Lactobacilli sean de gran interés biotecnológico en la industria de suplementos o aditivos alimenticios para animales y humanos (Wilkins y Sequoia, 2017), principalmente como probióticos que se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped” de acuerdo a la Asociación Internacional Científica para los Probióticos y Prebióticos (ISAPP) (Cunningham et al., 2021). Además, varias especies de Lactobacilli son clasificadas como “generalmente reconocidas como seguras” (GRAS) por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de EE.UU. y por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

Actualmente, los problemas de salud emergentes en poblaciones humanas y animales demandan la identificación y desarrollo de cultivos probióticos más efectivos para reducir el aumento de enfermedades infecciosas y no infecciosas causadas por trastornos en la microbiota intestinal y surgimientos de patógenos multirresistentes a antibióticos (Fishbein et al., 2023). Por tal motivo es fundamental desarrollar e implementar nuevas herramientas enfocadas a la detección, identificación y cuantificación de cultivos probióticos; principalmente del género Lactobacilli que han demostrado regular y mejorar las funciones intestinales y sistémicas del consumidor o huésped.

II. ANTECEDENTES

2.1. Composición de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal se conoce como la comunidad de microorganismos nativos que colonizan permanentemente el sistema intestinal de mamíferos, aves, peces, reptiles e invertebrados (Glendinning et al., 2019). En mamíferos y aves adultas sanas, las bacterias intestinales del filo Bacteroidetes y Bacillota ocupan el 90%, mientras el 10% faltante pertenecen a los filos Protobacterias, Actinobacterias, Synergistete, Fusobacterias, Verrucomicrobia y Euyarchaeda (**Figura 1**) (Rinninella et al., 2019). Del filo Bacillota, la familia *Lactobacillaceae* tiene géneros reconocidos como GRAS (Palomino et al., 2023) principalmente el género *Lactobacilli* es uno de los miembros de la microbiota intestinal más abundantes; principalmente en el intestino delgado (**Figura 2**) (Matos y Leulier, 2014) (Heeney et al., 2018).

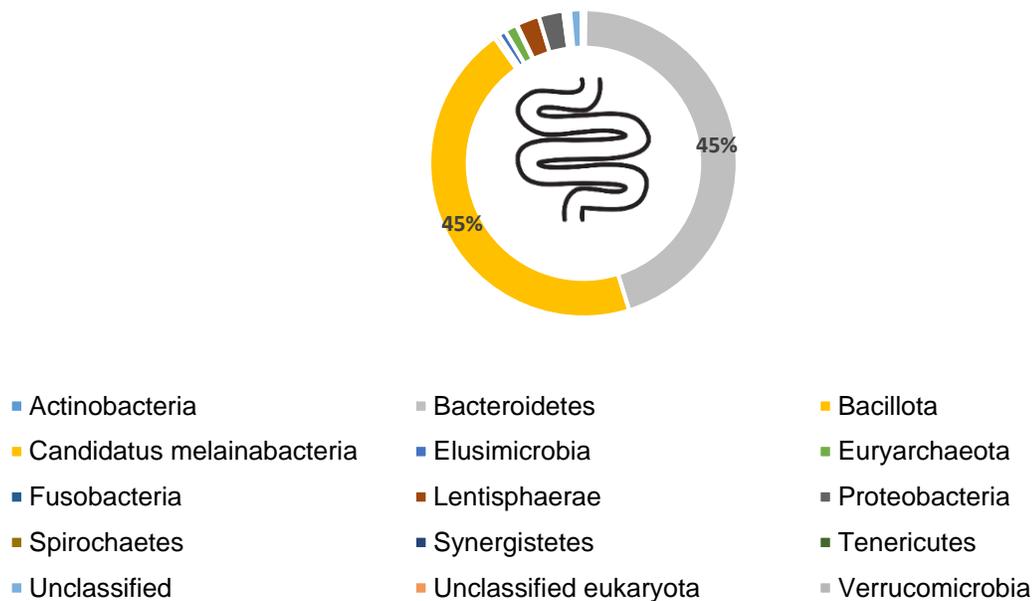


Figura 1. Abundancia relativa del filo Bacillota presente en la microbiota intestinal del humano. Datos tomados de (Resumen de especies | Atlas del microbioma, 2023).

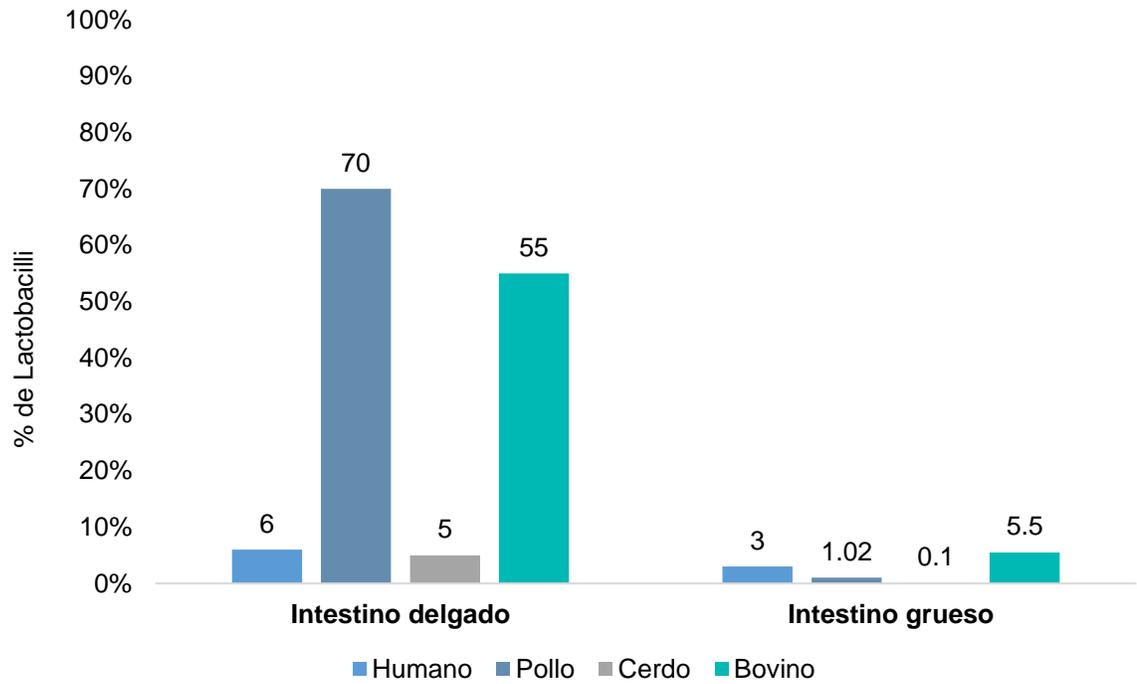


Figura 2. Prevalencia de Lactobacilli en el intestino en diferentes organismos. Datos obtenidos de: (Qi et al., 2023), (Amadis, 2023), (gutMGene, 2023), (ADDAGMA | Home, 2023), (Microbiome Atlas, 2023) y (MicrobiomeDB, 2023).

2.2. Diversidad de Lactobacilli en el intestino

Actualmente, el género Lactobacilli está integrado por 205 especies, resultado de un proceso exhaustivo de reclasificación (**Cuadro 1**) (Zheng et al., 2020a). En el intestino de humanos, pollos, cerdos y bovinos se han identificado 13 especies como las más prevalentes (**Cuadro 2**); esto ha sido corroborado por múltiples estudios metagenómicos depositados en la base de datos especializados en la microbiota intestinal; por ejemplo, (Qi et al., 2023), (Amadis, 2023), (gutMGene, 2023), (ADDAGMA, 2023), (Microbiome Atlas, 2023) y (MicrobiomeDB, 2023).

Cuadro 1. Nomenclatura actual de especies de Lactobacilli del tracto gastrointestinal. Tomado y modificado de (Zheng et al., 2020a).

Nomenclatura anterior	Nomenclatura actual
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus agilis</i>	<i>Lactobacillus agilis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>

Cuadro 2. Especies de Lactobacilli presentes en mamíferos y aves.

Especie	Humano*	Pollo	Cerdo	Bovino
<i>L. acidophilus</i>	✓	✓	✓	X
<i>L. agilis</i>	✓	✓	X	X
<i>L. brevis</i>	✓	X	X	✓
<i>L. casei</i>	✓	X	X	✓
<i>L. delbrueckii</i>	✓	✓	X	X
<i>L. fermentum</i>	✓	X	X	X
<i>L. gasseri</i>	✓	✓	X	X
<i>L. johnsonii</i>	✓	X	X	X
<i>L. paracasei</i>	✓	X	✓	✓
<i>L. plantarum</i>	✓	X	X	✓
<i>L. reuteri</i>	✓	✓	✓	X
<i>L. rhamnosus</i>	✓	X	X	X
<i>L. salivarius</i>	✓	✓	✓	✓

*Presencia es indica con el símbolo ✓ y ausencia con X.

2.3. Principales beneficios a la salud del hospedador, asociados al género Lactobacilli

En general, Lactobacilli promueve funciones básicas en el intestino; como mejorar la barrera epitelial, incrementar la protección de barrera de la mucosa intestinal, excluir microorganismos patógenos intestinales, producir sustancias antimicrobianas y mejorar la regulación nerviosa intestinal (Anderson et al., 2010; Barrett et al., 2012; Diana et al., 2014; Segers y Lebeer, 2014; Singh et al., 2017). Sin embargo, las especies *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius* debido a su importancia son utilizadas principalmente como cepas de cultivos probióticos (Marco et al., 2021).

Cuadro 3. Principales beneficios de especies Lactobacilli en el hospedador.

Beneficio	Potencial mecanismo	Referencia
Mejora la barrera epitelial intestinal	Regulan la expresión de genes que codifican proteínas de unión estrecha, E-cadherina y β -catenina.	(Anderson et al., 2010)
Incrementa la protección de barrera de la mucosa intestinal	Favorece la expresión de mucinas MUC2 y MUC3.	(Singh et al., 2017)
Favorece la exclusión de microorganismos patógenos	Inhibe la adherencia bacteriana por bloqueo de receptores estéricos en los enterocitos.	(Segers y Lebeer, 2014)
Produce sustancias antimicrobianas	Producción de bacteriocinas que inhiben la síntesis de pared bacteriana.	(Singh et al., 2017) (Segers y Lebeer, 2014)
Mejora la regulación nerviosa intestinal	Favorece la movilidad y secreciones intestinales a través de la producción de Ácido γ -aminobutírico (GABA)	(Barrett et al., 2012) (Diana et al., 2014)

2.4. Potencial probiótico de *L. plantarum*

2.4.1 Características generales

L. plantarum es una bacteria ácido láctica Gram positiva y homofermentativa, que se encuentra comúnmente en alimentos fermentados y en el tracto gastrointestinal de los humanos, aves y mamíferos (Wu et al., 2016). Tiene forma de bacilo y no forma esporas, por lo que es considerada GRAS. Es catalasa negativa, lo que significa que no produce la enzima catalasa, y puede crecer en un rango de temperatura de 15 a 45°C, así como tolerar un amplio rango de pH entre 4 y 9 (Huang et al., 2024).

L. plantarum es conocida por producir ácido láctico como su principal producto metabólico, contribuyendo a la conservación de alimentos y la inhibición de patógenos. Además, se destaca por su capacidad probiótica, mejorando la salud intestinal y fortaleciendo el sistema inmunológico, lo que la convierte en una especie de gran interés tanto en la fermentación de alimentos como en aplicaciones de salud (Yadav et al., 2022).

2.4.2 Características bioquímicas y moleculares

L. plantarum tiene un metabolismo basado en la fermentación homoláctica donde la sacarosa es hidrolizada por la enzima sacarasa en glucosa y fructosa. Luego, la glucosa es metabolizada a través de la glucólisis, produciendo piruvato. Finalmente, el piruvato es convertido en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (Huang et al., 2021). Tiene la capacidad de producir sustancias bioactivas como exopolisacáridos, ácido γ -aminobutírico, ácido fólico y riboflavina, que ofrecen propiedades funcionales en alimentos fermentados (Nam et al., 2022).

También presenta una mayor capacidad de utilización de carbohidratos, lo que contribuye a una amplia adaptabilidad en varios entornos con diferentes carbohidratos como la celobiosa, manosa, D-ribosa y L-fucosa, así como también poder fermentar fructooligosacáridos (FOS) y galactooligosacáridos (GOS) (Y. Huang et al., 2024).

De acuerdo con la información adquirida a partir de la secuencia completa del genoma de *L. plantarum* WCFS1 se sabe que cuenta con genes específicos que codifican para la adhesina específica de manosa y la flagelina, lo que le confiere la capacidad de adherirse y colonizar en tipos diferentes de superficies y nichos (Buntin et al., 2017). De igual manera cuenta con la capacidad de producir una variedad de bacteriocinas, principalmente las plantaricinas (Yadav et al., 2022).

2.4.3 Efecto probiótico de *L. plantarum* en la salud humana, producción avícola, porcina, bovina y alimentaria.

Estudios previos en humanos han identificado que *L. plantarum* puede mejorar la actividad digestiva, fortalecer el sistema inmunológico y contribuir a la disminución de colesterol LDL (**Cuadro 4**) por lo que se emplea como componente principal en suplementos probióticos (Huang et al., 2021). Se ha registrado que el empleo de *L. plantarum* en animales dirigidos a la producción contribuye al incremento de la conversión alimenticia aumentando el peso del animal en poco tiempo y reduce el estrés.

L. plantarum es ampliamente utilizado en la fermentación de alimentos debido a sus múltiples beneficios para la salud y calidad del producto, debido a que tiene la capacidad de mejorar las características sensoriales como las propiedades nutricionales en alimentos fermentados.

Cuadro 4. Aplicación de *L. plantarum* con beneficio probiótico en la salud humana, producción animal e industria alimentaria.

Efecto probiótico	Aplicación	Referencia
Producción de bacteriocinas (plantaricinas).	<ul style="list-style-type: none"> • En suplementos alimenticios para adultos con síndrome del colon irritable. En lactantes para mejorar la digestión de la lactasa. • En terneros y lechones para metabolizar la lactosa y mejorar la digestión. <ul style="list-style-type: none"> • En pollos para combatir <i>Salmonella Typhimurium</i>. • En la industria alimentaria para prolongar la vida útil de los alimentos fermentados. 	(Hernández et al., 2021; Huang et al., 2021; Liu et al., 2018; Nam et al., 2022)
Producción de ácido láctico	<ul style="list-style-type: none"> • En alimentos fermentados para mejorar el sabor y textura. 	(Yadav et al., 2022)
Producción de riboflavina	<ul style="list-style-type: none"> • En la industria alimentaria como antioxidante. 	(Chang et al., 2012)
Producción de adhesinas (manosa y flagelina)	<ul style="list-style-type: none"> • Suplementos alimenticios para humanos y animales para combatir la <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC) es una de las principales causas de diarrea infecciosa en humanos y animales. 	(Subramaniyan y Gurumurthy, 2019; Zhang et al., 2020)

2.5 Potencial probiótico de *L. reuteri*

2.5.1 Características generales

L. reuteri es una bacteria probiótica Gram positiva y heterofermentativa que se encuentra naturalmente en el tracto gastrointestinal de humanos y otros animales. Esta bacteria tiene forma de bacilo y no forma esporas. Es catalasa negativa, puede crecer en un rango de temperaturas de 15 a 45°C y tolera un amplio rango de pH entre 4 y 9 (Peng et al., 2023). *L. reuteri* produce ácido láctico como su principal producto metabólico, contribuyendo a la salud intestinal al inhibir patógenos y fortalecer el sistema inmunológico, lo que la hace valiosa tanto en aplicaciones de salud humana como en la fermentación de alimentos (Zhang et al., 2020).

2.5.2 Características bioquímicas y moleculares

L. reuteri es una de las cepas más estudiadas del género Lactobacilli. Su morfología y crecimiento se ven afectados por el genotipo del huésped y factores ambientales, como la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno y los componentes dietéticos del huésped. Las diferencias genéticas y ambientales conducen a la heterogeneidad fenotípica de las cepas de *L. reuteri* (Rao et al., 2021).

Sin embargo, las diferentes cepas de *L. reuteri* desempeñan un papel regulador en varias enfermedades sistémicas a través de un mecanismo inmunorregulador muy complejo (Yu et al., 2023a). Pueden colonizar y sobrevivir en el tracto gastrointestinal utilizando sus propiedades de resistencia y adhesión ácido-base, por lo que se les facilita interactuar con las células epiteliales intestinales del huésped con la finalidad de mejorar barrera de la mucosa intestinal y regular las células inmunes, los factores inflamatorios, citosinas y anticuerpos (Y. Liu et al., 2019).

Pueden producir derivados indólicos del triptófano, secretar exopolisacáridos y otros factores bioactivos, lo que les permite mejorar las uniones estrechas, regular la expresión genética, mejorar la actividad antioxidante y regular el sistema inmunológico (Rao et al., 2021). Gracias a estas características *L. reuteri* tiene el potencial de ser utilizado como una nueva terapia terapéutica o terapia complementaria en enfermedades atópicas o autoinmunes (Yu et al., 2023a).

2.5.3 Efecto probiótico de *L. reuteri* en la salud humana, producción avícola, porcina, bovina y alimentaria.

L. reuteri es valiosa en la alimentación de humanos, rumiantes y porcinos, su implementación en la dieta mejora la salud digestiva, fortalece el sistema inmunológico, incrementa la conversión alimenticia y reduce el estrés. Su uso contribuye a una producción animal más sostenible y eficiente, beneficiando tanto a los animales como a los productores.

Cuadro 5. Aplicación de *L. reuteri* con beneficio probiótico en la salud humana, producción animal e industria alimentaria.

Efecto probiótico	Aplicación	Referencia
Producción de ácido γ -aminobutírico.	<ul style="list-style-type: none"> • En humanos reduce significativamente los niveles de citocinas proinflamatorias y moviliza una respuesta inmune sistémica. • En pacientes con cáncer colorrectal reduce las actividades de la β-glucuronasa, nitroreductasa, azoreductasa y otras enzimas microbianas y produce compuestos que inhiben la proliferación tumoral. • En lechones inhibe la cantidad de copias de los genes para <i>E. coli</i> y la enterotoxina termoestable en las heces. • En pollos reduce el crecimiento de salmonella entérica. • En bovinos regula la secreción de citocinas inflamatorias para reducir el estrés oxidativo. 	(Liu et al., 2019; Peng et al., 2023; Yu et al., 2023b; Zhang et al., 2020)
Producción de ácido láctico	<ul style="list-style-type: none"> • Industria alimentaria como antioxidante. 	(Luo et al., 2023)

2.6 Potencial probiótico de *L. salivarius*

2.6.1 Características generales

L. salivarius tiene forma bacilar, se encuentra naturalmente en el tracto gastrointestinal. No produce esporas y es catalasa negativa. Esta bacteria tiene una gran tolerancia al pH, crece adecuadamente en un rango de pH entre 4 y 9, y puede prosperar en temperaturas de 15 a 45°C. Produce ácido láctico como su principal producto metabólico, lo que contribuye a la acidificación del entorno y a la inhibición de patógenos (Liu et al., 2018).

L. salivarius es conocido por sus beneficios probióticos, que incluyen la mejora de la salud intestinal, el fortalecimiento del sistema inmunológico y la prevención de infecciones, haciendo de ella un microorganismo importante en la promoción de la salud humana (Zhang et al., 2023).

2.6.2 Características bioquímicas y moleculares

Según estudios actuales, *L. salivarius* participa en el tracto intestinal del huésped produciendo metabolitos y regulando la microbiota intestinal (Tegegne y Kebede, 2022). Mediante su metabolismo produce ácido láctico, por lo que puede reducir el pH, inhibiendo así el crecimiento y la reproducción de bacterias patógenas que producen enzimas que pueden catalizar la conversión de precursores cancerígenos en carcinógenos, como la azo reductasa, la nitro reductasa y la β -glucosidasa (Kayal et al., 2022).

L. salivarius no sólo puede inhibir el crecimiento de estos microorganismos patógenos y reducir la producción de estas enzimas, sino que también puede inhibir la actividad enzimática (Chang et al., 2012). Así como también absorber y asimilar el colesterol sérico en enfermedades cerebrovasculares, coronarias, hipertensión arterial y diabetes tipo 2 (Wang et al., 2019).

Además, *L. salivarius* cuenta con la proteína de la capa S de la superficie, el polisacárido extracelular y el ácido lipoteicoico que le facilita adherirse a la mucosa intestinal (Kopp, 2001).

2.6.3 Efecto probiótico de *L. Salivarius* en la salud humana, producción avícola, porcina y bovina y alimenticia.

La suplementación dietética con *L. plantarum* contribuye a la salud de las pollos de engorda, aumenta la ganancia de peso, mejora el rendimiento del crecimiento y disminuye la presencia de *Salmonella* Typhimurium en el hígado, el bazo y el corazón de pollos de engorde (Nam et al., 2022).

Cuadro 6. Aplicación de *L. salivarius* con beneficio probiótico en la salud humana, producción animal e industria alimentaria.

Efecto probiótico	Aplicación	Referencia
<p>Inhibe la actividad enzimática de reductasa, la nitro reductasa y la β-glucosidasa</p>	<ul style="list-style-type: none"> • En humanos reduce las infecciones intestinales por <i>E. coli</i>. • En bovinos metabolizan mejor los nutrientes, lo que puede llevar a un mejor crecimiento y desarrollo. • En porcinos y pollos como alternativa viable a antibióticos como la tetraciclina y penicilina. • En la industria alimentaria como conservantes en productos cárnicos y lácteos y sus derivados. 	<p>(Hill et al., 2014b; Huang et al., 2024; Wang et al., 2022; Xu et al., 2022)</p>
<p>Absorbe el colesterol sérico</p>	<ul style="list-style-type: none"> • En humanos reduce el colesterol LDL plasmático aumentando la expresión hepática de LDLR y SREBP2. • En pacientes con enfermedades cardiovasculares reduce los niveles de colesterol en la sangre e inhibe el desarrollo de la aterosclerosis. 	<p>(Wang et al., 2022; Xu et al., 2022)</p>
<p>Cuenta con polisacárido extracelular y el ácido lipoteicoico que les facilita la adhesión a la mucosa intestinal</p>	<ul style="list-style-type: none"> • En humanos y en producción animal su consumo es importante después de un tratamiento con antibióticos. 	<p>(Fishbein et al., 2023; Johnston et al., 2011)</p>

III. JUSTIFICACIÓN

Los metabolitos producidos por cepas de Lactobacilli generan efectos benéficos en el consumidor mejorando la salud intestinal, inmunológica y cardiovascular. El desarrollo de una herramienta molecular que permita cuantificar especies de Lactobacilli con potencial probiótico presentes en el intestino de aves y mamíferos, permitirá generar datos de prevalencia, distribución y abundancia de estas especies en la microbiota intestinal de estos animales. Estos datos representarán un marco de referencia para futuros estudios enfocados a evaluar la salud de estos animales, y su potencial como fuente de aislamiento de especies de Lactobacilli para el desarrollo de probióticos que contribuyan a la salud animal y humana.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Desarrollar una estrategia molecular para estimar la prevalencia, distribución y abundancia relativa de especies de Lactobacilli en muestras de intestino de pollos y mamíferos.

4.2 Objetivos Específicos

- I.** Identificar marcadores moleculares de especies de Lactobacilli de origen intestinal con potencial probiótico mediante estudios genómicos comparativos.
- II.** Diseñar una estrategia molecular para detectar y cuantificar especies de Lactobacilli en muestras intestinales de pollos y mamíferos.
- III.** Identificar la prevalencia, distribución y abundancia relativa de especies de Lactobacilli en el intestino de pollos y mamíferos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Selección de especies de Lactobacilli reportados en la literatura

Se realizó una revisión exhaustiva de la literatura utilizando servidores de búsqueda especializados como PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com/>), y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) relacionada con estudios previos de identificación de especies de Lactobacilli en muestras provenientes de intestino delgado de mamíferos y aves.

5.2. Análisis de especificidad y cobertura de iniciadores de especies de Lactobacilli

Se realizó un análisis exhaustivo de la literatura para identificar iniciadores de PCR previamente reportados y validados dirigidos a la amplificación de las especies de Lactobacilli identificadas de importancia en el estudio. Mediante la utilización de la herramienta bioinformática MEGA 11.0 se realizó un análisis de cobertura y especificidad a cada par de iniciadores de PCR extraídos de la literatura (Kumar et al., 2018).

5.1. Diseño de iniciadores para especies de Lactobacilli

Con la utilización de la herramienta bioinformática Oligo Analyzer del IDT (OligoAnalyzer Tool- primer analysis | IDT (idtdna.com)) se diseñaron iniciadores de PCR con el objetivo de aumentar la cobertura de amplificación para cada especie de Lactobacilli. Los parámetros tomados en cuenta para el diseño de los iniciadores de PCR fueron porcentajes de 40-60 % de GC, la diferencia de 5°C de temperatura entre los pares de iniciadores y que no formaran heterodímero. Las regiones conservadas de las especies de Lactobacilli fueron identificadas con la herramienta MEGA 11(Kumar et al., 2018).

5.3. Estandarización de iniciadores de PCR para la detección de especies de Lactobacilli

5.1.1. Material biológico

5.1.1.1. Identificación de muestras ideales para aislamiento de especies de Lactobacilli

Mediante la revisión de literatura, el análisis de las bases de datos de la ISSAP y la OMS, y una evaluación de mercado, se identificaron las especies de Lactobacilli más utilizadas en cultivos probióticos para consumo humano. Además, se seleccionaron muestras fecales de distintos organismos (pollo, cerdo y rumiantes), asegurándose de que estas muestras no tuvieran más de un año de antigüedad.

5.1.1.2. Aislamiento de especies de Lactobacilli

Para el aislamiento fueron activadas las cepas de Lactobacilli provenientes de probióticos de farmacia y heces de pollos, bovinos y porcinos en caldo MRS, con volúmenes de 100 µl de los probióticos de farmacia + 5ml de caldo MRS y 1g de heces + 5ml de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe), se incubaron a 37°C por 24 horas. Al finalizar la incubación, se sembraron 100 µl del crecimiento obtenido en Agar MRS y se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 horas.

5.1.1.3. Extracción de DNA

Las colonias presuntivas de Lactobacilli fueron inoculadas en caldo MRS con volumen de 100 µl de colonia + 5ml de caldo MRS y se incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se tomó 1ml de caldo MRS y se llevó a cabo la extracción de ADN utilizando el kit comercial Quick-DNA Miniprep Zymo Research (Catálogo D3024) obteniendo un volumen final de elución de 50 µl. Las extracciones de ADN se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Borowiak et al., 2020). Se evaluó la pureza del ADN con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific), evaluando que los parámetros A260/280 fueran mayor o igual a 1.8.

5.1.1.4. Identificación las especies de *Lactobacilli*

Se realizó una PCR punto final dirigida a la amplificación del gen *16S rRNA* utilizando los iniciadores 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1410 (GACGGGCGGTGTGTRCA) con las siguientes condiciones (2 µl de ADN con concentración 5ng/ µl, 1.7 µl buffer de reacción 10X, 0.34 µl dNTPs con concentración 10mM, 0.68 µl cada de iniciador de PCR (sentido y antisentido), 0.085 µl de Taq Polimerasa DREAM y 11 µl de H₂O para PCR para un volumen total de 17 µl. El protocolo de PCR empleado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineación por 30 seg, extensión a 72 °C por 30 seg y extensión final 72 °C por 2 min.). Los productos obtenidos se secuenciaron con la tecnología Sanger en un equipo 3130, 3500/SeqStudio™ Flex and 3730 Series Genetic Analyzers. Las secuencias parciales del gen *16S rRNA* fueron sometidas a análisis bioinformático utilizando la herramienta BLAST del NCBI y la colección de secuencias del GenBank (L. Zhang et al., 2020).

5.1.2. Selección de temperaturas óptimas de alineación de iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de especies de *Lactobacilli*

Se realizaron gradientes de temperaturas de alineación para cada par de iniciadores de PCR con el objetivo de identificar las condiciones que generan los mejores productos de la PCR, se analizó la intensidad de las bandas que se visualizaron y el tamaño de amplicón obtenido de cada reacción. El rango de temperatura evaluado fue de 50 °C – 60 °C. Los ensayos de PCR fueron realizados utilizando: 2 µl de ADN con concentración 5ng/ µl, 1.7 µl buffer de reacción 10X, 0.34 µl dNTPs con concentración 10mM, 0.68 µl cada de iniciador de PCR (sentido y antisentido), 0.085 µl de Taq Polimerasa DREAM y 11 µl de H₂O para PCR para un volumen total de 17 µl. El protocolo de PCR empleado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineación por 30 seg (gradientes de temperatura), extensión a 72 °C por 30 seg y extensión final 72 °C por 2 min. También, se utilizó 2 gradientes de

temperatura específicos (**Cuadro 7**). Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5 % teñido con bromuro de etidio (10mg/mL). Las condiciones de corrida fueron 100 V por 25 min y cada pozo del gel fue cargado con 5 µl. Al finalizar la corrida los geles fueron analizados para verificar la intensidad de las bandas y el tamaño del amplicón utilizando el fotodocumentador (MiniBis Pro).

Cuadro 7. Gradientes de temperatura de alineación de iniciadores de PCR utilizados.

Gradiente 1	Gradiente 2
A: 60°C	A: 65°C
B: 59.2°C	B: 64.6°C
C: 58°C	C: 64°C
D: 56.1°C	D: 63.1°C
E: 53.8°C	E: 61.9°C
F: 51.9°C	F: 61°C
G: 50.7°C	G: 60.4°C
H: 50°C	H: 60°C

5.2. Estandarización y validación de ensayos de qPCR para la detección y cuantificación de especies de Lactobacilli

5.2.1. Análisis de sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad

Se realizaron y analizaron curvas estándar de amplificación mediante la realización de diluciones quintuples seriadas (1:5), de ADN de controles positivos con concentraciones conocidas. Mediante la utilización del software del equipo CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Se obtuvieron los resultados de eficiencia del ensayo y valor de R con el objetivo de conocer la linealidad de los resultados.

La reproductibilidad del ensayo se evaluó con el análisis de curvas de amplificación de cada muestra, verificando el valor de Ct. Las muestras con la misma concentración de ADN generaron valores de Ct equivalentes. Los valores de Ct fueron calculados con el software del equipo CFX96 Real – Time PCR Detection System (Bio-Rad).

5.2.2. Análisis de especificidad

La especificidad se evaluó mediante el análisis de las curvas de disociación generadas por el equipo CFX96. Los productos específicos de cada especie de interés generaron una sola curva de disociación, basada en el valor de T_m de cada amplicón (Tolosi et al., 2021).

5.3. Detección y cuantificación de especies de Lactobacilli en muestras de heces provenientes de sistemas de producción animal.

5.3.1. Material biológico

Para la implementación de los ensayos de qPCR previamente validados se utilizó un total de 60 muestras de heces pertenecientes al banco de muestras de DNA del Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM) de la Facultad de Química de la UAQ, provenientes de sistema de producción avícola (n = 20), porcina (n = 20) y bovina (n = 20). El ADN utilizado cumplía con los parámetros de calidad necesarios para ensayos de qPCR y contaba con una concentración de 5 ng/ul.

5.3.2. Implementación de ensayos de qPCR para la identificación y cuantificación de especies de Lactobacilli en muestras clínicas provenientes de sistemas de producción animal.

Los ensayos de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador tiempo real, modelo CFX96 Touch™ (Bio-rad), utilizando la Taq Polimerasa comercial PowerUp™ SYBR® Green Master Mix for qPCR (Thermo Scientific), bajo las siguientes condiciones: 3 µl de ADN con concentración 5 ng/ µl, 6 µl PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, 0.48 µl de iniciadores de PCR con concentración de 1 µM y 0.60 µl de

BSA diluido 1:100 para un volúmen final de 12 µl por reacción. La amplificación se realizó con el siguiente protocolo: Activación 50°C por 2 min, desnaturalización inicial y activación de la Taq 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización 95 °C por 30 seg, alineación en correspondencia a la estandarización de cada iniciador de qPCR por 30 seg, extensión 72 °C por 30 seg y extensión final 72 °C por 3 min.

5.4. Análisis Estadístico

El análisis de abundancias relativas de los resultados obtenidos se llevó a cabo utilizando la prueba estadística ANOVA y Tukey para realizar las comparaciones múltiples entre los grupos de estudio. Considerando diferencias significativas cuando un valor de $P \geq 0.05$ (Oliveira et al., 2013) y los datos serán expresados como las medidas \pm el error estándar (SE).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación de especies de *Lactobacillaceae* prevalentes en el intestino de aves y mamíferos.

La diversidad de especies de *Lactobacillaceae* prevalentes en el sistema intestinal de humanos, aves y mamíferos, se obtuvo mediante el análisis de 164 artículos publicados en los últimos 5 años. La clasificación de estas especies bacterianas fue revisada y actualizada con la base de datos del List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) (Meier et al., 2022). A partir de esta colección de artículos publicados y resultados metagenómicos de muestras intestinales, depositados en las bases de datos especializadas; por ejemplo, ADDAGMA (Xu et al., 2022), Amadis (Li et al., 2021), gutMGene (Qi et al., 2023), Microbiome Atlas (Wang et al., 2023), MicrobiomeDB (Oliveira et al., 2018) se identificó que la abundancia relativa de la familia *Lactobacillaceae* fue del 45% en el intestino de pollos, seguido de 43% en humanos, 20% en bovinos y el 5% en cerdos (**Figura 3**). Estos datos indican que *Lactobacillaceae* es una de las principales familias en el intestino de aves y humanos. Estos hallazgos son similares a lo reportado por otros estudios (Hammes y Hertel, 2015; Huynh y Zastrow, 2023; Kim et al., 2020; Nam et al., 2022; Scillato et al., 2021).

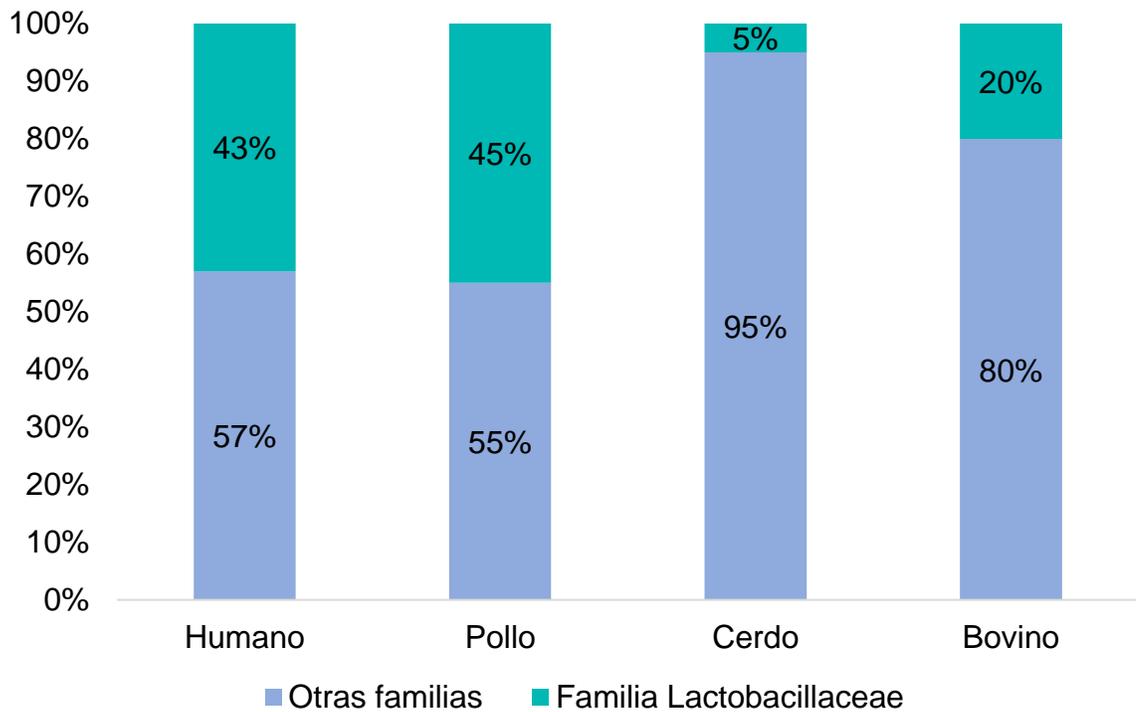


Figura 3. Abundancia relativa de la familia *Lactobacillaceae* en el intestino de aves y mamíferos.

Basado en la clasificación actual descrita en el LPSN (Zheng et al., 2020b) se identificaron 13 especies de Lactobacilli prevalentes en el sistema intestinal de aves y mamíferos, y que además han utilizadas como cultivos probióticos (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Especies de Lactobacilli prevalentes en el intestino de aves y mamíferos.

Especies de Lactobacilli	Vinculo a base de datos LPSN	Referencias
<i>L. acidophilus</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactobacillus-acidophilus	(Roos y Vuyst, 2018; Marco et al., 2021; Zheng et al., 2020b)
<i>L. agilis</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactobacillus-agilis	(Hill et al., 2014b; Marco et al., 2021)
<i>L. brevis</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/levilactobacillus-brevis	(Roos y Vuyst, 2018; Marco et al., 2021; Zheng et al., 2020b)
<i>L. casei</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactobacillus-casei	(Roos y Vuyst, 2018; Marco et al., 2021; Zheng et al., 2020b)
<i>L. delbrueckii</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactobacillus-delbrueckii	(Hill et al., 2014a; Zheng et al., 2020b)
<i>L. fermentum</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactobacillus-fermentum	(Hill et al., 2014a; Zheng et al., 2020b)
<i>L. gasseri</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactobacillus-gasseri	(Hill et al., 2014b; Marco et al., 2021)
<i>L. johnsonii</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactobacillus-johnsonii	(Hill et al., 2014b; Marco et al., 2021)
<i>L. paracasei</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactobacillus-paracasei	(Hill et al., 2014a; Zheng et al., 2020b)
<i>L. plantarum</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactilantibacillus-plantarum	(Roos y Vuyst, 2018; Marco et al., 2021; Zheng et al., 2020b)
<i>L. reuteri</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/limosilactobacillus-reuteri	(Marco et al., 2021; Zheng et al., 2020a)
<i>L. rhamnosus</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/lactiaseibacillus-rhamnosus	(Hill et al., 2014b; Marco et al., 2021)
<i>L. salivarius</i>	https://lpsn.dsmz.de/species/ligilactobacillus-salivarius	(Hill et al., 2014b; Marco et al., 2021)

Además, el análisis de datos metagenómicos reveló que *L. plantarum* (16.2%, promedio) es la especie más prevalente, seguida de *L. salivarius* (12.6%), *L. brevis* (11.1%), *L. reuteri* (10.1%), *L. delbrueckii* (8.4%), *L. acidophilus* (8.0%), *L.*

fermentum (6.4%) y *L. lactis* (5.1%). La elevada abundancia de estas especies, en el sistema intestinal también ha sido reportada en humanos (Callaghan y Toole, 2013), ratones (Lv et al., 2023), rumiantes (Li et al., 2023), animales de compañía (Son et al., 2023) y peces (Saadony et al., 2021).

Cuadro 9. Abundancia relativa* de especies de Lactobacilli en el intestino delgado de aves y mamíferos.

Especies	Humano (%)	Pollo (%)	Cerdo (%)	Bovino (%)	Promedio (%)
<i>L. plantarum</i>	14.3	12.9	18.6	18.9	16.2
<i>L. salivarius</i>	14.0	17.1	19.4	-	12.6
<i>L. brevis</i>	13.5	-	14.6	16.4	11.1
<i>L. reuteri</i>	3.7	17.1	19.4	-	10.1
<i>L. delbrueckii</i>	13.5	20.0	-	-	8.4
<i>L. acidophilus</i>	7.7	10.0	-	14.2	8.0
<i>L. fermentum</i>	6.0	-	-	19.6	6.4
<i>L. lactis</i>	-	-	-	20.5	5.1
<i>L. paracasei</i>	0.3	-	17.2	-	4.4
<i>L. rhamnosus</i>	12.5	-	-	-	3.1
<i>L. crispatus</i>	-	11.4	-	-	2.9
<i>L. agilis</i>	-	7.1	-	-	1.8
<i>L. casei</i>	1.5	-	-	-	0.4
<i>L. gaserii</i>	0.8	-	-	-	0.2
<i>L. johnsonii</i>	0.5	-	-	-	0.1
Otras	11.7	4.3	10.8	10.4	9.3
Total	100	100	100	100	100

*Abundancia relativa de especies de Lactobacilli pertenecientes a la familia *Lactobacillaceae* (100%). No se incluyeron el resto de las familias bacterianas en el análisis.

6.2. Principales especies de Lactobacilli con potencial probiótico

El análisis de artículos científicos publicados e indexados en PubMed, identificó un total de 74,074 reportes que describen especies de Lactobacilli asociadas a cultivos probióticos; de los cuales el 72% corresponde a *L. delbrueckii*, 6% *L. plantarum*, 5% *L. rhamnosus*, 4% *L. acidophilus* y 8% *L. casei*, *L. salivarius* y *L. reuteri*, en conjunto (**Cuadro 10**). Estos resultados, integrados con los datos de abundancia relativa, sugieren que estas 7 especies de Lactobacilli son las más estudiadas por su potencial probiótico y representan las especies de *Lactobacillaceae* más prevalente en el intestino de aves y mamíferos. Estas especies de Lactobacilli han demostrado beneficios en la salud del huésped a través de la regulación de respuesta inmunológica (Yu et al., 2023b), producción de sustancias antimicrobianas que inhiben la colonización de patógenos (Scillato et al., 2021), producción de ácidos orgánicos que regulan la homeostasis intestinal (Glendinning et al., 2019), promueven la exclusión competitiva a través de la adhesión y colonización de la mucosa intestinal (Marco et al., 2021).

Cuadro 10. Especies de Lactobacilli y número de artículos científicos publicados describiendo su potencial probiótico.

Especies	Propiedades	No. de artículos
<i>L. delbrueckii</i>	Coloniza el tracto intestinal, modula la respuesta inmunitaria y aumenta la producción de anticuerpos (Marco et al., 2021).	53,086
<i>L. plantarum</i>	Produce bacteriocinas de amplio espectro, coloniza el tracto intestinal y digiere la lactosa (Glendinning et al., 2019).	4,360
<i>L. rhamnosus</i>	Coloniza el tracto intestinal a través de la producción de pili (Marco et al., 2021).	3,844
<i>L. acidophilus</i>	Produce bacteriocinas y ácidos orgánicos (Glendinning et al., 2019).	2,952
<i>L. casei</i>	Coloniza el tracto intestinal y digiere la lactosa y carbohidratos complejos (Marco et al., 2021).	2,187
<i>L. salivarius</i>	Coloniza el tracto intestinal a través de residuos de prolina que se unen a las células epiteliales (Marco et al., 2021).	1952
<i>L. reuteri</i>	Modula la respuesta inmunitaria y aumenta la producción de anticuerpos (Yu et al., 2023b).	1,774
<i>L. paracasei</i>	Coloniza el tracto intestinal y digiere la lactosa y carbohidratos complejos (Marco et al., 2021).	1,369
<i>L. fermentum</i>	Coloniza el tracto intestinal y digiere la lactosa y carbohidratos complejos (Marco et al., 2021).	1,103
<i>L. gasseri</i>	Produce ácidos orgánicos (Glendinning et al., 2019).	566
<i>L. brevis</i>	Coloniza el tracto intestinal y digiere la lactosa (Marco et al., 2021).	481
<i>L. johnsonii</i>	Produce ácidos orgánicos (Glendinning et al., 2019).	363
<i>L. agilis</i>	Produce ácidos orgánicos (Glendinning et al., 2019).	37

6.3. Aislamiento de especies de Lactobacilli a partir de probióticos comerciales, muestras intestinales de aves y mamíferos

Se analizaron un total de 114 muestras, obtenidas a partir de probióticos comerciales (n = 33), heces de pollos (n = 46) y heces de cerdo (n = 35), que se sometieron a ensayos microbiológicos encaminados al aislamiento de especies de Lactobacilli. A partir de estos análisis se obtuvieron 34 cultivos puros de bacterias con características morfológicas semejantes a Lactobacilli, las cuales se identificaron a través de la amplificación parcial del gen *16S rRNA* y secuenciación Sanger. En total, se lograron identificar 14 cultivos de Lactobacilli pertenecientes a 3 especies (**Cuadro 11**). Especies de Lactobacilli genéticamente similares a los aislamientos obtenidos en el presente estudio también han sido identificados en el sistema intestinal de otras aves y mamíferos. Por ejemplo, *L. salivarius* (identidad = 93% - 99%) identificado en el intestino de equino, tejones y pollos de engorda (Jassim et al., 2005) (Wang et al., 2023) (Han et al., 2024), *L. ingluviei* (identidad = 94%) identificado en la vagina humana (Purkayastha et al., 2019) y *L. reuteri* (identidad n= 88% - 99%) identificado en la leche materna y heces de pollo (Cui et al., s/f), (Wang et al., 2014). Basados en sus propiedades probióticas, elevada abundancia en el intestino, disponibilidad de cepas para la estandarización, ensayos de PCR, e interés de la comunidad científica, se seleccionaron *L. plantarum*, *L. salivarius* y *L. reuteri* como especies de interés para el desarrollo de herramientas moleculares orientadas a la detección y cuantificación de estas bacterias.

Cuadro 11. Identificación de especies de Lactobacilli recuperadas de probióticos comerciales y muestras intestinales de pollos y mamíferos.

Origen	Especie	Valor – E*	Identidad (%)	Número de acceso	Vínculo
Heces pollo	<i>L. salivarius</i>	0	97.6	AY389802.1	@
Heces pollo	<i>L. ingluviei</i>	0	93.8	KU184475.1	@
Heces pollo	<i>L. reuteri</i>	0	99.4	CP089303.1	@
Heces cerdos	<i>L. johnsonii</i>	2.0E-131	94.0	MH701973.1	@
Heces cerdos	<i>L. salivarius</i>	0	98.8	CP114501.1	@
Heces cerdos	<i>L. reuteri</i>	0	88.0	PQ662318.1	@
Heces cerdos	<i>L. amylovorus</i>	0	96.8	PP733320.1	@
Heces cerdos	<i>L. johnsonii</i>	0	98.3	MF193444.1	@
Heces cerdos	<i>L. reuteri</i>	0	90.8	MT115112.1	@
Heces cerdos	<i>L. salivarius</i>	0	96.4	MK572795.1	@
Heces cerdos	<i>L. salivarius</i>	0	97.9	CP104732.1	@
Probiótico 2	<i>L. salivarius</i>	0	93.0	CP117983.1	@
Probiótico 5	<i>L. salivarius</i>	0	95.3	MW866901.1	@
Probiótico 6	<i>L. plantarum</i>	0	99.5	OR431011.1	@

*Valor-E: Valor de la probabilidad que la secuencia encontrada sea un fenómeno aleatorio.

6.4. Desarrollo de un ensayo molecular para la identificación y cuantificación de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius*

Mediante una revisión exhaustiva de la literatura, se identificaron 7 iniciadores de PCR dirigidos a la amplificación de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius*. Los análisis bioinformáticos de estos iniciadores revelaron una cobertura que varía del 76% al 87% y una especificidad del 86% y 90% para identificar los diferentes alelos del gen *16S rRNA* de estas 3 especies. Basados en estos resultados se seleccionaron los iniciadores con mayor porcentaje de cobertura y especificidad; posteriormente se modificó su secuencia, a través de análisis bioinformáticos, para incrementar el desempeño de los mismos (**Cuadro 12**).

Cuadro 12. Iniciadores de PCR identificados y modificados para detección y cuantificación de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius*.

<i>L. plantarum</i>						
	Sentido	Cobertura	Especificidad	Secuencias analizadas	Referencia	
Primer Original	F: GCTGGCAATGCCATCGTGCT	87%	90%	273	(Kim et al., 2020)	
	R: TCTCAACGGTTGCTGTATCG					
Modificaciones	F: GCTGGCAATG K CATCGTGCT	93%	100%		273	Presente estudio
	R: TCTCAACGGTTGCTGTATCG					
<i>L. reuteri</i>						
	Sentido	Cobertura	Especificidad	Secuencias analizadas		Referencia
Primer Original	F: GATTGACGATGGATCACCAGT	76%	86%	2,790	(Kim et al., 2020)	
	R: CATCCCAGAGTGATAGCCAA					
Modificaciones	F: GATTG Y CGATGGATCACCAGT	90%	100%		2,790	Presente estudio
	R: CATCCCAGAGTGAT R GCCAA					
<i>L. salivarius</i>						
	Sentido	Cobertura	Especificidad	Secuencias analizadas		Referencia
Primer Original	F: TACACCGAATGCTTGCAITCA	87%	90%	1,699	(Kim et al., 2020)	
	R: GGATCATGCGATCCTTAGAGA					
Modificaciones	F: TACACCG M ATGCTTGCAITCA	93%	100%		1,699	Presente estudio
	R: GGATCATGCGATCCT K GAGA					

6.5. Estandarización de ensayos de qPCR para la identificación y cuantificación de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius*

6.5.1. Estandarización de temperaturas de alineación de iniciadores de qPCR empleando ADN de aislamientos.

Con el objetivo de identificar las mejores condiciones para la amplificación parcial del gen *16S rRNA* de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius* se llevaron a cabo de ensayos de PCR con gradientes de temperaturas de alineación, en un rango de 50 – 60 °C. Estos ensayos revelaron que la mejor temperatura de alineación fue de 60 °C (**Cuadro 13**).

Cuadro 13. Temperaturas de alineación seleccionadas para el protocolo de PCR.

Iniciador de PCR	Objetivo de amplificación	Temperatura de alineación
Plantarum F Plantarum R	<i>L. plantarum</i>	60°C
Reuteri F Reuteri R	<i>L. reuteri</i>	60°C
Salivarius F Salivarius R	<i>L. salivarius</i>	63°C

6.5.2. Validación de ensayos de qPCR para la detección y cuantificación de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius*

Para evaluar el desempeño de los ensayos de qPCR, se utilizaron curvas estándar de cuantificación con DNA extraído de cultivos puros de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius*, con una concentración máxima de 136.5 y mínima de 22.9. Estos ensayos de qPCR tuvieron una eficiencia que varía entre 96% y 98%, una linealidad (R^2) del 0.98 al 0.99, una pendiente de -3.35 a -3.41 y una temperatura de disociación de 80 °C (**Cuadro 14**).

Cuadro 14. Parámetros obtenidos en las curvas de iniciadores de qPCR.

Iniciador de qPCR	Objetivo de amplificación	Eficiencia (%)	R ²	Pendiente	Temperatura de disociación
Plantarum F Plantarum R	<i>L. plantarum</i>	98.3	0.988	-3.363	80 °C
Reuteri F Reuteri R	<i>L. reuteri</i>	96.2	0.996	-3.416	82 °C
Salivarius F Salivarius R	<i>L. salivarius</i>	96.6	0.996	-3.356	80 °C

6.6. Detección y cuantificación de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius* en muestras fecales provenientes de sistemas de producción animal.

Para la implementación de los ensayos estandarizados se utilizaron un total de 60 muestras de heces obtenidas de animales alojados en sistemas de producción comercial. El total de muestras fue integrado por 20 muestras de ganado bovino, 20 muestras de cerdos y 20 muestras de pollos. Estos análisis revelaron una prevalencia de estas tres especies de Lactobacilli que varía entre 0% al 100% en heces de bovinos, cerdos y pollos (**Cuadro 15**).

Cuadro 15. Prevalencia de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius* en heces de bovino, cerdo y pollos.

Especie	Heces bovino	Heces cerdo	Heces pollo
<i>L. plantarum</i>	4/20 (20%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
<i>L. reuteri</i>	18/20 (90%)	20/20 (100%)	20/20 (100%)
<i>L. salivarius</i>	20/20 (100%)	20/20 (100%)	19/20 (95%)

Los análisis de cuantificación molecular revelaron una elevada abundancia absoluta de la familia *Lactobacillaceae* en bovinos (promedio = 11.72 UFC log₁₀/g), seguida

de cerdos (promedio = 11.64 UFC log₁₀/g), y pollos (promedio = 9.97 UFC log₁₀/g). La mayor abundancia de *L. plantarum* fue observada en heces de bovinos, seguida de *L. reuteri* en heces de cerdos y *L. salivarius* en heces de pollos (**Figura 4**). Con la finalidad de cuantificar de una manera más precisa la densidad de Lactobacilli, se llevó a cabo un análisis de abundancia de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius* relativo a la concentración de la familia *Lactobacillaceae*. Este análisis reveló una mayor abundancia de *L. plantarum* (promedio = 1.42 UFC log₁₀/g) en bovino, seguido de *L. reuteri* (promedio = 10.51 UFC log₁₀/g) en cerdos y *L. salivarius* (promedio = 11.27 UFC log₁₀/g) en bovinos (**Figura 5**). Estos resultados representan valores de densidad bacteriana normalizados, más aproximados a una cuantificación absoluta de cada grupo bacteriano. Densidades comparables de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius* han sido reportadas en análisis de muestras intestinales o heces de mamíferos, aves, peces, reptiles e invertebrados (Glendinning et al., 2019).

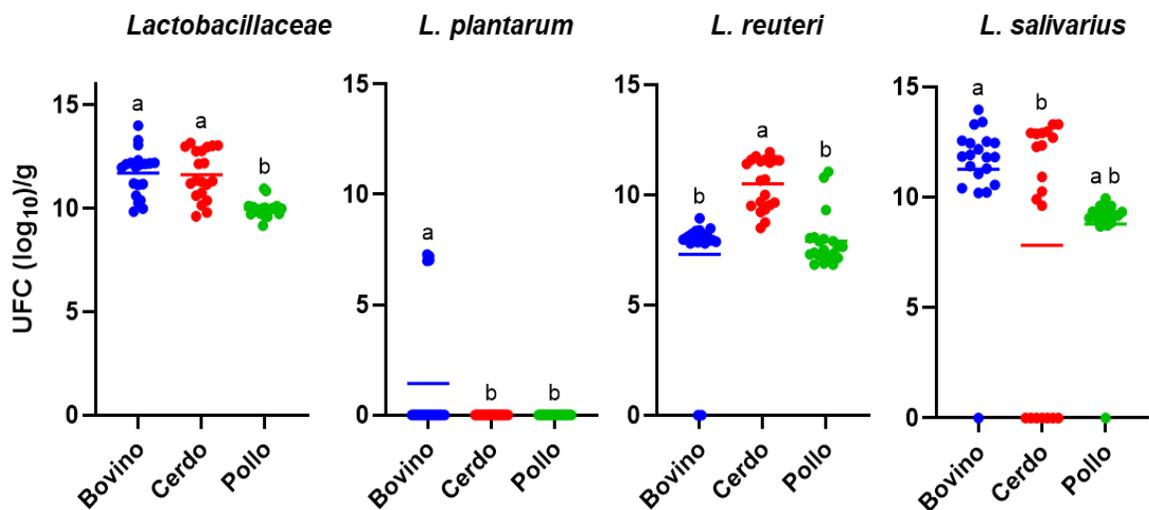


Figura 4. Abundancia de *Lactobacillaceae* y especies de Lactobacilli en muestras de heces de bovinos, cerdos y pollos. Cada círculo de color representa una muestra y la barra de color horizontal representa la media (n = 20). Los resultados fueron analizados por las pruebas de ANOVA y Tukey. Grupos con diferente literal representan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$).

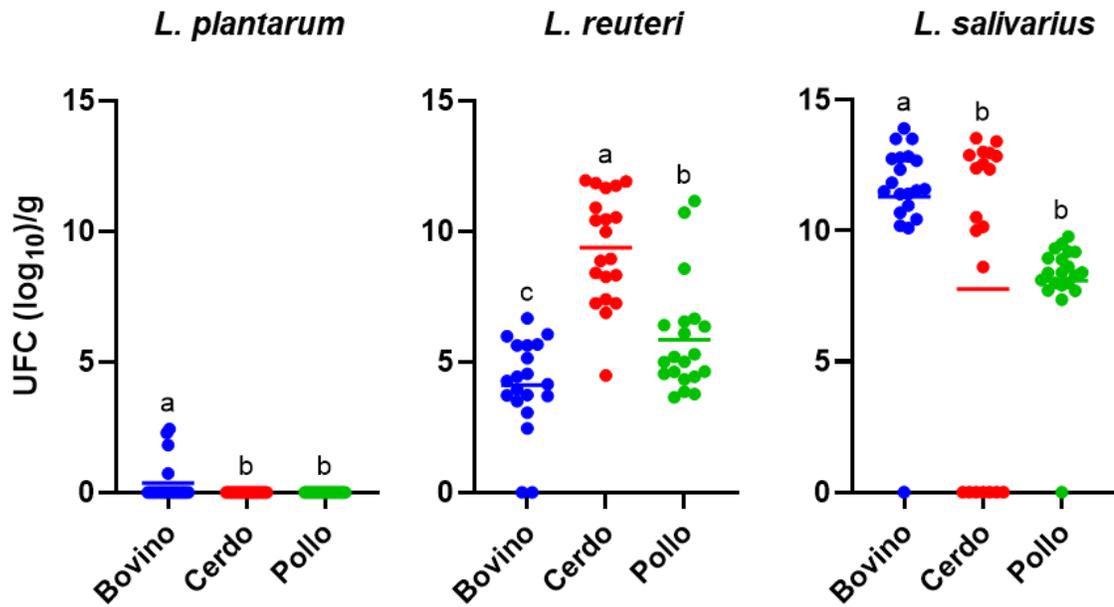


Figura 5. Abundancia relativa de especies de Lactobacilli en muestras de heces de bovino, cerdo y pollo. Cada círculo de color representa una muestra y la barra de color horizontal representa la media (n = 20). Los resultados fueron analizados por las pruebas de ANOVA y Tukey. Grupos con diferente literal representan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$).

Los ensayos de cuantificación de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius* permitirán realizar estudios para determinar los cambios en la abundancia relativa de estos grupos bacterianos; estos ensayos moleculares son una herramienta importante para cuantificar los cambios de especies de Lactobacilli en el intestino e identificar su impacto en la salud y/o productividad de aves y mamíferos.

Densidades comparables de *L. reuteri* en el intestino de cerdo, pollo y humano han sido reportadas anteriormente; por ejemplo, se ha observado de 8 a 10 UFC log₁₀/g en lechones en la etapa de destete (Zhao et al., 2019). En pollos de engorda se reportaron densidades de 4 a 7 UFC log₁₀/g (Nation et al., 2017). En humanos, se han observado de 6 a 7 UFC log₁₀/g en heces de infantes y el aumento en la abundancia de *L. reuteri* está asociada a una reducción de cólicos intestinales (Jomehzadeh et al., 2020). En el caso de *L. salivarius*, se han reportado ~6 UFC

\log_{10}/g en el intestino de pollo de engorda; y un aumento de este grupo bacteriano está asociado a una mayor productividad de estos animales (Harrow et al., 2007). Además, se ha evidenciado que el consumo de probióticos a base de *L. salivarius* aumenta la abundancia de Lactobacilli en el intestino (Sureshkumar et al., 2020). El análisis de la literatura no identificó reportes de *L. plantarum* como miembro de la microbiota intestinal de bovinos, cerdos y pollos. En contraste, varios reportes revelaron que *L. plantarum* es una bacteria prevalente en el intestino de humanos, rata y ratón (Takahashi et al., 2008). En humanos se han estimado de 2 a 6 UFC \log_{10}/g (Jomehzadeh et al., 2020) de *L. plantarum*; en ratas de 2 a 8 UFC \log_{10}/g (B. Wang et al., 2009) y en ratones de 5 a 9 UFC \log_{10}/g (Marco et al., 2007). En cerdos y pollos la suplementación de un probiótico a basa de *L. plantarum* redujo la abundancia relativa de *Clostridium perfringens* y *Enterobacteriaceae*; respectivamente (Zeng et al., 2018).

VII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se desarrolló una estrategia de microbiología molecular para la detección y cuantificación de *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. salivarius*. La implementación de estos ensayos permitirá cuantificar la colonización de probióticos a base de estas tres especies; así como, evaluar los cambios que generan diferentes otros aditivos y nutrientes en la dieta.

En el presente estudio se evidencio que *L. reuteri* y *L. salivarius* son especies de Lactobacilli prevalentes y abundantes en el intestino de bovinos, cerdos y pollos, lo que representa una fuente biológica importante para el aislamiento y selección de aislamiento con potencial probiótico. En contraste, se observó una baja prevalencia y abundancia de *L. plantarum* en el intestino de bovinos, cerdos y pollos; este hallazgo sugiere que el potencial efecto de probióticos a base de *L. plantarum* puede estar asociado a inclusión y colonización de una especie no endémica en tracto gastrointestinal.

En conjunto los resultados del presente trabajo resaltan la importancia del desarrollo e implementación de ensayos moleculares enfocados a la detección y cuantificación de especies de Lactobacilli como una herramienta para evaluar el desarrollo de la microbiota intestinal y su impacto en la salud.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- *ADDAGMA | Home*. (s/f). Recuperado el 25 de septiembre de 2023, de <http://addagma.omicsbio.info/>
- Al Jassim, R. A. M., Scott, P. T., Trebbin, A. L., Trott, D., & Pollitt, C. C. (2005). The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, 248(1), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.023>
- *Amadis—A comprehensive database for association between microbiota and disease*. (s/f). Recuperado el 25 de septiembre de 2023, de <http://gift2disease.net/GIFTED/>
- Anderson, R. C., Cookson, A. L., McNabb, W. C., Park, Z., McCann, M. J., Kelly, W. J., & Roy, N. C. (2010). *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiology*, 10, 316. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-316>
- Barrett, E., Ross, R. P., O'Toole, P. W., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 411–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05344.x>
- Buntin, N., de Vos, W. M., & Hongpattarakere, T. (2017). Variation of mucin adhesion, cell surface characteristics, and molecular mechanisms among *Lactobacillus plantarum* isolated from different habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(20), 7663–7674. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8482-3>
- Chang, J.-H., Shim, Y. Y., Cha, S.-K., Reaney, M. J. T., & Chee, K. M. (2012). Effect of *Lactobacillus acidophilus* KFRI342 on the development of chemically

induced precancerous growths in the rat colon. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt 3), 361–368. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.035154-0>

- Cui, H., Wu, S., & Duan, Z. (s/f). Complete Genome Sequence of *Limosilactobacillus reuteri* Strain VHProbi M07, Isolated from Breast Milk. *Microbiology Resource Announcements*, 11(11), e00764-22. <https://doi.org/10.1128/mra.00764-22>
- Cunningham, M., Azcarate-Peril, M. A., Barnard, A., Benoit, V., Grimaldi, R., Guyonnet, D., Holscher, H. D., Hunter, K., Manurung, S., Obis, D., Petrova, M. I., Steinert, R. E., Swanson, K. S., van Sinderen, D., Vulevic, J., & Gibson, G. R. (2021). Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology*, 29(8), 667–685. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.01.003>
- Das Purkayastha, S., Bhattacharya, M. K., Prasad, H. K., Upadhyaya, H., Lala, S. D., Pal, K., Das, M., Sharma, G. D., & Bhattacharjee, M. J. (2019). Contrasting diversity of vaginal lactobacilli among the females of Northeast India. *BMC Microbiology*, 19, 198. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1568-6>
- De Roos, J., & De Vuyst, L. (2018). Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007>
- Diana, M., Quílez, J., & Rafecas, M. (2014). Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 10, 407–420. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.07.004>
- El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A. O., Dhama, K., & Abdel-Latif, H. M. R. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. *Fish & Shellfish Immunology*, 117, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.07.007>

- Fishbein, S. R. S., Mahmud, B., & Dantas, G. (2023). Antibiotic perturbations to the gut microbiome. *Nature Reviews. Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00933-y>
- Glendinning, L., Watson, K. A., & Watson, M. (2019). Development of the duodenal, ileal, jejunal and caecal microbiota in chickens. *Animal Microbiome*, 1(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0017-z>
- *gutMGene*. (s/f). Recuperado el 25 de septiembre de 2023, de <http://bio-annotation.cn/gutmgene/>
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2015). Lactobacillus. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–76). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00604>
- Han, S., Elnar, A. G., Lim, C., & Kim, G.-B. (2024). Complete genome sequence of bacteriocin-producing *Ligilactobacillus salivarius* B4311 isolated from fecal samples of broiler chicken with anti-listeria activity. *Journal of Animal Science and Technology*, 66(1), 232–236. <https://doi.org/10.5187/jast.2023.e40>
- Harrow, S. A., Ravindran, V., Butler, R. C., Marshall, J. W., & Tannock, G. W. (2007). Real-Time Quantitative PCR Measurement of Ileal *Lactobacillus salivarius* Populations from Broiler Chickens To Determine the Influence of Farming Practices. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7123–7127. <https://doi.org/10.1128/AEM.01289-07>
- Heeney, D. D., Gareau, M. G., & Marco, M. L. (2018). *Lactobacillus* intestinal en la salud y la enfermedad: ¿un impulsor o un simple acompañante? *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.004>

- Hernández-González, J. C., Martínez-Tapia, A., Lazcano-Hernández, G., García-Pérez, B. E., & Castrejón-Jiménez, N. S. (2021). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. *Animals*, 11(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ani11040979>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014a). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014b). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Huang, S., Yu, Q., Xie, L., Ran, L., Wang, K., Yang, Y., Gan, L., & Song, Z. (2021). Inhibitory effects of *Lactobacillus plantarum* metabolites on porcine epidemic diarrhea virus replication. *Research in Veterinary Science*, 139, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.002>
- Huang, Y., Ferrari, M. W., Lin, S., & Wang, Z. (2024). Recent advances on the Role of Gut Microbiota in the Development of Heart Failure by Mediating Immune Metabolism. *Current Problems in Cardiology*, 49(3), 102128. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2023.102128>

- Huynh, U., & Zastrow, M. L. (2023). Metallobiology of Lactobacillaceae in the gut microbiome. *Journal of inorganic biochemistry*, 238, 112023. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112023>
- Johnston, B. C., Goldenberg, J. Z., Vandvik, P. O., Sun, X., & Guyatt, G. H. (2011). Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, CD004827. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004827.pub3>
- Jomehzadeh, N., Javaherizadeh, H., Amin, M., Rashno, M., & Teimoori, A. (2020). Quantification of Intestinal Lactobacillus Species in Children with Functional Constipation by Quantitative Real-Time PCR. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 13(null), 141–150. <https://doi.org/10.2147/CEG.S250755>
- Kayal, A., Stanley, D., Radovanovic, A., Horyanto, D., Van, T. T. H., & Bajagai, Y. S. (2022). Controlled Intestinal Microbiota Colonisation in Broilers under the Industrial Production System. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 12(23), 3296. <https://doi.org/10.3390/ani12233296>
- Kim, E., Yang, S.-M., Lim, B., Park, S. H., Rackerby, B., & Kim, H.-Y. (2020). Design of PCR assays to specifically detect and identify 37 Lactobacillus species in a single 96 well plate. *BMC Microbiology*, 20(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01781-z>
- Kopp-Hoolihan, L. (2001). Prophylactic and Therapeutic Uses of Probiotics: A review. *Journal of the American Dietetic Association*, 101(2), 229–241. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(01\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(01)00060-8)
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.

Molecular Biology and Evolution, 35(6), 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Li, L., Jing, Q., Yan, S., Liu, X., Sun, Y., Zhu, D., Wang, D., Hao, C., & Xue, D. (2021). Amadis: A Comprehensive Database for Association Between Microbiota and Disease. *Frontiers in Physiology*, 12, 697059. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.697059>
- Li, L., Yin, F., Wang, X., Yang, C., Yu, H., Lepp, D., Wang, Q., Lessard, M., Lo Verso, L., Mondor, M., Yang, C., Nie, S., & Gong, J. (2023). Microencapsulation protected *Lactobacillus* viability and its activity in modulating the intestinal microbiota in newly weaned piglets. *Journal of Animal Science*, 101, skad193. <https://doi.org/10.1093/jas/skad193>
- Liu, Y., Tian, X., He, B., Hoang, T. K., Taylor, C. M., Blanchard, E., Freeborn, J., Park, S., Luo, M., Couturier, J., Tran, D. Q., Roos, S., Wu, G., & Rhoads, J. M. (2019). *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 feeding of healthy newborn mice regulates immune responses while modulating gut microbiota and boosting beneficial metabolites. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 317(6), G824–G838. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00107.2019>
- Liu, Y.-W., Liong, M.-T., & Tsai, Y.-C. (2018). New perspectives of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic: The gut-heart-brain axis. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 56(9), 601–613. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8079-2>
- Luo, Z., Chen, A., Xie, A., Liu, X., Jiang, S., & Yu, R. (2023). *Limosilactobacillus reuteri* in immunomodulation: Molecular mechanisms and potential applications. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1228754>

- Lv, W., Zhang, D., He, T., Liu, Y., Shao, L., Lv, Z., Pu, X., Wang, Y., & Liu, L. (2023). Combination of *Lactobacillus plantarum* improves the effects of tacrolimus on colitis in a mouse model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1130820. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1130820>
- Marco, M. L., Bongers, R. S., de Vos, W. M., & Kleerebezem, M. (2007). Spatial and Temporal Expression of *Lactobacillus plantarum* Genes in the Gastrointestinal Tracts of Mice. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(1), 124–132. <https://doi.org/10.1128/AEM.01475-06>
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*(3), 196–208. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>
- Matos, R. C., & Leulier, F. (2014). Lactobacilli-Host mutualism: “learning on the fly”. *Microbial Cell Factories*, *13 Suppl 1*(Suppl 1), S6. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S6>
- Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., & Göker, M. (2022). TYGS and LPSN: A database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D801–D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab902>
- *Microbiome Atlas*. (s/f). Recuperado el 25 de septiembre de 2023, de <https://www.microbiomeatlas.org/>
- *MicrobiomeDB*. (s/f). Recuperado el 25 de septiembre de 2023, de <https://microbiomedb.org/mbio/app>

- Nam, T. V. B., Anh, L. H., Loc, H. T., Trang, C. T. H., Thiet, N., Lan, L. T. T., Diep, T. H., Xuan, N. H., & Ngu, N. T. (2022). Effects of probiotic (*Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis*) supplementation on mortality, growth performance, and carcass characteristics of native Vietnamese broilers challenged with *Salmonella Typhimurium*. *Veterinary World*, *15*(9), 2302. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2302-2308>
- Nation, M. L., Dunne, E. M., Joseph, S. J., Mensah, F. K., Sung, V., Satzke, C., & Tang, M. L. K. (2017). Impact of *Lactobacillus reuteri* colonization on gut microbiota, inflammation, and crying time in infant colic. *Scientific Reports*, *7*(1), 15047. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15404-7>
- O’Callaghan, J., & O’Toole, P. W. (2013). *Lactobacillus*: Host-microbe relationships. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *358*, 119–154. https://doi.org/10.1007/82_2011_187
- Oliveira, F. S., Brestelli, J., Cade, S., Zheng, J., Iodice, J., Fischer, S., Aurrecochea, C., Kissinger, J. C., Brunk, B. P., Stoeckert, C. J., Fernandes, G. R., Roos, D. S., & Beiting, D. P. (2018). MicrobiomeDB: A systems biology platform for integrating, mining and analyzing microbiome experiments. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D684–D691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1027>
- Palomino, M. M., Allievi, M. C., Gordillo, T. B., Bockor, S. S., Fina Martin, J., & Ruzal, S. M. (2023). Surface layer proteins in species of the family Lactobacillaceae. *Microbial Biotechnology*, *16*(6), 1232. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14230>
- Peng, Y., Ma, Y., Luo, Z., Jiang, Y., Xu, Z., & Yu, R. (2023). *Lactobacillus reuteri* in digestive system diseases: Focus on clinical trials and mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1254198>

- Qi, C., Cai, Y., Qian, K., Li, X., Ren, J., Wang, P., Fu, T., Zhao, T., Cheng, L., Shi, L., & Zhang, X. (2023). gutMDisorder v2.0: A comprehensive database for dysbiosis of gut microbiota in phenotypes and interventions. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D717–D722. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac871>
- Rao, N. S., Lundberg, L., Palmkron, S., Håkansson, S., Bergenståhl, B., & Carlquist, M. (2021). Flow cytometric analysis reveals culture condition dependent variations in phenotypic heterogeneity of *Limosilactobacillus reuteri*. *Scientific Reports*, 11(1), 23567. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02919-3>
- *Resumen de especies | Atlas del microbioma.* (s/f). Recuperado el 26 de mayo de 2023, de https://www.microbiomeatlas.org/species_summary.php
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Scillato, M., Spitale, A., Mongelli, G., Privitera, G. F., Mangano, K., Cianci, A., Stefani, S., & Santagati, M. (2021). Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *MicrobiologyOpen*, 10(2), e1173. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1173>
- Segers, M., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial cell factories*, 13 Suppl 1, S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
- Singh, K. S., Choudhary, R., Bisht, S., Grover, S., Kumar, S., Mohanty, A. K., & Kaushik, J. K. (2017). Expression of recombinant truncated domains of mucus-binding (Mub) protein of *Lactobacillus plantarum* in soluble and

biologically active form. *Protein Expression and Purification*, 135, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.04.015>

- Son, S. J., Han, A.-R., Sung, M. J., Hong, S. M., & Lee, S.-H. (2023). *Hermetia illucens* Fermented with *Lactobacillus plantarum* KCCM12757P Alleviates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(10), 1822. <https://doi.org/10.3390/antiox12101822>
- Subramaniyan, V., & Gurusamy, K. (2019). Diversity of probiotic adhesion genes in the gastrointestinal tract of goats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(8), 12422–12428. <https://doi.org/10.1002/jcb.28508>
- Sureshkumar, S., Jung, S. K., Kim, D., Oh, K. B., Yang, H., Lee, H. C., Jo, Y. J., Lee, H. S., Lee, S., & Byun, S. J. (2020). Administration of *L. salivarius* expressing 3D8 scFv as a feed additive improved the growth performance, immune homeostasis, and gut microbiota of chickens. *Animal Science Journal*, 91(1), e13399. <https://doi.org/10.1111/asj.13399>
- Takahashi, S., Yoshida, Y., Nakanishi, N., Tsukahara, T., & Ushida, K. (2008). Quantitative real-time PCR monitoring of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* with oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq80 to weaning piglets. *Animal Science Journal*, 79(6), 737–744. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2008.00588.x>
- Tegegne, B. A., & Kebede, B. (2022). Probiotics, their prophylactic and therapeutic applications in human health development: A review of the literature. *Heliyon*, 8(6), e09725. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09725>
- Tolosi, R., Carraro, L., Laconi, A., & Piccirillo, A. (2021). Optimization of five qPCR protocols toward the detection and the quantification of antimicrobial

resistance genes in environmental samples. *MethodsX*, 8, 101488. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101488>

- Wang, B., Li, J., Li, Q., Zhang, H., & Li, N. (2009). Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization and immune response by *Lactobacillus plantarum* L2 in the rat gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 132(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.016>
- Wang, C.-H., Yen, H.-R., Lu, W.-L., Ho, H.-H., Lin, W.-Y., Kuo, Y.-W., Huang, Y.-Y., Tsai, S.-Y., & Lin, H.-C. (2022). Adjuvant Probiotics of *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salicinius* AP-32, *L. johnsonii* MH-68, and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* CP-9 Attenuate Glycemic Levels and Inflammatory Cytokines in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 754401. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.754401>
- Wang, L., Yang, Y., Cai, B., Cao, P., Yang, M., & Chen, Y. (2014). Coexpression and Secretion of Endoglucanase and Phytase Genes in *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12842–12860. <https://doi.org/10.3390/ijms150712842>
- Wang, L., Zhou, B., Zhou, X., Wang, Y., Wang, H., Jia, S., Zhang, Z., Chu, C., & Mu, J. (2019). Combined Lowering Effects of Rosuvastatin and *L. acidophilus* on Cholesterol Levels in Rat. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(3), 473–481. <https://doi.org/10.4014/jmb.1806.06004>
- Wang, P., Zhang, S., He, G., Du, M., Qi, C., Liu, R., Zhang, S., Cheng, L., Shi, L., & Zhang, X. (2023). microbioTA: An atlas of the microbiome in multiple disease tissues of *Homo sapiens* and *Mus musculus*. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D1345–D1352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac851>

- Wang, Y., Xu, X., Chen, H., Yang, F., Xu, B., Wang, K., Liu, Q., Liang, G., Zhang, R., Jiao, X., & Zhang, Y. (2023). Assessment of beneficial effects and identification of host adaptation-associated genes of *Ligilactobacillus salivarius* isolated from badgers. *BMC Genomics*, *24*, 530. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09623-8>
- Wilkins, T., & Sequoia, J. (2017). Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *American Family Physician*, *96*(3), 170–178.
- Wu, Y., Zhu, C., Chen, Z., Chen, Z., Zhang, W., Ma, X., Wang, L., Yang, X., & Jiang, Z. (2016). Protective effects of *Lactobacillus plantarum* on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in intestinal porcine epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *172*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.03.005>
- Xu, C., Wei, F., Yang, X., Feng, Y., Liu, D., & Hu, Y. (2022). *Lactobacillus salivarius* CML352 Isolated from Chinese Local Breed Chicken Modulates the Gut Microbiota and Improves Intestinal Health and Egg Quality in Late-Phase Laying Hens. *Microorganisms*, *10*(4), 726. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040726>
- Xu, Y., Lei, B., Zhang, Q., Lei, Y., Li, C., Li, X., Yao, R., Hu, R., Liu, K., Wang, Y., Cui, Y., Wang, L., Dai, J., Li, L., Ni, W., Zhou, P., Liu, Z.-X., & Hu, S. (2022). ADDAGMA: A database for domestic animal gut microbiome atlas. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *20*, 891–898. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.02.003>
- Yadav, M. K., Yadav, P., Dhiman, M., Tewari, S., & Tiwari, S. K. (2022). Plantaricin LD1 purified from *Lactobacillus plantarum* LD1 inhibits biofilm formation of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in tooth model. *Letters in Applied Microbiology*, *75*(3), 623–631. <https://doi.org/10.1111/lam.13668>

- Yu, Z., Chen, J., Liu, Y., Meng, Q., Liu, H., Yao, Q., Song, W., Ren, X., & Chen, X. (2023a). The role of potential probiotic strains *Lactobacillus reuteri* in various intestinal diseases: New roles for an old player. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1095555>
- Yu, Z., Chen, J., Liu, Y., Meng, Q., Liu, H., Yao, Q., Song, W., Ren, X., & Chen, X. (2023b). The role of potential probiotic strains *Lactobacillus reuteri* in various intestinal diseases: New roles for an old player. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1095555>
- Zeng, Y., Zeng, D., Zhang, Y., Ni, X. Q., Wang, J., Jian, P., Zhou, Y., Li, Y., Yin, Z. Q., Pan, K. C., & Jing, B. (2018). *Lactobacillus plantarum* BS22 promotes gut microbial homeostasis in broiler chickens exposed to aflatoxin B1. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *102*(1), e449–e459. <https://doi.org/10.1111/jpn.12766>
- Zhang, L., García-Cano, I., & Jiménez-Flores, R. (2020). Characterization of adhesion between *Limosilactobacillus reuteri* and milk phospholipids by density gradient and gene expression. *JDS Communications*, *1*(2), 29–35. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2020-18939>
- Zhang, Q., Zhao, Q., Li, T., Lu, L., Wang, F., Zhang, H., Liu, Z., Ma, H., Zhu, Q., Wang, J., Zhang, X., Pei, Y., Liu, Q., Xu, Y., Qie, J., Luan, X., Hu, Z., & Liu, X. (2023). *Lactobacillus plantarum*-derived indole-3-lactic acid ameliorates colorectal tumorigenesis via epigenetic regulation of CD8+ T cell immunity. *Cell Metabolism*, *35*(6), 943-960.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.04.015>
- Zhao, X., Wang, W., Blaine, A., Kane, S. T., Zijlstra, R. T., & Gänzle, M. G. (2019). Impact of probiotic *Lactobacillus* sp. On autochthonous lactobacilli in weaned piglets. *Journal of Applied Microbiology*, *126*(1), 242–254. <https://doi.org/10.1111/jam.14119>

- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020a). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020b). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>