

Diss. ETH Nr. 16976

**Study of the effects of *Lactobacillus reuteri* and reuterin on
the human intestinal microbiota using *in vitro* models**

A dissertation submitted to

**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
(ETHZ)**

For the degree of
Doctor of Science

Presented by

VALENTINE CLEUSIX

Dipl. Lm.-Ing. ETH

Born August 20, 1977

Citizen of Sion, VS

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner
Prof. Dr. Michael Blaut, co-examiner
Dr. Gwenaelle Le Blay, co-examiner

Zurich, 2006

SUMMARY

The gastrointestinal tract is inhabited by a complex microbial ecosystem playing an important role in metabolic and immunological processes and therefore contributing to the well-being of the host (Falk *et al.*, 1998). *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 is a heterofermentative lactic acid bacterium which naturally inhabits the gastrointestinal tract of humans and animals. *Lb. reuteri* is known to secrete reuterin, a broad-spectrum antimicrobial agent, in the presence of glycerol and in conditions compatible with the colonic environment. Reuterin has been shown *in vitro* to inhibit growth of different pathogens (e.g. *Listeria monocytogenes* or *Escherichia coli* O157:H7) and spoilage microorganisms, as well as moulds, yeasts and protozoa (El-Ziney and Debevere, 1998). *Lb. reuteri* has been used for over ten years as probiotic and/or starter culture in foods and health care products but its mechanisms of action within the human gastrointestinal tract and the potential implication of reuterin are not known. Due to ethical and accessibility problems, *in vivo* studies of the intestinal microbiota in humans are difficult to conduct. Therefore, several *in vitro* models simulating the condition of the intestine have been proposed

The aim of this study was first to test the *in vitro* activity of reuterin against a representative panel of human intestinal bacteria and to determine whether the intracellular glutathione (GSH) concentration contributes to cell protection for the antimicrobial effects of reuterin, since reuterin shows a high reactivity towards reduced GSH. Except for the *Lactobacillus* strains, which were more resistant, all bacteria were inhibited by reuterin at concentrations less than 15 mmol/L under the tested conditions. *Listeria* species such as *Listeria innocua* and *Listeria ivanovii* were less sensitive to reuterin than the main intestinal commensal bacteria and bifidobacteria. No correlation between intracellular GSH concentration and susceptibility of bacteria to reuterin was observed.

The *in vitro* test does not closely model the conditions of the gastrointestinal tract or account for the complexity of the human intestinal microbiota. Therefore, in a second step, we tested the effects of adding pure reuterin and *Lb. reuteri*, in the presence or absence of glycerol (10 and 100 mmol/L), on adult colonic microbiota, and the capacity of *Lb. reuteri* to synthesize reuterin from glycerol under the tested condition using a novel *in vitro*

fermentation model with immobilized faecal microbiota simulating the proximal colon. We observed a specific decrease in *E. coli* population during the simultaneous addition of *Lb. reuteri* and glycerol as well as for glycerol alone, with no or very few effects on commensal gut bacteria. A similar decrease was measured during addition of a small concentration of pure reuterin (1.3 mmol/L). Moreover, we detected the accumulation of 1,3-propanediol, a typical product from glycerol fermentation, during the addition of a high concentration of glycerol (100 mmol/L). Our data suggest that the decrease in *E. coli* population was due to *in situ* reuterin production during the addition of glycerol at both lower and higher concentration. The *in vitro* colonic fermentation model with immobilized adult faecal microbiota showed a high stability throughout the 62-day fermentations and has promising potential for studying parameters of the complex colonic ecosystem.

In the last part, three quantitative, culture-independent, molecular biological methods (fluorescent *in situ* hybridization (FISH) combined with microscopy or flow cytometry and quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)) were compared for the analysis of bifidobacteria in faecal samples. The bifidobacterial *xfp* gene encoding the d-fructose 6-phosphate phosphoketolase was used to develop the qPCR assay. This gene was already shown to be present with a single copy in the bifidobacterial genome. In general, a good correlation was found between data of hybridization methods and qPCR. The counts of bifidobacteria obtained with qPCR were in general higher than those obtained with FISH-based methods. For total bacteria, lower cell counts were obtained with the flow cytometry analysis and qPCR assay than for FISH measured with microscopy. All three methods showed high reproducibilities with low coefficients of variation between assays. The assay developed in this study for enumerating *Bifidobacterium* spp. in faecal samples by qPCR is sensitive, rapid and accurate.

RÉSUMÉ

Le tractus intestinal est colonisé par un écosystème microbien complexe contribuant de manière essentielle aux divers procédés métaboliques et immunologiques impliqués dans le maintien du bien-être de l'hôte. *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 est une bactérie lactique hétérofermentative autochtone du tractus intestinal humain et animal. Dans un environnement similaire au colon, et en présence de glycérol, *Lb. reuteri* secrète de la reutérine, une substance antimicrobienne à large spectre. D'après des études *in vitro*, la reutérine démontre une activité inhibitrice à l'encontre de différents microorganismes tels que certains pathogènes (par exemple *Listeria monocytogenes* ou *Escherichia coli* O157:H7) ainsi que des moisissures, des levures et des protozoaires. *Lb. reuteri* est utilisée depuis plus de 10 ans comme probiotique et/ou en tant que culture de départ dans différents aliments. Cependant, son mécanisme d'action dans le tractus intestinal humain ainsi que l'implication potentielle de la reutérine ne sont pas connus. Pour des raisons d'éthique et d'accessibilité, les études *in vivo* du microbiote intestinal chez l'homme sont difficiles à réaliser. Ainsi, différents modèles *in vitro* simulant les conditions intestinales ont été proposés.

Le but de cette étude était premièrement de tester l'activité de la reutérine *in vitro* sur un panel de bactéries intestinales et d'observer si la concentration intracellulaire en glutathione (GSH) de ces bactéries contribuait à leur mécanisme de défense contre la reutérine. À l'exception des lactobacilles qui se sont montrés plus résistants, toutes les bactéries testées étaient inhibées dans leur croissance par une concentration de reutérine inférieure à 15 mmol/L. Deux souches de listeria (*Listeria innocua* et *Listeria ivanovii*) se sont montrées moins sensibles à la reutérine que les bactéries commensales (notamment les bifidobactéries). Aucune corrélation entre la concentration cellulaire en GSH et la sensibilité à la reutérine n'a pu être établie lors de cette étude.

Les expérimentations *in vitro* sur cultures pures ne modélisent pas précisément les conditions du tractus intestinal ni ne prennent en compte la complexité du microbiote intestinal humain. C'est pourquoi, dans une deuxième étape, nous avons utilisé un nouveau modèle de fermentation colique avec cellules immobilisées simulant le colon proximal afin de tester les effets de l'addition de reutérine pure et de *Lb. reuteri* en présence ou absence de glycérol (10 et 100 mmol/L) sur un microbiote colonique d'adulte ainsi que la capacité de *Lb.*

reuteri à sécréter de la reutéline à partir de glycérol. Nous avons pu observer une diminution spécifique de la population de *E. coli* durant l'addition simultanée de *Lb. reuteri* et de glycérol, mais aussi lors de l'addition de glycérol en absence de *Lb. reuteri*, avec très peu d'effets sur les bactéries intestinales commensales. Une baisse similaire a pu être notée durant l'addition dans le système d'une faible concentration de reutéline pure (1.3 mmol/L). De plus, une accumulation de 1,3-propanediol, un produit typique de la fermentation du glycérol, a été mesurée durant l'addition d'une concentration élevée de glycérol (100 mmol/L). Nos données suggèrent que la diminution du nombre de *E. coli* était due à une production *in situ* de reutéline lors de l'addition de glycérol. Ce nouveau modèle de fermentation colique avec immobilisation d'une flore fécale d'adulte a démontré une grande stabilité durant les 62 jours de fermentation et possède un fort potentiel pour l'étude des paramètres de l'écosystème complexe du côlon humain.

Dans la dernière partie, trois méthodes moléculaires quantitatives (hybridation fluorescente *in situ* (FISH) combinée avec la microscopie ou la cytométrie de flux et la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR)) ont été comparées pour l'analyse des bifidobactéries dans différents échantillons fécaux. L'essai de qPCR développée ici se base sur le gène *xfp*, spécifique aux bifidobactéries et codant pour la d-fructose 6-phosphate phosphoketolase. Jusqu'à ce jour, ce gène n'a été trouvé qu'en un seul exemplaire dans le génome des bifidobactéries. En général, une bonne corrélation a été trouvée entre les données obtenues par les méthodes d'hybridations et la qPCR. Les comptes de bifidobactéries obtenus avec la qPCR étaient en général plus élevés que ceux obtenus avec les méthodes d'hybridation. Pour les bactéries totales, les analyses de cytométrie de flux et de qPCR ont fourni des comptes plus bas que ceux obtenus avec les analyses microscopiques. Chacune des trois méthodes a montré une grande reproductibilité avec de faibles coefficients de variation entre les analyses. La méthode de qPCR développée dans cette étude pour l'énumération des *Bifidobacterium* dans les échantillons fécaux est sensible, rapide et précise.