



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS DE LICENCIATURA

**Efecto de *L. acidophilus* NCFM, *B. animalis* subsp. *lactis*
Bi-07 y fructanos de agave en un biogel simbiótico sobre
la biota intestinal humana**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
Erick Díaz Vázquez**



México DF

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado:

Presidente: María del Carmen Wachter Rodarte.

Vocal: Martha Giles Gómez.

Secretario: Fernando Jesús Tuz Dzib.

1er Suplente: Beatriz Ruiz Villafán.

2do Suplente: Norma Angélica Camacho de la Rosa.

Sitio donde se desarrollo el tema:

**Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Salvador
Zubirán (INNCMSZ).**

Asesor del Tema:

Fernando Jesús Tuz Dzib.

Sustentante:

Erick Díaz Vázquez

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción	4
1. Microbiota Intestinal	4
2. Taxonomía bacteriana	5
2.1 <i>Actinobacteria</i>	5
2.2 <i>Firmicutes</i>	6
2.3 <i>Proteobacteria</i>	6
2.4 <i>Bacteroidetes</i>	7
2.5 Estudios taxonómicos del tracto GI	7
3. Género <i>Bifidobacterium</i>	8
3.1 Historia y clasificación del género	8
3.2 Metabolismo	10
3.3 Aspectos fisiológicos	10
4. Género <i>Lactobacillus</i>	11
4.1 Historia y clasificación del género	11
4.2 Metabolismo	13
4.3 Aspectos fisiológicos	14
5. Probióticos, prebióticos y simbióticos	14
5.1 Probióticos	14
5.1.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	16
5.1.2 <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bi-07	18

5.2	Prebióticos	19
5.3	Simbióticos	21
6.	Fructanos	21
6.1	Estructura química	21
6.2	Fructanos de agave	23
6.3	Fructanos de agave como prebióticos	24
Antecedentes del estudio		26
Objetivos de la Tesis		28
Parte Experimental		29
1.	Recuperación de microorganismos	29
2.	Formación de un nuevo cepario	31
3.	Extracción de ADN	32
4.	PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	34
5.	Electroforesis	36
6.	Purificación	36
7.	Secuenciación	40
Resultados		44
Discusión de Resultados		49
Conclusiones		51
Referencias		52
Anexo A		60
Anexo B		65

Agradecimientos

En primer lugar, a Dios por brindarme la fortaleza, sabiduría, templanza y paciencia a lo largo de mi vida.

A mis padres, Eve y Enrique los cuales han sido y seguirán siendo un modelo de conducta congruente.

A mis hermanos Lili, Kike, Alan y Chucho por los consejos y momentos compartidos.

A los profesores que se convirtieron en amigos en el interminable proceso de enseñanza mutua.

Finalmente a mis amigos, en especial Adriana, Luisa, Arturo y Nacho por su compañía y cariño incondicional

Conócete, acéptate, superate.
Santo Tomás de Aquino

He cometido el peor de los pecados, quise ser feliz.
Santa Teresa de Jesús

ABREVIATURAS

BAL	(Bacterias Acido Lácticas)
BHI	(Infusión Cerebro-Corazón)
bp	(pares de bases)
DP	(Agar Dicloxacilina-Acido Propiónico)
FA	(Fructanos de agave)
FAO	(Food and Agriculture Organization of the United Nations)
FOS	(Fructooligosacáridos)
GI	(Gastrointestinal)
GP	(Grado de Polimerización)
IgA	(Inmunoglobulina A)
MC	(Agar Mac Conkey)
MRS	(Agar de Man-Rogose-Sharp)
OMS	(Organización Mundial de la Salud)
PBG	(Solución amortiguadora de fosfatos con glicerol)
PCR	(Reacción en Cadena de la Polimerasa)
TBE	(Solución amortiguadora Tris borato etilendiamina)
UFC	(Unidades Formadoras de Colonias)
XOS	(Xilooligosacáridos)

RESUMEN

Efecto de *L. acidophilus* NCFM, *B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 y fructanos de agave en un biogel simbiótico sobre la biota humana.

La composición en heces humanas de bifidobacterias y lactobacilos, enfocándonos en *L. acidophilus* NCFM y *B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 de 11 pacientes sanos fue recuperada, aislada e identificada, basándose en el monitoreo a lo largo de seis semanas de un estudio para evaluar el efecto de un gel biodigestivo Ventro® como parte de un protocolo *in vivo* sobre la repoblación intestinal de pacientes voluntarios sanos bajo un esquema antimicrobiano. Dentro de los 11 pacientes analizados 5 fueron el grupo placebo (no consumo de gel biodigestivo).

El presente estudio tiene como objetivo, evaluar el efecto de un biogel simbiótico (conteniendo *L. acidophilus* NCFM, *B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 y fructanos de agave) al ser ingerido después de un desequilibrio en la microbiota intestinal humana a través de la recuperación, aislamiento e identificación de cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* analizando la biodiversidad resultante tomando como referencia al microorganismo dominante.

Las muestras frescas de materia fecal fueron colectadas, procesadas y cultivadas en medios selectivos MRS y DP para enumeración de Bifidobacterias y Lactobacilos. Las morfologías de interés fueron purificadas para amplificación por PCR de un fragmento de 396 bp del gen 16s ARNr y posterior secuenciación.

Se logró la recuperación de los microorganismos deseados y en al menos el 30% de los pacientes sometidos a la ingesta del biogel, la detección de *L. acidophilus* y *B. animalis* subsp. *lactis*.

L. acidophilus y *B. animalis* subsp. *lactis* pueden sobrevivir el paso del tracto gastrointestinal y colonizar transitoriamente el intestino.

El presente estudio sugiere que el consumo regular de un alimento simbiótico conteniendo *L. acidophilus* NCFM, *B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 y fructanos de agave ayuda a la repoblación de la microbiota intestinal tras un protocolo de ingestión de antibióticos promoviendo un efecto bifidogénico.

INTRODUCCION

1. Microbiota intestinal

El intestino humano es uno de los ecosistemas mas densamente poblados en la naturaleza, el número de microorganismos dentro del colon de un individuo adulto consta de 10^{12} a 10^{14} células procarióticas individuales pertenecientes a un estimado de 150 a 800 especies, calculando un peso de 100-200 gramos en total (Jones, 2010; Backhed *et al.*, 2005).

La interacción de éstos microorganismos con el tejido del tracto GI humano permite el desarrollo de una relación simbiótica equilibrada reflejándose fundamentalmente en la salud del huésped a través de la regulación del sistema inmune, contribuyendo en el crecimiento de las vellosidades capilares propias del intestino, produciendo micronutrientes, metabolitos e imponiendo una resistencia contra patógenos. (Backhed *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2009).

La identificación y caracterización de los diversos microorganismos que componen la microbiota intestinal humana ha sido ampliamente analizada señalando dos grandes grupos: bacterias autóctonas conocidas como residentes habituales del intestino y bacterias alóctonas, representantes transitorios en el tracto GI (Nava y Stappenbec, 2011).

Dentro de la compleja población bacteriana del intestino; *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* son los phyla comúnmente hallados en el tracto GI humano. (Barrangou *et al.*, 2009).

2. Taxonomía Bacteriana

La taxonomía bacteriana se ha basado en las características fenotípicas y genotípicas de los organismos para su clasificación, y ha sido una herramienta útil para la identificación práctica de microorganismos desconocidos. Tomando en cuenta la diversidad genética encontrada en los diferentes grupos de microorganismos y de como surgió dicha diversidad, es un hecho mencionar que muy pocos lugares, si no es que ningún lugar de la tierra no esté colonizado por bacterias. Por lo tanto, las interacciones entre la variabilidad genética y la selección natural han producido una diversidad de microorganismos que se han desarrollado a lo largo de la historia del planeta Tierra (Madigan *et al.*, 2003).

2.1 *Actinobacteria*

El phylum *Actinobacteria* posee alrededor de 15 familias de bacterias, destacando los siguientes géneros: *Actinobaculum*, *Bifidobacterium*, *Scardovia*, *Propionibacterium*, *Mobiluncus* y *Actinomyces*. Son microorganismos Gram-positivos con un alto contenido de G+C en su ADN, capaces de producir ácidos orgánicos de cadena corta (ácido succínico, propiónico y acético) como producto final del metabolismo de glucosa (Ventura *et al.*, 2007). Algunos de estos microorganismos son frecuentemente utilizados en la industria alimenticia, como el caso de *Propionibacterium* spp. empleados en la fabricación de quesos madurados (Ouwehand, 2003) así como *Bifidobacterium* spp., microorganismos ampliamente incorporados como probióticos en productos lácteos.

2.2 *Firmicutes*.

Firmicutes como phylum es considerablemente mayor que *Actinobacteria* comprendiendo microorganismos Gram-positivos con bajo contenido de G+C en su ADN.

El phylum se encuentra dividido en 3 clases o "clusters": *Bacilli* (no formadores de esporas Gram positivos aerobios o anaerobios facultativos), *Clostridia* (formadores de esporas, anaerobios estrictos) y *Mollicutes* (carentes de pared celular). Cada clase esta conformada por numerosas familias, dentro de las cuales los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*, *Eubacteria*, *Mycoplasma*, *Dorea*, *Listeria* y *Clostridium* son los más representativos (Felis y Dellaglio, 2007; Murray, 2007).

Dentro de la clase *Bacilli* están contenidas las bacterias Gram positivas no formadoras de esporas destacando los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*, conocidas como BAL por ser productores de ácido láctico como producto final del metabolismo de carbohidratos (Axelsson, 2003; Mayo *et al.*, 2008).

2.3 *Proteobacteria*.

Proteobacteria es un phylum bastante mayor que *Actinobacteria* y *Firmicutes* comprendiendo bacterias Gram-negativas en su mayoría aerobias las cuales poseen múltiples morfologías que van desde los bacilos hasta cocos simples. Se agrupan en 5 clases diferentes siguiendo las letras del alfabeto griego alfa, beta, gamma, delta y épsilon (Lighthfield *et al.*, 2011).

2.4 *Bacteroidetes*.

Por último, el phylum *Bacteroidetes* se divide en tres clases: *Bacteroidia*, *Flavobacteria* y *Sphingobacteria*. El genero *Bacteroides* es representativo de la biota intestinal humana correspondiendo a bacterias Gram-negativas anaerobias no formadoras de esporas (Claesson *et al.*, 2009).

2.5 Estudios taxonómicos del tracto GI.

Los análisis metagenómicos poblacionales de microorganismos en los diversos ambientes, en específico, el tracto GI de mamíferos acentúan la basta presencia de *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* como los phyla mayormente encontrados como habitantes del tracto GI. (Ley *et al.*, 2008; Claesson *et al.*, 2009).

Los estudios metagenómicos ofrecen metodologías para un mayor conocimiento de la biodiversidad bacteriana reflejándose en la importancia del intestino humano, diversos esfuerzos se han conjuntado para que éstos estudios del tracto GI de mamíferos adquieran una notable relevancia en el tracto digestivo humano. Gracias al desarrollo de estas técnicas se han podido describir un sinnúmero de organismos, incluyendo especies nuevas o microorganismos no cultivables aún en el laboratorio (Vaughan *et al.*, 2009).

Entre los miembros de la amplia, diversa y dinámica comunidad microbiana residente del colon humano, *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. son algunos de los géneros habitualmente encontrados en el ecosistema intestinal, ampliamente estudiados y

considerados benéficos para la salud humana (Barrangou *et al.*, 2009).

3. Género *Bifidobacterium*

3.1 Historia y clasificación del género

Las bifidobacterias, fueron primeramente aisladas de heces de un lactante por Tissier en 1899, nombrada entonces como *Bacillus bifidus* (Tissier, 1900). Sin embargo, durante gran parte del siglo XX por las características morfológicas y fisiológicas que poseían fueron clasificadas dentro del género *Lactobacillus*; fue hasta 1924 que fueron reorganizadas como un género diferente por Orla-Jensen (Turroni, 2008). Actualmente, el género *Bifidobacterium* está compuesto por alrededor de 37 especies (Fig. 1).

Para corroborar la clasificación de especies dentro del género *Bifidobacterium*, la correlación filogenética entre las bifidobacterias ha sido confirmada a través de arreglos multilocus (Ventura *et al.*, 2007), generando una imagen evolutiva más robusta en comparación con métodos basados en arboles de genes simples (e.g., gen 16S ARNr).

Como miembros del phylum Actinobacteria, *Bifidobacterium* y los géneros cercanamente relacionados *Scardovia* y *Parascardovia*, comprenden microorganismos con características pleomórficas, anaerobios, no esporulados, no productores de gas, inmóviles y de Gram variable comúnmente hallados en el tracto GI (Felis, 2007).

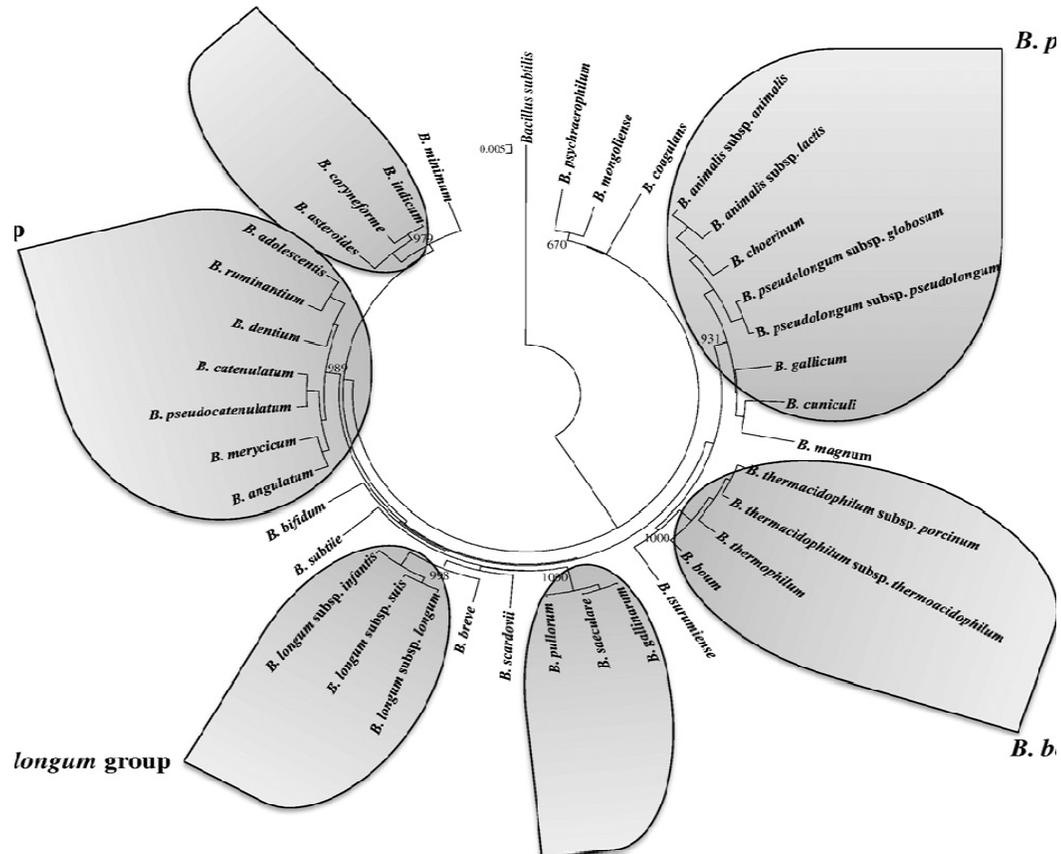


Fig. 1. Árbol filogenético de los miembros del género *Bifidobacterium* basado en una comparación de análisis de secuencias de los 1500 nucleótidos del gen 16S-rARN. Las diferentes clases filogenéticas se encuentran resaltadas. (Tomado de Turroni *et al.*, 2010).

Las bifidobacterias pueden ser encontradas en distintos nichos ecológicos. Estos ambientes están representados por el intestino de los animales (humanos, vacas, conejos, aves e incluso insectos), cavidad oral, aguas residuales y alimentos. (Ventura *et al.*, 2007)

Los miembros del género *Bifidobacterium* son predominantes de la biota fecal en recién nacidos, representando el 60 al 90% del total de la microbiota en niños alimentados con leche materna. Dichas bacterias se convierten en microbiota subdominante después del periodo de destete, representando solo el 6-7% del total de la población adulta (Rigottier-Gois *et al.* 2003; Vaughan *et al.* 2005).

3.2 Metabolismo

Típicamente, las bifidobacterias poseen la enzima fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (Ventura *et al.*, 2008; Felis y Dellaglio 2007), la cual es utilizada en la fermentación de hexosas produciendo ácido acético y láctico como productos finales de su metabolismo (Sela *et al.*, 2008).

Recientes ensayos metabólicos *in vitro* han demostrado que bacterias del género *Bifidobacterium*, además de fermentar azúcares comunes como glucosa, galactosa y fructosa, también son capaces de utilizar una gran variedad de carbohidratos complejos como los XOS (Palframan *et al.*, 2003), pectina (Slovakova *et al.*, 2002), FOS (Kaplan y Hutkins, 2000), mucina (Ruas-Madiedo *et al.*, 2008; Turróni *et al.*, 2010) así como oligosacáridos de plantas, en especial, los llamados fructanos de agave (Gómez *et al.*, 2010).

Gracias al análisis del genoma completo, se ha confirmado que algunas cepas de bifidobacterias pueden producir algunas de las vitaminas del complejo B tales como, tiamina(B1), piridoxina(B6), ácido fólico(B11) y niacina(B3), mientras que otras cepas también poseen genes para la biosíntesis de riboflavina(B2). (Sela *et al.*, 2008).

3.3 Aspectos fisiológicos

Como parte de los aspectos fisiológicos; la temperatura óptima de crecimiento de las especies de *Bifidobacterium* aisladas del tracto GI humano es entre 36 y 38°C, sin embargo algunas especies de origen animal pueden requerir temperaturas mayores entre 41 y 43°C o el caso extremo de *B. thermacidophilum* de 49°C (Dong *et al.*, 2000).

Generalmente, no existe crecimiento debajo de 20°C con excepción de *B. psychraerophilum* reportando crecimiento a 8°C (Simpson *et al.*, 2004).

Algunas bifidobacterias son ácido tolerantes, sin embargo, el valor de pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de especies se encuentra entre 6.5 y 7.0. Por otro lado, diversas especies de bifidobacterias han demostrado ser capaces de sobrevivir en fluidos gástricos humanos sintéticos con pH de 3.5 (Maus e Ingham, 2003).

A pesar de estar clasificadas como bacterias anaeróbicas, algunas bifidobacterias toleran el oxígeno en presencia de dióxido de carbono. Algunas especies de *Bifidobacterium* son particularmente aerotolerantes en presencia de agentes reductores en matrices líquidas (Kheadr *et al.*, 2007; Meile *et al.*, 1997).

4. Género *Lactobacillus*

4.1 Historia y clasificación del género

Dentro del phylum *Firmicutes*, se encuentra uno de los géneros más amplios y diversos conteniendo cerca de 145 especies conocidas, se trata de microorganismos con bajo contenido de G+C en su ADN, microaeróbicos, catalasa negativos no formadores de esporas, Gram positivos con forma de varilla, bacilo o cocobacilo: *Lactobacillus* (Claesson *et al.*, 2008; Axelsson, 2003).

Sin duda es en extremo un género heterogéneo, comprendiendo especies con una gran variedad de propiedades fenotípicas, bioquímicas y fisiológicas englobados en una taxonomía que en la mayoría de los casos es considerada insatisfactoria (Ventura *et al.*, 2006; Felis y Dellaglio, 2007; Makarova *et al.*, 2006).

La incongruencia de varios estudios taxonómicos sugiere la compleja línea evolutiva de los linajes de *Lactobacillus*. Sin embargo, basado en estudios filogenéticos, es posible distinguir los siguientes grupos dentro del género (Claesson *et al.*, 2008) Fig.2:

Grupo A (*L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. bulgaricus*, *L. johnsonii* y *L. gasseri*).

Grupo B (*L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. brevis* y *P. pentosaceus*).

Grupo C (*L. sakei* y *L. casei*)

Grupo D (*Leuconostoc mesenteroides* y *O. oeni*)

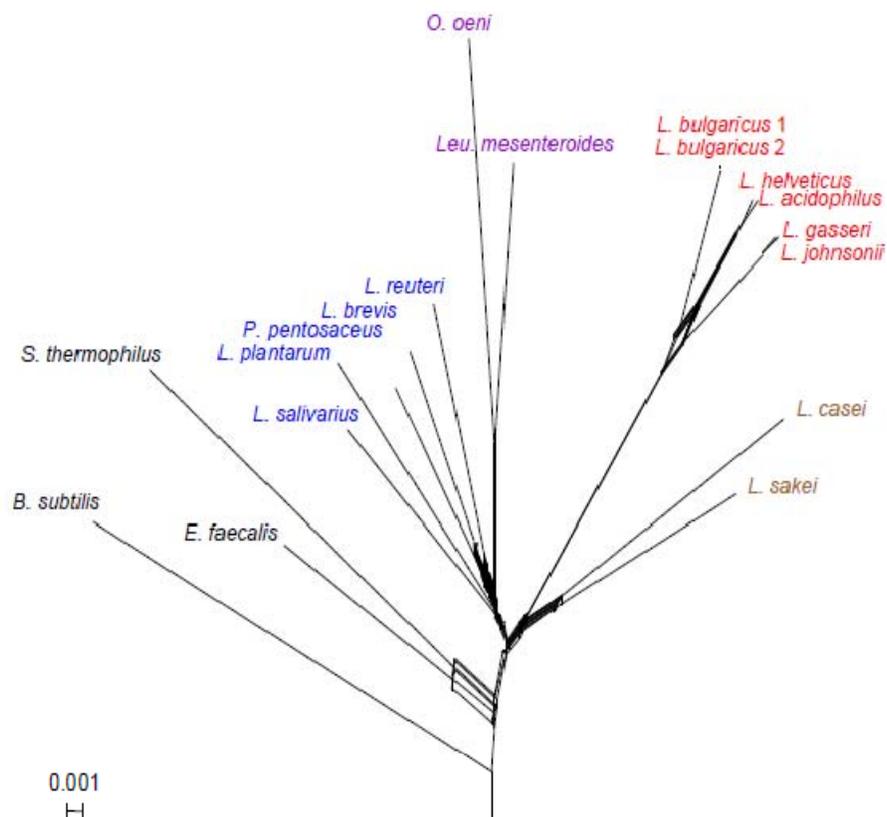


Fig. 2.Árbol filogenético de *Lactobacillus* basado en 141 secuencias de alineamientos concatenados de proteínas ribosomales (Tomado de Claesson *et al.*, 2008).

Lactobacillus puede ser considerado ubicuo del medio ambiente, ya que se encuentran en diversos ecosistemas donde existan carbohidratos disponibles para su metabolismo: en alimentos (lácteos, cárnicos, pastas, etc.), sistemas respiratorio, digestivo y genital tanto de humanos como en animales, aguas residuales y plantas (Felis y Dellaglio, 2007).

4.2 Metabolismo

Las bacterias del género *Lactobacillus* son microorganismos fermentativos, carentes de citocromos, microaerófilos y quimioorganotróficos, es el género más grande entre las bacterias ácido lácticas, llamadas así por su capacidad de producir ácido láctico como producto final de su metabolismo (Axelsson, 2003; Mayo *et al.*, 2008).

De acuerdo a su metabolismo de carbohidratos las bacterias del género *Lactobacillus* se puede clasificar como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de bacterias del género *Lactobacillus*. Tomado de Axelsson, 2003.

Grupo I Homofermentativos	Grupo II Heterofermentativos facultativos	Grupo III Heterofermentativos
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. salivarius</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. reuteri</i>

4.3 Aspectos fisiológicos

Poseen crecimiento óptimo en el rango de 35- 38°C en condiciones de anaerobiosis, sin embargo, debido a la basta cantidad de microorganismos contenidos en el género estas condiciones varían de acuerdo a la especie.

5. Probióticos, Prebióticos y Simbióticos

Desde tiempos inmemoriales, los microorganismos han sido incorporados a los alimentos. Los alimentos fermentados eran preparados como método de conservación de los mismos utilizando microorganismos no caracterizados de ambientes circundantes (Mattia y Merker, 2008). Posteriormente, con el desarrollo de técnicas para obtención de cultivos puros y caracterizados, el uso de microorganismos en alimentos tuvo un auge impresionante revolucionando la industria alimenticia.

5.1 Probióticos

A lo largo de los años, un sinnúmero de definiciones para el término "probiótico" han sido utilizadas, sin embargo, una de ellas, derivada de la Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS, 2002) y aprobada por el International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics ejemplifica mejor la amplitud y ámbito de aplicación de los probióticos tal y como los conocemos hoy en día: "Microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del huésped"(Reid *et al.*, 2003; Cronin *et al.*, 2010).

Durante las últimas décadas, una gran variedad de productos innovadores han sido desarrollados y comercializados en todo el mundo. Los cuales pueden ser agrupados en 3 categorías:

1. Alimentos convencionales como las leches fermentadas las cuales contienen bacterias probióticas, consumidos primordialmente con propósitos nutricionales.
2. Suplementos alimenticios o fórmulas alimenticias, mayormente utilizadas como vehículo de la bacteria o bacterias probióticas.
3. Suplementos dietarios en forma de cápsulas.

Aprovechando los mecanismos de fermentación de carbohidratos de diversos microorganismos, éstos han sido utilizados básicamente como:

- Cultivos iniciadores de fermentación (BAL): incorporados en productos lácteos para elaboración de yogurt, queso y leches fermentadas destacando los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, etc (Carr *et al.*, 2002). Por otro lado, también se han incorporado levaduras principalmente *Saccharomyces* spp. para elaboración de ciertas bebidas alcohólicas. Estos microorganismos son eliminados una vez finalizado el proceso de fabricación del alimento.
- Microorganismos probióticos: Un número creciente de productos lácteos y cereales incorporan bacterias probióticas en vehículos o matrices novedosas con la finalidad de que éstos lleguen viables al intestino, siendo los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* los principalmente utilizados para dicho fin (Ventura *et al.*, 2008).

Actualmente, las matrices alimenticias mayormente utilizadas para incorporación de cepas probióticas en alimentos son: el yogurt y las leches fermentadas. En contraste con los cultivos iniciadores, los microorganismos probióticos no participan en el proceso de fermentación de dichos productos, creciendo lentamente y por lo general añadidos después del proceso de manufactura (Shah, 2000).

Cuando se selecciona un microorganismo para ser empleado como probiótico incorporándolo a alimentos, la cepa debe de estar identificada a nivel de género, especie e incluso cepa-específica. Una caracterización veraz es importante para la identificación y diferenciación de cepas cercanamente relacionadas, así como el entendimiento de las interacciones ocurridas con la microbiota intestinal para garantizar la calidad y seguridad del alimento.

Desde hace muchos años, tanto *Lactobacillus* como *Bifidobacterium* han sido ampliamente utilizados como probióticos y evaluados por su habilidad de reducir algunas enfermedades del tracto gastrointestinal y brindar protección contra patógenos (Guarner y Malagelada, 2003; Ventura *et al.*, 2008).

De éstos, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *B. breve* y *B. animalis* subsp. *lactis* son las especies ampliamente reconocidas y distribuidas comercialmente como probióticos (Ventura *et al.*, 2008; Briczinski *et al.*, 2009).

5.1.1 *Lactobacillus acidophilus* NCFM

Lactobacillus acidophilus NCFM (North Carolina Food Microbiology, NCFM) es extensamente reconocido como bacteria probiótica comúnmente añadida al yogurt (Sanders y Klaenhammer, 2001),

aproximadamente el 80% del yogurt en Estados Unidos ahora contienen *L. acidophilus* (Hutkins, 2006).

El microorganismo fue aislado por primera vez por Moro en 1900 de heces de infantes y caracterizado como un bacilo anaerobio en ocasiones microaerófilo homofermentativo Gram-positivo que crece óptimamente a temperaturas entre 37°C a 42°C.

L. acidophilus NCFM es un bacilo Gram-positivo, anaerobio homofermentativo, el cual, ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y fermentativas, resultando en una cepa con características probióticas contundentes (Altermann, 2010). El microorganismo carece de capacidad biosintética para la mayoría de vitaminas y aminoácidos, sin embargo, posee mecanismos que pueden activar a las células presentadoras de antígenos generando una inmunoregulación, transporte de nutrientes y fermentación de metabolitos resultando en un beneficio tangible al interactuar con la biota intestinal, por consiguiente en la salud de huésped (Altermann *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2009).

La funcionalidad probiótica de *L. acidophilus* ha sido bien documentada tanto *in vitro* como *in vivo*, y esto incluye el alivio de la intolerancia a la lactosa, mantenimiento del balance de la microbiota del tracto GI, inmunomodulación vía estimulación del huésped para expresión de citoquinas e inmunoglobulina A (IgA) y exclusión de microorganismos patógenos. En un análisis mutacional se demostró que el gen *apf* potencialmente juega un importante rol en la funcionalidad probiótica, específicamente, en *L. acidophilus* NCFM sobre la tolerancia a bilis y acidez así como la adherencia a la mucosa intestinal (Goh y Klaenhammer, 2010).

Un análisis *in silico* de un locus en particular dentro del genoma de *L. acidophilus* reveló la presencia de un grupo de genes que codifican proteínas potencialmente involucradas en el transporte e hidrólisis de compuestos prebióticos. Este grupo de genes ha sido analizado funcionalmente para revelar la base genética del catabolismo y transporte de FOS por *L. acidophilus* NCFM (Barrangou *et al.*, 2003).

5.1.2 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07

En el caso de *Bifidobacterium*; *B. breve* y específicamente *B. animalis* subsp. *lactis*, son encontrados en la mayoría de productos lácteos suplementados con probióticos analizados en Norte América, Canadá, Gran Bretaña, Francia, Italia y Alemania. Sin embargo, en los Estados Unidos no se identifica la especie dentro de la etiqueta refiriéndose con el nombre invalido "bifido" o "bifidus" (Briczinski *et al.*, 2009).

Gracias a nuevas evidencias genotípicas reportadas por Ventura y Masco en 2004, indican que *B. animalis* subsp. *lactis* y *B. animalis* subsp. *animalis* deben ser consideradas como dos entidades taxonómicas separadas al nivel de subespecie. Con esta reclasificación se ha podido han podido empezar a estudiar las propiedades probióticas de *B. animalis* subsp. *lactis*

En relación a la mayoría de especies de bifidobacterias de origen humano, *B. animalis* subsp. *lactis* es menos sensible a condiciones de "estrés" soportando concentraciones considerables de bilis, acidez y oxígeno (Meile *et al.*, 1997) apoyando así, las condiciones del cultivo iniciador así como la acidificación en la manufactura del producto lácteo lo cual es benéfico ya que de cierto modo mantiene su estabilidad durante la vida del alimento fabricado. (Turroni y Ventura, 2010).

B. animalis subsp. *lactis* Bi-07 exhibe propiedades tales como: elevada tolerancia al oxígeno, crecimiento diferencial en medios a base de leche, hidrólisis de las proteínas de la leche, estimulación de la resistencia del huésped a través de la modulación del sistema inmune exclusión de patógenos y producción considerable de formato, metabolito utilizado por los colonocitos otorgando beneficios a la salud (Meile *et al.*, 1997; Cronin *et al.*, 2010; Turrioni *et al.*, 2010).

5.2 Prebióticos

Existen también compuestos orgánicos que al igual que los Lactobacilos y Bifidobacterias, otorgan beneficios a la salud del huésped ya que sirven de sustrato para el crecimiento y proliferación de la microbiota intestinal, dichas sustancias son conocidas como *prebióticos*, los cuales, en su mayoría corresponden a oligosacáridos no digeribles como la inulina , hidratos de carbono como la rafinosa y fructanos.

En 1995, Gibson y Roberfroid definieron a los prebióticos como ingrediente alimentario no digerible que estimula selectivamente el crecimiento de algunas bacterias intestinales, posteriormente, Hijova *et al.*, en 2009 señalaron a los prebióticos como “un ingrediente selectivamente fermentado que permite cambios específicos tanto en la composición y/o actividad de la microbiota del tracto GI que otorga beneficios a la salud del huésped”.

Los oligosacáridos son compuestos que se estructuran por un número relativamente pequeño de monosacáridos, los cuales se encuentran unidos por enlaces glicosídicos. Por lo general, presentan un gusto dulce, solubles en agua y si poseen un grupo hemiacetálico libre poseen poder reductor (Melo, 2006).

Los FOS han sido estudiados por ser considerados promotores de la salud, a través de la estimulación del crecimiento de la biota intestinal, reduciendo el pH y otorgando consistencia a la materia fecal, fortalecimiento de la resistencia a infecciones e incrementando la absorción de minerales (Gibson *et al.*, 2004).

También ha sido señalado que los efectos de los agentes prebióticos en el sistema inmune del huésped no son del todo claros, requiriendo de estudios más complejos (Lomax y Calder, 2009), del mismo modo factores externos como la edad y la dieta de los individuos puede influenciar los resultados en el consumo de prebióticos (Tuohy, 2009).

El consumo de prebióticos y compuestos no digeribles encontrados en los alimentos estimulan el crecimiento y actividad metabólica de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* promoviendo la proliferación de las mismas dentro del intestino resultando en la producción de ácidos grasos de cadena corta (butirato, acetato y lactato) como productos del metabolismo bacteriano otorgándole un beneficio al huésped. Dicho acontecimiento es conocido como “efecto bifidogénico” (Nikoleta 2010, Meyer 2009).

Las bifidobacterias, gracias a que poseen la enzima fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (Gibson *et al.*, 2004; Sela, 2008) fermentan de forma específica este tipo de compuestos, se ha demostrado *in vitro* que las bifidobacterias son estimuladas significativamente por la oligofructosa y por los fructanos de agave generando un efecto bifidogénico (Gómez *et al.*, 2009).

5.3 Simbióticos

Al interactuar sinérgicamente un probiótico (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) con un prebiótico (FOS) contenidos en una matriz alimenticia se le conoce como simbiótico (Cronin *et al.*, 2010).

El sinergismo encontrado en un producto simbiótico otorga ventajas tangibles: Primeramente, ofreciendo eficazmente una distribución del microorganismo probiótico en el intestino, al igual, al poseer un prebiótico, otorga una fuente inmediata de carbohidratos importante en la actividad metabólica microbiana dentro del intestino, indicando así, que la combinación de un prebiótico con un probiótico representa una estrategia superior para potenciar los beneficios en la salud del huésped.

6. Fructanos

6.1 Estructura química

Los fructanos representan una categoría de compuestos que abarcan todos los oligo y polisacáridos contenidos de forma natural en diversas plantas, consistiendo, aunque no de manera exclusiva, en enlaces $\beta(2-1)$ fructosil-fructosa y comprende a la mayoría de enlaces glucosídicos en la cadena, por lo tanto son ante todo polímeros de unidades de fructosa (Roberfroid, 2007).

Si un fructano posee una molécula de glucosa precedida a fructosa se le conoce como $G_{py}F_n$ [glucopiranosil-(fructofuranosil) $_n$ -fructosa], del mismo modo si no contiene glucosa se denomina $F_{py}F_n$ [fructopiranosil-(fructofuranosil) $_n$ -fructosa]. Los fructanos también pueden ser descritos de acuerdo al GP. El GP se refiere al número de unidades repetidas de un oligómero o cadena polimérica, por lo tanto

el GP de un solo fructano correspondería al número de unidades de fructosa repetidas y sería idéntico a n . (Kelly, 2008).

Cuando la molécula de inicio es sacarosa dentro del fructano, el enlace entre la glucosa inicial y el segundo carbono (fructosa) puede ser hidrolizado en cierto grado por enzimas sacarasa secretadas por las microvellosidades intestinales produciendo una glucosa libre (Kelly, 2008).

La inulina es el nombre genérico que se le otorga a los fructanos lineales tipo $[1F(D\text{-fructofuranosil})_n \text{ sacarosa}]$ con enlaces glicosídicos β (2-1) fructosil-fructosa. Este tipo específico de enlace le ofrece a la inulina una estructura y propiedades fisiológicas únicas. Los prebióticos tipo inulina incluyen a la inulina, oligofruktosa y FOS como se muestra en la Fig. 3.

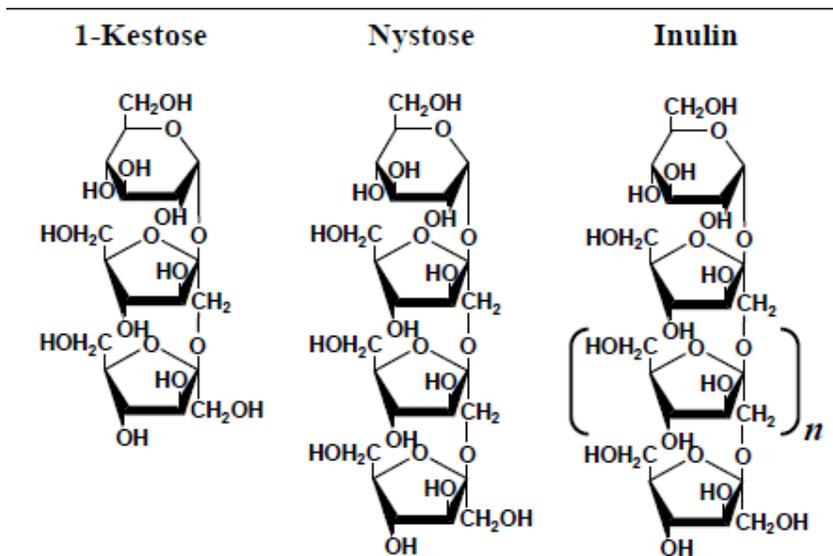


Fig. 3 Estructuras de fructanos tipo inulina (Ueno *et al.*, 2011).

6.2 Fructanos de Agave

Los fructanos son importantes depósitos de carbohidratos en diversas plantas como *Poaceae* (e.g. trigo y cebada), *Asteraceae* (e.g. achicoria y alcachofa) y *Liliaceae* (e.g. cebolla y espárragos), (Ueno *et al.*, 2011).

El agave es una planta endémica de México perteneciente a la familia *Agavaceae*, la cual utiliza el metabolismo de ácidos típico de las crasuláceas produciendo fructanos como principal reserva de carbohidratos (Iñiguez-Covarrubias *et al.*, 2001).

Estos carbohidratos se encuentran en un 15% del reino vegetal, sin embargo, en los Agaves (*Agavaceae*) constituyen casi el total de los carbohidratos, por lo que su importancia se potencia.

Las investigaciones más profundas de los miembros de la familia *Agavaceae* proponen patrones estructurales de los fructanos basados en el tipo de enlace y GP sugiriendo su clasificación en 3 grupos (Mancilla-Margalli, 2006), dentro de los fructanos de *A. americana* se han encontrado estructuras ramificadas complejas, reflejándose en la necesidad de usar técnicas modernas para la definición acertada de la estructura química de estos compuestos.

El *Agave tequilana* Weber var. Azul muestra una compleja y ramificada estructura de fructanos con enlace $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$ siendo resistentes a la hidrólisis por enzimas del tracto digestivo pero puede ser fermentado por la microbiota intestinal produciendo ácidos grasos de cadena corta benéficos para la salud. (López *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2009).

6.3 Fructanos de agave como prebióticos.

El oligosacárido extraído principalmente de la achicoria, conocido como inulina, sin duda, ha sido uno de los prebióticos ampliamente analizado y explotado con fines médicos, nutricionales y comerciales (Gómez *et al.*, 2009).

Actualmente, se han buscado nuevas fuentes de prebióticos, encontrando en el agave, una planta mexicana, una de las principales fuentes de fructanos tipo inulina los cuales han comenzado a revolucionar a la industria alimenticia.

Diversos estudios han comprobado la estructura química de los fructanos de agave (López *et al.*, 2007; Mancilla-Margalli, 2006) para ser utilizado como un nuevo sustrato con cualidades prebióticas. Estas cualidades prebióticas han sido comprobadas mediante el monitoreo *in vitro* de la fermentación de éstos compuestos reflejándose en el crecimiento selectivo de bifidobacterias y lactobacilos totales (Gómez *et al.*, 2009).

La habilidad de selectos microorganismos intestinales de utilizar sustratos no digeribles por el huésped juega un importante papel en la colonización de los mismos en el tracto GI del individuo (Barrangou *et al.*, 2003).

Tanto *L. acidophilus* NCFM y *B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 pueden colonizar transitoriamente el intestino humano ya que poseen mecanismos o enzimas con las cuales son capaces de fermentar los fructanos de agave resultando en metabolitos que otorgan un beneficio al huésped (Ventura *et al.*, 2007; Barrangou *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2009; Lopez *et al.*, 2007).

De tal manera que los azúcares y en especial los fructanos, que ésta planta contiene, pueden ser utilizados como prebióticos ya que los fructanos no son hidrolizados en el estómago, ni en el intestino delgado por lo que mantienen bajos los niveles de glucosa en la sangre, del mismo modo permite su utilización como aditivo en alimentos para diabéticos y en productos dietéticos con bajo contenido calórico.

ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

La microbiota intestinal humana no es constante; esto es, cambia conforme el individuo crece. También es afectada por múltiples factores como la dieta, microorganismos, el huésped mismo y factores ambientales (Lovat, 1996).

En la vida adulta de los seres humanos, la biota intestinal en general es estable pero para llegar a ésta estabilidad, la microbiota es sometida a diversos cambios a lo largo de la vida del individuo (Jones, 2010). En el caso de las bifidobacterias, se encuentran en grandes concentraciones en recién nacidos, disminuyendo conforme la persona alcanza la madurez (Solano-Aguilar *et al.*, 2008; Haarman y Knol, 2006; Barrangou *et al.*, 2009).

Al existir una alteración de la biota intestinal (disbiosis), los patógenos pueden causar, entre otros padecimientos, enteritis al secretar enterotoxinas que incrementan la permeabilidad epitelial, elaborar proteínas inmunosupresoras alterando el metabolismo de las células epiteliales, etc.

Las alteraciones de la microbiota es una causa multifactorial, para fines del presente estudio nos enfocaremos en la perturbación generada por el tratamiento con antibióticos, el resultado de la alteración del balance biótico intestinal conlleva a la proliferación de patógenos oportunistas, es por ello que los productos simbióticos son considerados como un tratamiento auxiliar para minimizar alteraciones en la biota intestinal causada por antimicrobianos (Jernberg *et al.*, 2005).

A continuación se mencionan algunos de los estudios realizados en los últimos años, en los cuales manejan ya sea un agente probiótico,

un prebiótico o ambos para fines de la evaluación en el impacto de la biota intestinal humana.

Bartosch *et al.* en 2005, realizaron un estudio aleatorio, doble ciego, en un grupo de 18 adultos sanos, a los cuales, se les evaluó los efectos microbiológicos por el consumo de un alimento simbiótico (*B. bifidum*, *B. lactis* y oligofruktosa), determinado por PCR en tiempo real ambas especies de Bifidobacterias en los pacientes que habían consumido el producto simbiótico teniendo como resultado un significativo incremento poblacional de las bifidobacterias.

En 1998, Roberfroid *et al.* realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* con sujetos voluntarios a los cuales les proporcionaron suplementos de FOS (15g durante 15 días). Estos estudios mostraron que la ingestión de FOS modificó significativamente la composición de la microbiota fecal, disminuyendo considerablemente el número de *Bacteroides*, *Fusobacteria* y *Clostridia*, en contraste con un aumento de hasta cinco veces en la población de bifidobacterias.

Evidencias de la eficacia de los prebióticos administrados solos o en conjunto con un probiótico (combinación referida como simbiótica), en enfermedades, es escasa y existen pocos estudios controlados existentes en la literatura. Hay pocos o no existen datos sobre su uso en cualquiera de sus formas evaluando el impacto sobre el crecimiento bacteriano en el intestino.

El uso de la combinación simbiótica (pro y prebióticos) es una propuesta viable para la modulación de la microbiota gastrointestinal humana para una composición saludable.

OBJETIVOS DE LA TESIS

Objetivo General.

Evaluar el efecto de un biogel simbiótico conteniendo *L. acidophilus* NCFM, *B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 y fructanos de agave al ser ingerido después de la ingesta de una régimen de antibiótico sobre la microbiota intestinal humana a través de la recuperación, aislamiento e identificación de cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* analizando la biodiversidad resultante tomando como referencia al microorganismo dominante.

Objetivos particulares.

Desarrollar una metodología para la recuperación de microorganismos almacenados en congelación obtenidos del estudio del Biogel simbiótico.

Efecto sobre la microbiota autóctona tras la administración de un antibiótico y la repoblación de la microbiota intestinal a través de la identificación de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* por medio de la amplificación y secuenciación de la zona intergénica del gen 16S ARNr.

Analizar los diferentes aislados de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* dominantes obtenidos, visualizando el impacto producido en la microbiota intestinal de los pacientes estudiados.

PARTE EXPERIMENTAL

El Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán (INNCMSZ) evaluó la acción de un gel biodigestivo marca Ventro® como parte de un protocolo *in vivo* sobre repoblación intestinal de pacientes voluntarios sanos bajo un esquema antimicrobiano (rifaximina). Para detalles sobre el protocolo experimental del estudio consultar el Anexo A.

Se colectaron 121 muestras fecales de los 20 sujetos del estudio del Biogel. De los especímenes fecales, se aislaron y almacenaron 645 cepas bacterianas con características de lactobacilos y/o bifidobacterias.

Los microorganismos del cepario fueron conservados en pequeños viales por duplicado inmersos en medio BHI con glicerol a una temperatura de -20°C.

1. Recuperación de microorganismos

La formulación y metodología de preparación de los medios de cultivo utilizados se encuentra detallada en el Anexo B.

Inicialmente, se intentó la recuperación directa de los microorganismos de interés conservados en medio BHI con glicerol utilizando agar en placa; MRS para lactobacilos y DP para bifidobacterias.

A su vez, y como una segunda opción debido a que son microorganismos anaerobios, se realizó la recuperación de microorganismos por la inoculación de un volumen (600µl) tomado

directamente de los viales de BHI para ser inoculado en el medio de tioglicolato semisólido con indicador. Los medios se incubaron por 48 horas a 37 °C.

Del crecimiento obtenido en el tubo de medio de tioglicolato semisólido se tomaron 200 µl preferentemente del fondo del tubo y se sembraron en 3 medios de cultivo.

- MRS (de Man, Rogosa, Sharpe).
- DP (Dicloxacilina-Acido Propiónico).
- MC (Mac Conkey).

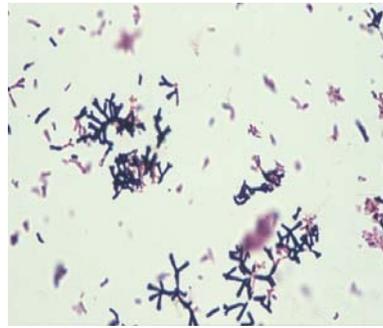
Si en el medio de tioglicolato se observaron crecimientos de varios microorganismos, se sembró en diferentes medios de cultivo MRS para lactobacilos, DP para bifidobacterias y microorganismos contaminantes en MC.

Se incubaron por 48 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis por medio de una jarra con éstas características con la ayuda de sobres generadores de atmosfera anaerobia (Oxoid AnaeroGen™).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se buscaron posibles bifidobacterias y lactobacilos. Se tomó una pequeña muestra y se realizó una tinción de Gram para corroborar la morfología y pureza de la colonia.



Morfología característica de *Lactobacillus*



Morfología característica de *Bifidobacterium*

Una vez identificada la colonia de interés, ésta se resembró en el medio de cultivo de la cual se aisló y se incubó por 48 horas en condiciones de anaerobiosis como se mencionó anteriormente.

Transcurrido este tiempo se comprobó la pureza del cultivo mediante observación visual (un solo tipo de colonia característica) y por Tinción de Gram. La cepa pura se utilizó para la extracción del ADN.

2. Formación de un nuevo cepario

Una vez comprobada la pureza del cultivo se resembró mediante estriado de forma masiva en el medio correspondiente del cual se aisló incubándolo por 48 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis.

Todas las bacterias recuperadas del medio BHI fueron almacenadas nuevamente a -70°C en crioviales con medio de leche descremada al 20%.

3. Extracción de ADN

Se sembraron las cepas de interés en medio DP o MRS según corresponda de acuerdo a la etiqueta del cepario. Se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis por 48 horas. Transcurrido este tiempo se evaluó el crecimiento mediante la comprobación de la pureza de las colonias aisladas a través de una tinción de Gram.

Con un asa recta estéril se tomó una pequeña porción de la colonia aislada para resuspenderla en 150 µl de una solución de Chelex® 100 (Biorad) al 7.5% colocada en microtubos de 500 µl, se homogenizó en un *vortex* durante 30 segundos.

Posteriormente se incrementó la temperatura a 100°C durante 10 minutos. Una vez terminado el tiempo de calentamiento se enfrió la muestra a 4°C y se centrifugó durante 10 minutos a una velocidad de 13,000 rpm

Para evitar que la resina degrade el material genético se retiró el sobrenadante colocándolo en un nuevo microtubo de 500 µl. El templado fue conservado a -20°C hasta su utilización.

Se ha demostrado que la extracción de ADN con Chelex ofrece alrededor de 100 ng/ml de material genético con una pureza superior que al utilizar Triton X y equiparable al método tradicional de extracción con cloruro de benzilo (Polgarova, 2010).

Para evaluar la integridad del material genético extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con un voltaje de 90V. Fig. 4

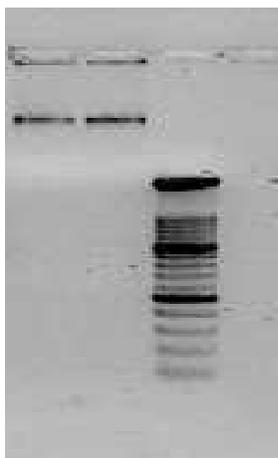


Fig. 4. Evaluación de extracción de ADN en gel de agarosa al 1%. En el primer y segundo pocillo se observa el material genético comparado con el marcador de peso molecular colocado en el tercer pocillo.

Al mismo tiempo se realizó la extracción mediante un equipo con sistema automatizado para extracción total de ácidos nucleicos NucliSENS® easyMAG® con 4 cepas control:

<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Danisco
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Danisco
<i>Pseudomonas</i> sp.	Aislado clínico
<i>E. coli</i>	Aislado clínico

Al tener ADN extraído por esta metodología estamos seguros en cuanto a su calidad e integridad.

Se realizó lo anterior para que al momento de someter la reacción de PCR se descartara la opción de una extracción deficiente de ADN en caso de que el resultado de PCR fuera insatisfactorio.

4. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizó un par de primers (cebadores) universales que amplifican un fragmento del gen 16S ARNr y el espacio intergénico EI (Tabla 2), los cuales, han sido ampliamente utilizados en el campo clínico para detección pronta y eficaz de diversas bacterias, reportando cerca de 30 géneros diferentes de bacterias identificados, incluidos Lactobacilos y Bifidobacterias (Greisen *et al.*, 1994).

Tabla 2. Cebadores universales utilizados en la amplificación del 16S de los Lactobacilos y Bifidobacterias aisladas del estudio clínico.

Cebador	Secuencia	Gen blanco	Tm
16S F	5' AACTGGAGGAAGGTGGGGAT	16S ARNr- EI	65°C
16S R	5' AGGAGGTGATCCAACCGC	23S	

La zona de amplificación del par de cebadores universales se muestra en la Fig.5.

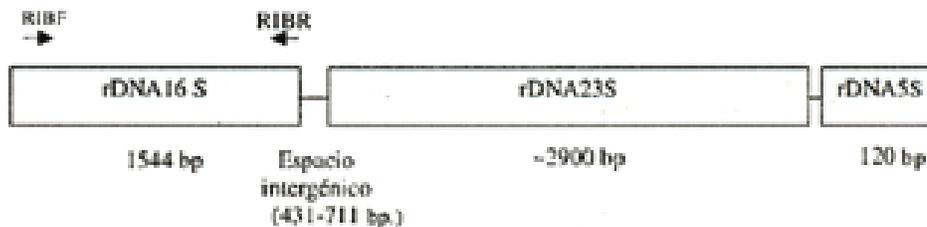


Fig. 5 Esquema de la zona amplificada del gen 16s ARNr

La amplificación del material genético se llevó a cabo bajo las siguientes características:

- Solución amortiguadora 10X 50mM
- MgCl₂ 1.5mM
- dNTPs 200μM
- Primer delantero 30pmol
- Primer reverso 30pmol
- Polimerasa Taq Gold® 1.5 U
- Templado 4μl
- Volumen final 50μl

La mezcla de reacción fue colocada en microtubos de 500μl a los cuales se les adicionaron 4 gotas de aceite mineral estéril grado biología molecular para evitar pérdida de volumen en el termociclador y por lo tanto PCR no satisfactorios.

La reacción de PCR se llevó a cabo por un termociclador MJ Research Inc. bajo las condiciones siguientes:

- Paso inicial de activación 93°C 5 min
 - Desnaturalización 94°C 1 min
 - Alineación 56°C 1 min
 - Extensión 72°C 2 min
 - Elongación final 72°C 10 min
 - Enfriamiento 4°C 48 h
- } 35 ciclos

5. Electroforesis

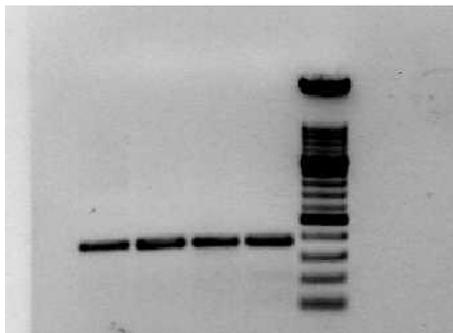
La separación electroforética de los productos de PCR fue realizada en geles al 1% de agarosa Bio-Rad en solución amortiguadora TBE 0.5X en cámaras de electroforesis Easy Cast Electrophoresis System con un voltaje constante de 90V (Hoefer Scientific Instruments) por 2 horas. En la preparación de los geles de agarosa se añadieron 1.5 μ l de bromuro de etidio como reactivo revelador. Dentro de cada pocillo de la placa de gel de agarosa al 1% se colocó una mezcla perfectamente homogenizada de 5 μ l del producto de PCR, 2 μ l de solución amortiguadora stop mix y 2 μ l de solución amortiguadora TBE 0.5X.

Se utilizó un marcador de peso molecular XIV marca Roche® de 100 bp como referencia de peso molecular en pares de bases. Los geles de agarosa fueron revelados a través de un transiluminador Geldoc 1000 Bio-Rad.

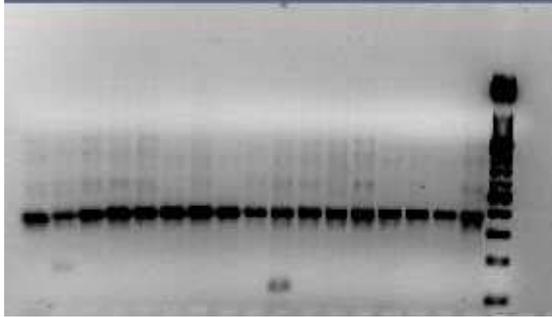
6. Purificación de productos de PCR.

Como resultado de la electroforesis se obtuvieron dos panoramas distintos:

1. Bandas definidas con peso molecular deseado.



2. Múltiples bandas incluyendo la banda del peso molecular deseado.



De acuerdo a los casos anteriormente mencionados se siguieron protocolos de purificación diferentes.

Bandas Definidas (caso 1).

Como se tienen bandas definidas, se trabajó directamente con el producto de PCR restante (45 μ l).

Para la purificación se utilizó el Kit de purificación MinElute® QIAGEN conforme a lo siguiente:

Se añadieron 5 volúmenes de solución amortiguadora PBI (Clorhidrato de guanidina e isopropanol) por cada volumen de producto de PCR, no fue necesario remover el contenido de aceite mineral. Se corroboró que el color de la solución fuera amarillo, si la solución cambió a color naranja o violeta se añadieron 10 μ l de acetato de sodio 3M mezclando perfectamente. Por ejemplo, se añadieron 250 μ l de PBI a 50 μ l de producto de PCR.

Se colocó una columna MinElute en un tubo de colecta de 2ml.

Para enlazar el ADN se colocó la muestra en la columna y se centrifugó por 1min a 13,000 rpm descartando el sobrenadante.

Para lavar se añadieron 750µl de solución amortiguadora PE (etanol absoluto) a la columna de MinElute y se centrifugó por 1min a 13,000 rpm descartando el sobrenadante. Para obtener mejores resultados se recomienda dividir el volumen de PE en dos partes realizando este paso por duplicado.

El etanol residual de la solución amortiguadora PE no se elimina por completo en este paso, es necesaria una nueva centrifugación una vez descartado el sobrenadante.

Para eluir el ADN se colocó la columna MinElute en un tubo Eppendorf de 1.5ml y se le añaden 15µl de solución amortiguadora EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5) en el centro de la membrana dejándola en reposo por 1 min, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min.

El producto de PCR purificado fue conservado a -20°C hasta su utilización.

Múltiples bandas (caso 2).

Para purificar una banda directamente del gel de agarosa se realizó lo siguiente:

Primeramente se volvió a realizar una separación electroforética en gel de agarosa al 1% con 1.5ml de bromuro de etidio como agente revelador en solución amortiguadora TBE 0.5X con un voltaje constante de 90V por 2 horas, solo que en este caso se trabajó con pocillos mas grandes que permitieron la incorporación de todo el producto de PCR restante (45µl). Dentro de cada pocillo se colocó una mezcla de 45µl de producto de PCR con 2µl de solución amortiguadora stop mix. Si el pocillo no soportó la capacidad

requerida se llenó hasta su capacidad máxima evitando el desbordamiento de la mezcla para no tener contaminaciones en otros pocillos.

El revelado del gel de agarosa se realizó en un transiluminador de luz UV ChemiDoc®, en este momento y con ayuda de una navaja bañada en etanol se cortó la porción de gel de agarosa correspondiente a la banda del peso molecular deseado, si se tienen varias bandas dentro del gel se lavó con etanol la navaja para evitar contaminaciones. La porción de gel recortada fue colocada en un microtubo de 2 ml.

Posteriormente se le añadieron 500µl de solución amortiguadora QG (tiocianato de guanidina) y se incubó a 50°C por 10 min hasta que el fragmento de gel se disolvió por completo, para ayudar a disolver el gel se recomienda mezclar la solución con ayuda de un Vortex cada 2 min.

Una vez disuelto el gel se corroboró que el color de la solución fuera amarillo, de lo contrario se añadieron 10µl de acetato de sodio 3M.

Se incorporaron 200 µl de isopropanol grado biología molecular y se homogenizó la mezcla invirtiendo varias veces el microtubo.

Se colocó una columna MinElute en un tubo de colecta de 2ml, para enlazar el ADN se incorporó la mezcla en la columna y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. La capacidad máxima de la columna es de 800µl, si el volumen rebasa esta cantidad es necesario hacerlo en dos pasos. Se desechó el sobrenadante.

Se añadieron 500µl de solución amortiguadora QG a la columna centrifugándose a 13,000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante.

Para lavar se agregaron 750µl de solución amortiguadora PE a la columna de MinElute y se centrifugó por 1min a 13,000 rpm descartando el sobrenadante. Para obtener mejores resultados se recomienda dividir el volumen de PE en dos partes realizando este paso por duplicado.

El etanol residual de la solución amortiguadora PE no se elimina por completo en este paso, fue necesaria una nueva centrifugación una vez descartado el sobrenadante.

Para eluir el ADN se colocó la columna MinElute en un tubo Eppendorf de 1.5ml y se le añadieron 15µl de solución amortiguadora EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5) en el centro de la membrana dejándola en reposo por 1 min, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min.

El producto de PCR purificado fue conservado a -20°C hasta su utilización.

7. Secuenciación de material genético.

Una vez purificado el material genético, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con 1.5µl de bromuro de etidio como agente revelador en solución amortiguadora TBE 0.5 X con un voltaje constante de 90V. Se colocaron 4µl de material genético y del mismo modo el marcador de peso molecular.

El gel fue revelado en un transiluminador de luz UV (GelDoc 1000) con un tiempo de exposición de 0.07 segundos. Este procedimiento se realizó para medir la concentración de material genético que se tiene, ya que depende de ésta la cantidad adicionada para el marcaje del material genético.

En una secuenciación por terminador fluorescente se marcan cada uno de los cuatro didesoxinucleótidos que terminan la cadena con un colorante fluorescente diferente, con fluorescencias a diferentes longitudes de onda. El marcaje se realizó de la siguiente manera:

- Premix 4 μ l
- Solución amortiguadora BigDye 2 μ l
- Primer 1 μ l(3 μ mol)
- Templado 3-10ng^(*)
- Volumen final 20 μ l

(*) Para un producto de PCR de 200-500 bp la concentración recomendada es 3-10ng de material genético, para óptimos resultados se tomó la concentración máxima. La cantidad de μ l para añadir a la mezcla de reacción fue determinada por la comparación en la intensidad de las bandas obtenidas como resultado de la electroforesis.

Cabe mencionar que cada mezcla de reacción corresponde a un solo primer, por lo tanto cada mezcla se realizó por duplicado, una para el primer delantero y otra para el reverso.

La mezcla de reacción colocada en microtubos de 50µl sin aceite mineral fue sometida a las siguientes condiciones favorecidas por un termociclador (GeneAmp® PCR System 9700):

• Paso inicial de activación	96°C	1 min	} 40 ciclos
• Desnaturalización	96°C	10 s	
• Alineación	50°C	5 s	
• Extensión	60°C	4 min	
• Enfriamiento	4°C	48 h	

Una vez terminado el marcaje, la muestra fue purificada para eliminar todas las sales de las soluciones amortiguadoras, el DyeEx Terminator y el primer.

La purificación fue llevada a cabo gracias al Kit DyeEx™ QIAGEN teniendo el siguiente protocolo:

Suavemente y con ayuda de un vortex se resuspendió la resina contenida en la columna.

Se quiebra el cierre inferior de la columna y se colocó en un tubo de colecta de 2ml, se centrifugó por 3 min a 3000 rpm.

Transcurrido este tiempo se observa la formación de un pico de flauta de resina en la columna, con mucho cuidado se transfirió la columna a un microtubo de 2ml descartando el sobrenadante.

Con ayuda de una micropipeta se transfirió lentamente el volumen de reacción justo en el centro de la columna y se centrifugó por 3 min a 3000 rpm. La columna se desechó.

El producto purificado debe de estar libre de agua, por lo tanto se secó en una centrifugadora al vacío Vacufuge Applied Biosystems por 20 min.

Una vez cumplido el tiempo se verificó que no existieran vestigios de agua.

El material genético fue rehidratado a través de la incorporación de 15 μ l de formamida. Una vez añadida la formamida se dejó en reposo cubierto con papel aluminio por 10 min.

Se sometió la muestra a un equipo de secuenciación con terminador fluorescente 3130 / Genetic Analyzer Applied Biosystems. Una vez obtenidas las secuencias deseadas fueron comparadas en la base de datos de GeneBank.

RESULTADOS

Del total de muestras conservadas en criopreservación, se analizaron 215 muestras provenientes de 11 pacientes del protocolo evaluativo de la acción de un gel biodigestivo como parte del estudio *in vivo* sobre la repoblación intestinal de pacientes voluntarios sanos bajo un esquema antimicrobiano. Los 11 pacientes analizados fueron: 6 pertenecientes al grupo 1 (Rifaximina + gel biodigestivo) y 5 fueron parte del grupo 2 (Rifaximina + placebo).

Dentro de las 215 muestras analizadas se obtuvo un 91.2% de recuperación de las cepas. 19 aislados no se pudieron recuperar. Se lograron identificar a través de tinción de Gram como posibles Bifidobacterias el 40.8% (80 muestras), como Lactobacilos el 53.6% (105 muestras) y un 5.6% de morfologías Gram-positivas no identificadas.

De las 215 muestras, el ADN de 75 aislados de los 11 pacientes aleatorizados pudieron ser amplificados para la zona terminal del gen 16S ARNr y el E1 del 23S correspondiente al microorganismo dominante (representado en UFC/g) por visita de cada paciente.

Con fines de este estudio, se definió como microorganismo dominante aquel que presente el mayor número de UFC/g de acuerdo a cada visita por paciente. Si dentro de la visita a analizar, se recuperan tanto Bifidobacterias y Lactobacilos se toman ambos considerando al dominante para cada género.

Los resultados totales son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de las 75 aislados clínicos (dominantes) sometidos para la identificación por amplificación y secuenciación del 16S ARNr durante todo el estudio del biogel simbiótico.

Tiempo	Cepas	<i>Bifidobacteria</i>	<i>Lactobacillus</i>	Otros	Organismos identificados
Basal	40	18	17	1	12
Antibiótico	38	10	18	1	14
1ra visita	37	6	21	2	10
2da visita	34	14	15	3	13
3ra visita	34	17	16	2	12
4ta visita	32	15	18	1	14
Total	215	80	105	10	75

Los organismos secuenciados son los microorganismos dominantes por cada paciente, teniendo en cuenta si trataban de Bifidobacterias, Lactobacilos o ambos.

A continuación se muestran los microorganismos encontrados de acuerdo a la visitas de los pacientes Tabla 2.

Tabla 2. Distribución de los microorganismos identificados por género y especie encontrados en las diferentes visitas durante el estudio del biogel.

Basal	Antibiótico	1ra visita	2da visita	3ra visita	4ta visita
<i>B. ruminantium</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>L. ruminis</i>	<i>catenulatum</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>B. longum</i>	<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>B. catenulatum</i>	<i>L. delbruecki</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>B. licheiformis</i>	subsp.	<i>L. ruminis</i>
<i>L. ruminis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>lactis</i>	<i>bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i>
<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		<i>L. delbruecki</i> subsp.	<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i>		<i>E. faecium</i>
<i>L. rhamnosus</i>		<i>bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i>		
<i>L. casei</i>			<i>L. casei</i>		
			<i>L. ruminis</i>		

En negritas las cepas de *L. acidophilus* y *B. animalis* subsp. *lactis* contenidas en el biogel simbiótico.

Se muestra un panorama global de los géneros y especies encontradas en los 11 pacientes analizados. Se observa la diversidad microbiana autóctona (etapa basal), el desequilibrio al consumo del antibiótico y repoblación de la microbiota a lo largo de un mes de ingesta del biogel simbiótico (cuarta visita).

De acuerdo a las UFC/g obtenidas para cada muestra aislada correspondiente a cada visita se estableció por paciente el microorganismo dominante. Tabla 3

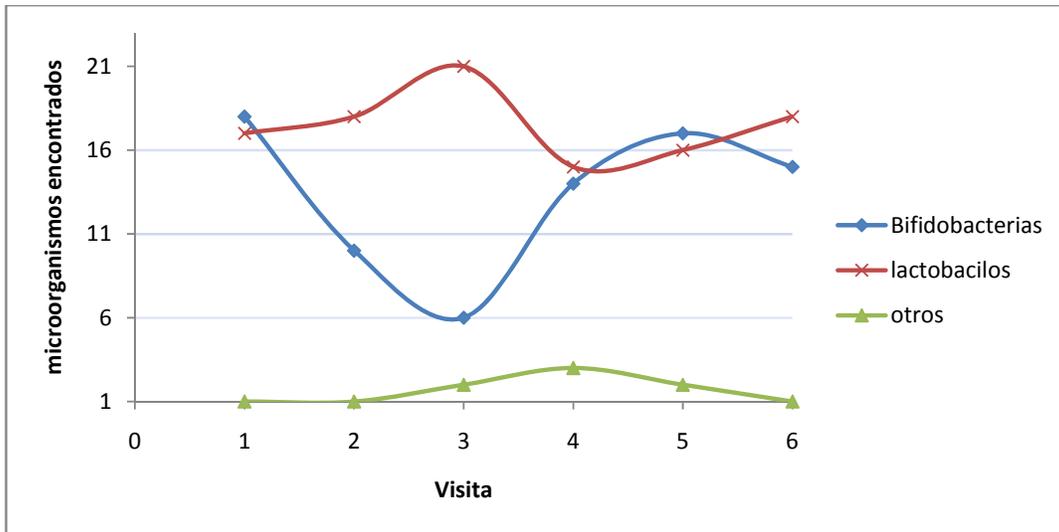
Tabla 3. Microorganismo dominante de acuerdo a UFC/g por paciente a través del estudio.

	Basal	Antibiótico	1ra visita	2da visita	3ra visita	4ta visita
<u>1</u>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. ruminis</i>	<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B.</i> <i>pseudocatenulatum</i> <i>L. ruminis</i>	<i>B. longum</i>	<i>B.</i> <i>pseudocatenulatum</i>
<u>2</u>	NR	<i>B. longum</i>	<i>B.</i> <i>catenulatum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
<u>3</u>	<i>L. plantarum</i> <i>B. longum</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. longum</i>	<i>E. faecium</i>
<u>4</u>	<i>L. ruminis</i>	<i>L. plantarum</i>	NE	<i>L. casei</i>	NE	<i>L. casei</i>
<u>5</u>	<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>L.</i> <i>fermentum</i>	<i>L. ruminis</i>
<u>6</u>	<i>L.</i> <i>rhamnosus</i> <i>B. bifidum</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. casei</i>	<i>B. sp.</i>	<i>L. plantarum</i>
<u>7</u>	NR	<i>L.</i> <i>acidophilus</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pentosus</i>
<u>8</u>	<i>L.</i> <i>fermentum</i>	NR	<i>L. plantarum</i>	NE	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
<u>9</u>	NE	<i>L. plantarum</i>	<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	NR	NR	<i>E. faecium</i>
<u>10</u>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L.</i> <i>fermentum</i>	NE
<u>11</u>	NE	NR	NR	<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>E. faecium</i>

NE, muestras no existentes; NR, muestras no reportadas. Los pacientes subrayados pertenecen al grupo1 (Rifaximina+biogel).

En la tabla 3 se muestra la distribución del microorganismo dominante de acuerdo a UFC/g por paciente para cada una de las visitas. Dichas muestras fueron procesadas varias veces obteniendo el mismo resultado.

En la gráfica 1 se muestra el impacto en la microbiota intestinal a lo largo de las visitas. Es un panorama global conjuntando a todos los pacientes.



Gráfica1. Impacto poblacional en la microbiota intestinal a lo largo de las 6 visitas.

DISCUSION

La recuperación de microorganismos para formación de un nuevo cepario fue de vital importancia para el desarrollo de este estudio y estudios consecuentes, el conservar los microorganismos físicamente nos otorga un sin numero de posibilidades para estudios exhaustivos posteriores.

El intento directo de recuperación en placa fue escaso o casi nulo, teniendo que disponer del medio de tioglicolato semisólido para tal efecto, posteriormente las bacterias pudieron ser recuperados en placa.

El medio de leche descremada ofreció una mejor matriz para la conservación de los microorganismos aislados, la cual fue evaluada tras intentar recuperar los cultivos bacterianos un mes después, obteniendo los lactobacilos y bifidobacterias esperados en todos los intentos realizados.

Recientes estudios por Larsen *et al.*, 2011 y Ouwehand *et al.*, 2009 han demostrado el incremento considerable de poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias en heces de pacientes que han ingerido *Lactobacillus acidophilus* NCFM y/o *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07 dentro de un protocolo controlado, pero no encuentran que las bacterias ingeridas puedan lograr una importante colonización. Nuestros datos apoyan estos hallazgos previos. Los resultados de nuestro estudio muestran un incremento en el conteo de estas bacterias totales y que de los seis pacientes del grupo 1 (Biogel+rifaximina), 2 de ellos presentaron *L. acidophilus* y *B. animalis* subsp. *lactis* como microorganismo dominante en alguna de sus visitas. Estos datos podrían sugerirnos que éstas bacterias pueden colonizar transitoriamente el tracto GI en individuos sanos.

En concordancia con el estudio *in vitro* de Gómez et al., 2010, donde se observó un incremento en los conteos poblacionales totales de *Lactobacillus* así como de *Bifidobacterium* por la fermentación de los fructanos de agave, los resultados presentados en este estudio, demuestran que tras haberse sometido a un tratamiento con un antibiótico (rifaximina), la ingesta de un biogel simbiótico que contiene fructanos de agave como prebiótico, podría estar apoyando la proliferación poblacional de Bifidobacterias y Lactobacilos dentro del tracto gastrointestinal, en específico, de *L. acidophilus* y *B. animalis* subsp. *lactis* en al menos el 30% de los pacientes analizados.

A pesar que la secuenciación del fragmento amplificado (396bp) del gen 16S ARNr no ofreció una diferencia significativa al comparar la secuencia en el GeneBank, nuestros resultados son semejantes al de Larsen *et al.*, 2011 y Ouwehand *et al.*, 2009, en el sentido que *L. acidophilus* NCFM y *B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 no pudieron ser identificados a nivel de cepa-específica aun cuando ellos usaron PCR en tiempo real. Esto puntualiza la importancia de usar más de un método molecular en la identificación de cepa-específica para conocer si una cepa probiótica es capaz de colonizar de manera predominante el tracto GI.

La interacción de microorganismos autóctonos con prebióticos recién incorporados a través de un Biogel simbiótico, al igual que la competencia por nutrientes dentro del tracto GI es sumamente compleja, sin embargo se pudo observar un incremento en las poblaciones de bifidobacterias (efecto bifidogénico), así como el restablecimiento de la microbiota intestinal de los pacientes después de haberse sometido a un régimen antimicrobiano.

CONCLUSIONES

El medio de leche descremada al 20% otorga una mejor matriz para la conservación de BAL.

Los fructanos de agave contenidos en el biogel simbiótico pueden ser metabolizados por *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* generando un efecto bifidogénico en la microbiota intestinal humana.

El fragmento amplificado del gen 16S ARNr no ofrece diferencia a nivel de cepa específica. Es necesario el uso de técnicas más sensibles como PCR en tiempo real, electroforesis en campos pulsados o ERIC-PCR para la identificación a nivel de cepa-específica de *L. acidophilus* NCFM y *B. animalis* subsp. *lactis* B1-07.

El consumo frecuente de un biogel simbiótico puede promover la recuperación de la microbiota intestinal después de un tratamiento con antibióticos incorporando *L. acidophilus* NCFM y *B. animalis* subsp. *lactis* B1-07 a la biota habitual del paciente en al menos el 30% de los casos analizados.

REFERENCIAS

- Ahmad, S., A. Selvapandiyan and R.K. Bhatnagar.** 2000. Phylogenetic analysis of Gram-positive bacteria based on *grpE*, encoded by the *dnaK* operon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:1761-1766.
- Altermann, E. and T.R. Klaenhammer.** 2010. Group-specific comparison of four lactobacilli isolated from human sources using differential blast analysis. *Genes Nutr.* In Press.
- Altermann, E., W.M. Russell, M.A. Azcarate-Peril, R. Barrangou, B.L. Buck, O. McAuliffe, N. Souther, A. Dobson, T. Duong, M. Callanan, S. Lick, A. Hamrick, R. Cano and T.R. Klaenhammer.** 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**:3906-12.
- Axelsson, L.** 2003. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, p. 1-65. *In* S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (ed.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* 3^{er} ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Bäckhed, F., R.E. Ley, J.L. Sonnenburg, D.A. Peterson and J.I. Gordon.** 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307**:1915-20.
- Barrangou, R., E. Briczinski, L. Traeger, J. Loquasto, M. Richards, P. Horvath, A. Coute-Monvoisin, G. Leyer, S. Rendulic, J. Steele, J. Broadbent, T. Oberg, E. Dudley, S. Schuster, D. Romero and R. Roberts.** 2009. Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and Bi-04. *J. Bacteriol.* **191**:4144-4151.
- Barrangou, R., E. Altermann, R. Hutkins, R. Cano, and T.R. Klaenhammer.** 2003. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:8957-62.
- Bartosch, S., E.J. Woodmansey, J.C.M. Paterson, M.E. McMurdo and G.T. Macfarlane.** 2005. Microbiological effects of consuming a symbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis* and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **40**: 28-37.

Briczinski, E.P., J.R. Loquasto, R. Barrangou, E.G. Dudley, A.M. Roberts and R.F. Roberts. 2009. Strain-specific genotyping of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* by using single-nucleotide polymorphisms, insertions, and deletions. *Appl Environ Microbiol.* **75**:7501-8.

Carr, F.J., D. Chill, and N. Maida. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**:281-370.

Claesson, M.J., O.O'Sullivan, Q. Wang, J. Nikkilä, J.R. Marchesi, H. Smidt, W.M. de Vos, R.P. Ross and P.W.O'Toole. 2009. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* **4**:6669-82.

Claesson, M.J., D. van Sinderen and P.W. O'Toole.2008. *Lactobacillus* phylogenomics-towards a reclassification of the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:2945-2954.

Clarridge, J. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:840–862.

Cronin, M., M. Ventura, G. Fitzgerald and D. van Sinderen. 2010. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* In Press.

Dong, X., Y.Xin, W.Jian, X.Liu and D.Ling.2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:119-25.

Felis, G.E. and F. Dellaglio. 2007. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **8**:44–61

Gibson, G.R., H.M.Probert, J.H.Apajalahti, N.Rautonen, and J.Stowell. 2004. Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4505-11.

Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**:1401-1412.

Goh, Y.J. and T.R.Klaenhammer.2010. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:5005-12.

- Gómez, E., K.M. Tuohy, G.R. Gibson, A. Klinder and A. Costabile.**2010. *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans.J. Appl. Microbiol. **108**:2114-21.
- Greisen, K., M. Loeffelholz, A. Purohit and D. Leong.** 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. J. Appl. Microbiol. p. 335-351.
- Guarner, F. and J.R. Malagelada.**2003. Gut flora in health and disease.Lancet. **8**:361.
- Haarman, M. and J. Knol.** 2006. Quantitative real-time PCR analysis of fecal Lactobacillus species in infants receiving a prebiotic infant formula.Appl. Environ. Microbiol. **72**:2359-65.
- Harmsen, D. and H. Karch.** 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. ASM News **70**:19–24.
- Hijova, E., A. Chmelarova, A. Bomba and R. Zitnan.**2009. Prebiotic foodstuffs and their health benefits in experiment.Bratisl Lek Listy. **110**:523-5.
- Hutkins, R.** 2006. Cultured dairy products, p.107–114. *In* Microbiology and technology of fermented foods. Blackwell Publishing. Ames, Iowa.
- Iñiguez-Covarrubias, G., R. Díaz-Teres, R. Sanjuan-Dueñas, J. Anzaldo-Hernández and R.M. Rowell.**2001. Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: Potential value of Agave tequilana Weber azul leaves.Bioresour. Technol. **77**:101-8.
- Jernberg, C., A. Sullivan, C. Edlund and J.K. Jansson.** 2005. Monitoring of antibiotic-induced alterations in the human intestinal microflora and detection of probiotic strain by use of terminal restriction fragment length polymorphism. Appl. Environ. Microbiol.**71**:501-506.
- Jones, B.V.** 2010. The human gut mobile metagenome: A metazoan perspective.Gut Microbes. **1**:415-431
- Kaplan,H. and R.W. Hutkins.** 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. **66**:2682-4.

Kelly, G. 2008. Inulin-type prebiotics a review:part 1. *Altern. Med Rev.***13**:315-29.

Kheadr, E., N.Dabour, U.von Ah, C.Lacroix, L.Meile, and I.Fliss. 2007. Genetic and phenotypic diversity of *Bifidobacterium thermacidophilum* fecal isolates from newborns. *Can. J. Microbiol.***53**:1348-59.

Larsen N., F.K. Vogensen, R. Gøbel, K.F. Michaelsen, W. Abu Al-Soud, S.J. Sørensen, L.H. Hansen and M. Jakobsen. 2011. Predominant genera of fecal microbiota in children with atopic dermatitis are not altered by intake of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07.FEMS Microbiol. Ecol. **75**:482-96.

Ley, R.E., J.I. Gordon, M. Hamady and C. Lozupone. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**:1647-51

Lightfield, J., N.R.Fram and B. Ely. 2011. Across bacterial phyla, distantly-related genomes with similar genomic GC content have similar patterns of amino acid usage. *PLoS One.***16**:17677-85.

Lomax, A.R. and P.C. Calder.2009. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *Br. J. Nutr.* 101:633–658

López, M.G. and J.E. Urías-Silvas.2007. Agave fructans as prebiotics, p. 297–310. *In*Shiomi, N., Benkeblia, N. and Onedera, S. (ed.) Recent Advances in Fructooligosaccharides Research. Research Signpost.Kerala, India

Lovat, L.B. 1996. Age related changes in gut physiology and nutritional status. *Gut***38**: 306-9.

Makarova, K.S. and E.V. Koonin. 2006. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria.*J. Bacteriol.* **189**:1199-208.

Mancilla-Margalli, N.A. and M.G. Lopez.2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyllirion* species. *J. Agric. Food Chem.* **54**:7832–39.

Madigan, M., J. Martinko and J. Parker.2003. Brock: Biología de los Microorganismos.10a Ed., Editorial Pearson. España.

Mattia, A. and R.Merker. 2008. Regulation of probiotic substances as ingredients in foods: premarket approval or "generally recognized as safe" notification.*Clin. Infect. Dis.* **46**:115-8.

Maus, J.E. and S.C. Ingham. 2003. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* **95**:146-54.

Mayo, B., M. Ventura and D. van Sinderen.2008. Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid-Producing Bacteria: From Basics to Applications. *Curr. Gen.* **9**:169-83.

Meile, L., W. Ludwig, U. Rueger, C. Gut, P. Kaufmann, G. Dasen, S. Wengerand M. Teuber. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygentolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**:57–64.

Melo V. y O. Cuamatzi. 2006. Bioquímica de los procesos metabólicos. Reverté Ed. México. 1ra. Ed p. 54-60.

Meyer, D. and M. Stasse-Wolthuis. 2009. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eu. J. Clin. Nutr.* **63**:1277–289

Murray, P.R., E. Jo Baron, J. Jorgensen, M.A. Pfaller and M.L. Landry. 2007. *Manual of Clinical Microbiology.* ASM Press. 9th ed p.872-880.

Nava, G.M. and T.S. Stappenbeck. 2011. Diversity of the autochthonous colonic microbiota. *Gut Microbes.***2**:99-104.

Nikoleta R., N.M. Lugonja, O.B. Martinov, M.R. Rasovic, S.D. Spasic, G.D.Gojgic andM.M. Vrvic. 2010. A comparative investigation of an in vitro and clinical testof the bifidogenic effect of an infant formula. *J. Clin. Biochem. Nutr.***47**: 208–216.

Ouwehand, A. 2003. The probiotic potential of *Propionibacteria*, p. 159-74. *In* S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand (ed.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* 3ra ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Ouwehand, A., K. Tiihonen, M. Saarinen, H. Putaala and N.Rautonen. 2009. Influence of a combination of *Lactobacillus acidophilus*NCFM and lactitol on healthy elderly: intestinal and immuneparameters. *Brit. J. Nutr.***101**: 367–375.

Palframan, R.J., G.R.Gibson and R.A.Rastall. 2003. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Curr. Issues Intest. Microbiol.***4**: 71-5.

Pfister, P., M. Risch, D.E. Brodersen and E.C. Bottger. 2003. Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1496–1502.

Pfister, P., S. Hobbie, Q. Vicens, E. C. Bottger and E. Westhof. 2003. The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance: relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *ChemBiochem* **4**:1078–1088.

Reid, G., M.E. Sanders, H.R. Gaskins, G.R. Gibson, A. Mercenier, R. Rastall, M. Roberfroid, I. Rowland, C. Cherbut and T.R. Klaenhammer. 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* **37**:105-18.

Rigottier-Gois, L., A.GBourhis, G.Gramet, V.Rochet and J.Doré. 2003. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *Microbiol. Ecol.* **43**:237-45

Roberfroid, M.B.2007. Prebiotics: the concept revisited. 2. *J. Nutr.* **137**:830S-837S.

Roberfroid, M.B. 2007. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr.* **137**:2493S-2502.

Roberfroid M.B., J.A.Van Loo and G.R.Gibson. 1998. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *J. Nutr.* **128**:11-9.

Ruas-Madiedo, P., M. Gueimonde, M. Fernández-García, C.G. de los Reyes-Gavilán and A. Margolles.2008. Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:1936-40.

Sanders M.E. and T.R. Klaenhammer. 2001. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.* **84**:319-31.

Sela, D.A., J.Chapman, A.Adeuya, J.H.Kim, F.Chen, T.R.Whitehead, A.Lapidus, D.S.Rokhsar, C.B.Lebrilla, J.B.German, N.P.Price, P.M.Richardson and D.A.Mills.2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**:18964-9.

Sela, D.A., P.J. Neil, and D. Mills. 2009. Metabolism of Bifidobacteria, p. 45-69. *In* B. Mayo, y D. van Sinderen(ed.), Bifidobacteria: Genomics and molecular aspects 1st ed. Caister Academic Press Norfolk, UK.

Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.***83**:894-907.

Simpson, P.J., R.P.Ross, G.F.Fitzgerald and C.Stanton. 2004 *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.***54**:401-6.

Slováková, L., D.Dusková, and M.Marounek.2002.Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Lett. Appl. Microbiol.***35**:126-30.

Solano-Aguilar, G., H. Dawson, M. Restrepo, K. Andrews, B. Vinyard, and J. Urban Jr. 2008. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. *Appl. Microbiol.***74**:6338-6347.

Thorne, J.L., H. Kishino and I.S. Painter. 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.***15**:1647–1657.

Tortoli, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.***16**:319–354.

Tuohy, K.M. 2009. Commentary on 'Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence'. *Br. J. Nutr.***101**:631–632

Turróni, F., D. van Sinderen and M. Ventura.2010. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* In Press.

Turróni, F., A. Ribbera, E. Foroni, D. van Sinderen and M. Ventura. 2008. Human gut microbiota and Bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie Van Leeuwenhoek***94**:35-50.

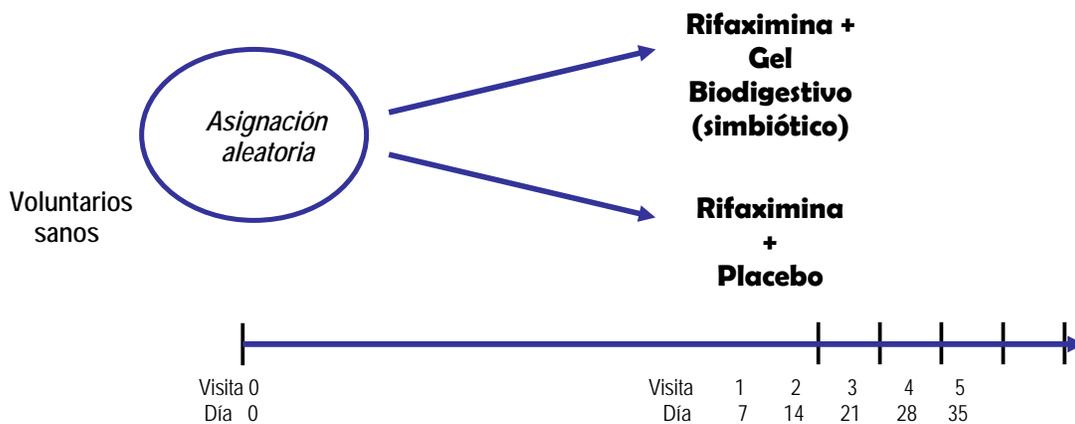
Ueno, K., Y. Ishiguro, M. Yoshida, S. Onodera and N. Shiomi.2011. Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). *Chem. Cent. J.***5**:16

- Vaughan, E.E., H.G.Heilig, K.Ben-Amor and W.M.de Vos.** 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *Annu. Rev. Microbiol.* **29**: 477-90.
- Vaughan, E.E. and M. Kleerebezem.** 2009. Probiotic and gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular approaches to study diversity and activity. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**:269–90.
- Ventura, M., C. Canchaya, A. Del Casale, F. Dellaglio, E. Neviani, G.F. Fitzgerald and D. van Sinderen.**2007. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:2783–2792.
- Ventura, M., C. Canchaya, A. Tauch, G. Chandra, G.F. Fitzgerald, K.F. Chater and D. van Sinderen.**2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**:495–548.
- Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221–271.
- Wolf, M., T. Muller, T. Dandekar and J.D. Pollack.** 2004. Phylogeny of Firmicutes with special reference to *Mycoplasma (Mollicutes)* as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:871-875.

ANEXO A

Protocolo experimental del estudio de Biogel simbiótico marca Ventro®

Diseño del estudio: Ensayo clínico aleatorio, controlado con placebo, doblemente a ciegas.



Para dicho estudio se utilizaron sujetos de ambos sexos, con edad entre 20 a 50 años sin historia de trastornos digestivos (diarrea, estreñimiento u otra patología intestinal como síndrome de colon irritable o enfermedad inflamatoria intestinal). Sin historia de padecimientos como obesidad, diabetes, distiroidismo, cirrosis hepática, insuficiencia renal y enfermedad neoplásica. Como uno de los fines del estudio es la evaluación de la reforestación de la biota intestinal los pacientes no deben de presentar tratamiento con antibióticos un mes como mínimo previo a la inclusión en el estudio.

Todo lo anterior fue comprobado bajo firma de consentimiento informado.

Se excluyeron a mujeres embarazadas o en lactancia, pacientes alérgicos a rifaximina o rifamicina, todo aquel paciente que no cumpla con las visitas será eliminado del protocolo.

El estudio tuvo dos grupos del mismo tamaño: **Grupo 1**: rifaximina más Gel Biodigestivo y **Grupo 2**: rifaximina más Placebo. Se estudiaron a 10 sujetos por grupo, ya que se requirió un mínimo de 5 sujetos por grupo para que sea estadísticamente representativa la muestra.

Cada voluntario sano participante fue seguido semanalmente durante 35 días.

CEPARIO.

El cepario realizado corresponde al protocolo del estudio de evaluación de biogel simbiótico en la repoblación de la microbiota intestinal.

Preparación de medios y reactivos.

Medio PBG, Agar MRS, Agar DP, Medio BHI, Agar MC y Agua peptonada con cisteína.

Inoculo de la muestra

El paciente debió colocar una muestra de materia fecal en el contenedor de PBG de aproximadamente 1g (es importante que la muestra no sea menor a 0.5g ni mayor a 2g) transportar en refrigeración al laboratorio donde será pesada y procesada. Las muestras que no cumplan con lo anterior serán descartadas.

Proceso

Para la homogenización de la muestra se colocó en una bolsa de stomacher estéril y se mezcló por un tiempo de 1 minuto, posteriormente se alícuota en crioviales de 1.5ml y se mantiene a 20°C de temperatura hasta su utilización.

Determinación de cuenta bacteriana.

Para la determinación de la cuenta bacteriana se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada, dichas soluciones se efectuaron de la siguiente manera:

Se tomaron 500µl del homogenizado de la muestra y se le agregan 4500µl de agua peptonada para obtener un total de 5ml de muestra la cual será nuestro punto de partida para comenzar las diluciones.

Posteriormente se realizaron 7 diluciones 1:10 añadiendo 500µl de muestra en 4500µl de agua peptonada y así consecutivamente. Fig.1

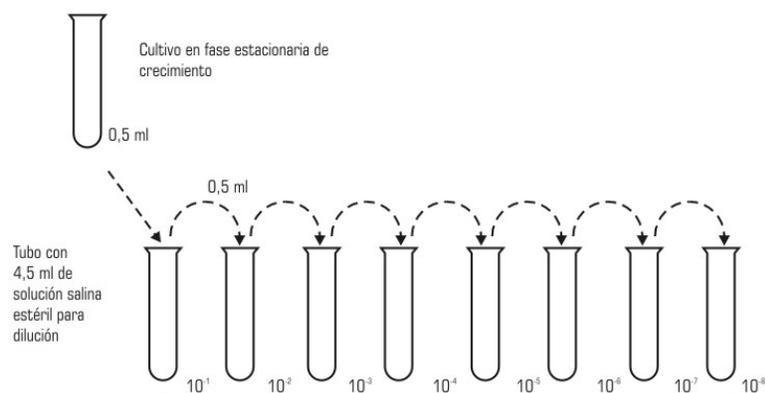


Fig. 1 Ejemplificación de diluciones seriadas (Brock 2008).

Una vez realizadas las diluciones se toman 100ml de cada dilución y se plaquean por extensión de superficie en medios de cultivo (DP, MRS, MC) incubándose a 37°C por 24h para el medio MC y a 37°C por 48h para medio DP y MRS en condiciones de anaerobiosis.

Transcurrido el tiempo de incubación se realiza una cuenta en placa para buscar el rango de UFC permitido según ISO (20-250 UFC) y se calculan UFC/g de heces.

Para los medios MRS y DP se realiza la cuenta bacteriana y se resemebraron las diferentes morfologías coloniales en sus respectivos medios. Se incubaron a 37C por 48h en anaerobiosis.

Determinación de posibles lactobacilos y bifidobacterias

Una vez incubados se observo el crecimiento en cada uno de los medios de cultivo realizando una tinción de Gram para cada colonia sospechosa.

Para la determinación de lactobacilos y bifidobacterias se realizo lo siguiente:

Medio MRS	Medio DP
<ul style="list-style-type: none"> • Bacilos G+ reconocidos como posibles lactobacilos. • Otras morfologías se reportaron como negativas • Colonias blancas lechosas 	<ul style="list-style-type: none"> • Morfología característica de bifidobacterias con bifurcaciones y un Gram variable. • Otras morfologías reportadas como negativas. • Colonias blancas, transparentes lechosas.

Posibles bifidobacterias y lactobacilos se resembraron masivamente en su correspondiente medio de cultivo, MRS para lactobacilos y DP para bifidobacterias a 37°C por 48h en condiciones de anaerobiosis. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se recolecta el crecimiento bacteriano en placa y se resuspende en viales de medio BHI y glicerina para su almacenamiento a -20°C hasta su próxima utilización.

Los viales son etiquetados con clave de laboratorio, medio del cual se recupero, número de colonia sospechosa y fecha.

ANEXO B

FORMULACIONES DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

El medio de tioglicolato líquido:

Formulación	g/L
Peptona de caseína	15.0
L- cisteína	0.25
Dextrosa anhidra	5.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	2.5
Resazurina	0.001
Tioglicolato de sodio	0.5
Agar	0.75
pH final: 7.1 ± 0.2	

Suspender 24 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Dispensar en tubos, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C (15libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar los tubos a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Almacenar con las tapas bien cerradas. Se recomienda mantenerlos a temperatura ambiente antes de utilizarlos.

Se observa que las bacterias estrictamente aerobias crecen en la parte superior, mientras que las anaerobias facultativas o anaerobias estrictas crecen en las profundidades del medio, al contener cisteína el medio brinda una atmósfera reductora por lo que el tubo de ensayo puede incubarse sin la necesidad de una jarra de anaerobiosis, la peptona y caseína proporcionan la fuente de nitrógeno, el extracto de levadura otorga vitaminas mientras que el cloruro de sodio permite mantener la presión osmótica. La resazurina actúa como un indicador de óxido-reducción, que es de color rosado fucsia en presencia de oxígeno.

El medio DP (Dicloxacilina-Acido Propiónico) contiene la siguiente formulación:

Formulación	g/L
Agar Columbia	42.0
Glucosa	5.0
Clorhidrato de cisteína	0.5
Acido Propionico	5.0 ml
Dicloxacilina al 0.2%	1.0 ml
pH final 6.8 ± 0.2	

Se resuspenden el agar Columbia y el clorhidrato de cisteína en 950 ml de agua destilada, calentar a ebullición por 1 ó 2 minutos.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Una vez esterilizado dejar enfriar a 40- 45 °C aproximadamente y añadir por filtración el antibiótico y la glucosa disuelta en 40 ml de agua.

Por ultimo se añade el acido propiónico y se ajusta el pH 6.8 ± 0.2 con solución de NaOH 5 molar.

Este medio posee agar Columbia el cual combina peptona, tripteína, extracto de levadura y extracto de corazón, que favorecen el desarrollo de microorganismos exigentes y la obtención de colonias eugónicas. Por otro lado este medio permite la incorporación de antibióticos haciéndolo selectivo, al contener cisteína favorecemos un ambiente reductor, ideal para el crecimiento de Bifidobacterias.

Medio MRS (de Man, Rogosa, Sharpe)

Formulación	g/L
Proteasa peptona No. 3	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agar	13.0
pH final: 6.4 ± 0.2	

Suspender 64 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. Se incuba por 48 h a 37°C en condiciones de anaerobiosis.

Medio MAC CONKEY

Formulación	g/L
Peptona	17.0
Pluripeptona	3.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
pH final: 7.1±0.2	

Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva.

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Se incuba a 37°C por 24h o 48h dependiendo del crecimiento en condiciones de aerobiosis.

Si el medio se sembró en para fines de semana las cajas se pueden dejar a temperatura ambiente por 72h.

