



Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.

**Identificación de especies de Bifidobacterias aisladas
de ratas *Sprague Dawley* con inflamación intestinal y
alimentadas con inulina de *Agave tequilana* Weber var.
Azul.**

Por:

L.C.Q. Cynthia Luévano Martínez

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACION DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS

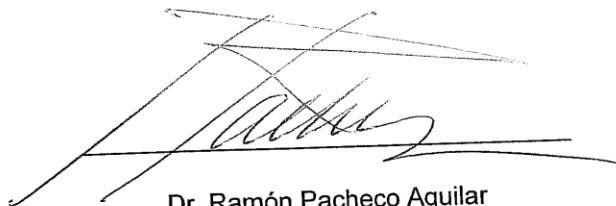
Hermosillo, Sonora.

Diciembre, 2010.

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar

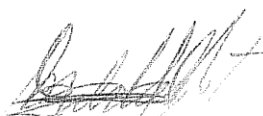
Director General

APROBACIÓN


Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de Cynthia Luévano Martínez, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



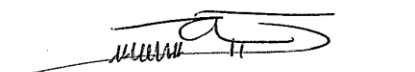
Dra. Evelia Acedo Félix
Directo de Tesis



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Asesor



Dra. Luz Vázquez Moreno
Asesor



M. C. Alfonso García Galaz.
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al CONACYT por el apoyo prestado para la realización de este proyecto.

Gracias al CIAD, AC. por el apoyo para realizar este trabajo y facilitar todas sus instalaciones, por el uso del bioterio (algo muy necesario) y a todo su personal (administrativo, limpieza, los guardias, al personal de biblioteca).

Agradecimiento al proyecto CB-01-2007-82985 "Estudios proteómicos en suero de ratones tratados con prebióticos como efecto protector contra la inflamación intestinal", de la Dra. Gabriela Ramos-Calmont Monfort, por el apoyo financiero del presente trabajo.

A la Dra. Evelia por el apoyo que me brindo durante la realización de este trabajo, por todo aquello que aprendí de ella, por su comprensión por animarme y sobre todo por su paciencia.

A las Dra. Gaby y Luz por aportaciones y sugerencias que me ayudaron en la redacción del escrito.

A Alfonso por sus valiosas sugerencias y por tantas preguntas que me hizo que me ayudaron a comprender muchas cosas y por todo lo que aprendí de él en las clases y en el laboratorio.

A Miriam Lorena (Lore), mi hermana y mi mejor amiga, que siempre me apoyo y se preocupo por mí. Por sus consejos, por estar cuando la necesitaba y aun que veces me sacaba de quicio, la mayor parte del tiempo me hacía reír, por ser como es y entenderme.

A mis padres, Rubén Luévano y Alma L. Martínez, que siempre me apoyan en lo que hago, que me animan, aconsejan y por que se que siempre están cuando los necesito.

A mis hermanos Rubén y Luis Ángel y mi Hermana Laura L. que siempre me alientan, animan a dar lo mejor.

A Margarita por ser una gran amiga desde el principio de mi llegada a Hermosillo, por su apoyo y comprensión. A mis amigos Priscilia, Bertha, Lucina, Gaby, David, Blanca y Rita por ayudarme y apoyarme.

A Ana María Domínguez, que fue mi compañera de trabajo en la realización del experimental, que me apoyo y me acompañó durante todo ese tiempo y por enriquecer mi vida personal y profesional.

A Rosalva por su gran ayuda y guía en el experimental, por su apoyo y por ayudarme en tener el material de laboratorio cuando lo necesitaba.

A todos los miembros de LACMA y los que trabajan en el laboratorio de Microbiología, Isabel, Betel, Germán, Alejandra, Maritza y Blanca por su apoyo, ayuda y amistad.

A mis compañeros de generación y amigos, Rosina, Linda, Jorge, Hugo, Yudith y Fatima y que aunque no conviví mucho con ellos, fueron un gran apoyo durante el tiempo que estuve en Hermosillo.

A todos mis maestros del CIAD, por todo lo que enseñaron y por su apoyo en las clases y fuera de ellas.

Dedicatoria

A mis padres, mis hermanas y hermanos, porque siempre es divertido estar con todos ellos.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS _____	i
<i>Dedicatoria</i> _____	iii
CONTENIDO _____	iv
Lista de Figuras _____	vi
Lista de Tablas _____	viii
RESUMEN _____	ix
1. INTRODUCCIÓN _____	1
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN _____	4
2.1. Tracto gastrointestinal. _____	4
2.1.1. Función inmune del tracto gastrointestinal. _____	4
2.2. Microbiota intestinal. _____	5
2.2.1. Principales funciones de la microbiota intestinal. _____	6
2.2.2. Interacciones de la microbiota del tracto gastrointestinal con el hospedero. _____	7
2.3. Bifidobacterias. _____	9
2.3.1. Aislamiento e Identificación de <i>Bifidobacterium</i> . _____	9
2.3.2. Caracterización de <i>Bifidobacterium</i> por Técnicas Moleculares. _____	11
2.3.2.1. Secuenciación del gen para la región 16S del ribosoma. _____	13
2.3.2.2. Hibridación. _____	14
2.3.2.3. PFGE. _____	15
2.3.3. Metabolismo de los carbohidratos por Bifidobacterias. _____	16
2.4. Probióticos. _____	17
2.4.1. El uso de probióticos en humanos y animales. _____	19
2.5. Prebióticos. _____	22
2.5.1. Galactooligosacáridos. _____	24
2.5.2. Fructooligosacáridos. _____	25
2.5.3. Inulina. _____	27
2.5.3.1. Fuente principal de inulina. _____	28
2.5.3.2. Metabolismo de inulina y fructooligosacáridos. _____	29
2.5.4. Experimentación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en presencia de prebióticos. _____	31
2.6. Agaves. _____	32

CONTENIDO (Continuación)

	Página
2.6.1. Estudios realizados con inulina de agave como prebióticos. _____	34
3. HIPOTESIS _____	36
4. OBJETIVO GENERAL _____	36
4.1. Objetivos particulares _____	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS _____	37
5.1. Animales de experimentación _____	37
5.1.1. Tratamientos. _____	39
5.2. Análisis microbiológico. _____	40
5.3. Caracterización de <i>Bifidobacterium</i> por técnicas moleculares. _____	42
5.3.1. Extracción de ADN cromosómico. _____	42
5.3.2. Amplificación del Gen <i>xfp</i> . _____	42
5.3.3. Amplificación del Gen 16S (rRNA). _____	43
5.3.4. Secuenciación. _____	43
5.4. Diseño de experimentos. _____	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	45
6.1. Desarrollo de las ratas <i>Sprague Dawley</i> durante el experimental. _____	45
6.1.1. Tratamiento con DSS. _____	48
6.2. Análisis microbiológico. _____	51
6.3. Caracterización de las cepas obtenidas por técnicas moleculares. _____	57
6.3.1. Análisis de las Secuencias. _____	59
6.3.2. Agrupamiento de cepas _____	67
7. CONCLUSIONES _____	69
8. BIBLIOGRAFÍA _____	70
9. ANEXOS. _____	79
9.1. Preparación de Agar TOS propionato pH 6 ± 0.2 . _____	79
9.2. Extracción de ADN cromosómico (Marmur). _____	80
9.3. Amplificación del Gen F6PPK por PCR. _____	81
9.4. Amplificación por PCR del RNAr 16S (completo). _____	81

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Ruta metabólica de los carbohidratos por la acción de la enzima de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa/Fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (X5P/F6P) de las bifidobacterias.	18
2	Estructura química de Galactooligosacáridos (GOS).	25
3	Estructura química de inulina y Fructooligosacáridos (FOS).	26
4	Planta de achicoria, de cuyas raíces se extrae la mayor parte de la inulina comercial.	29
5	<i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul.	33
6	Estructura básica de los fructanos de agave.	34
7	Diseción de las ratas para la toma de muestras de heces intestinales y observación de los daños de intestinos.	38
8	Estructura química del compuesto dextran sulfato de sodio.	39
9	Inicio de las dietas 4° día. Formación de los grupos, 3 dietas, A y D (Inulina), B y E (FOS/GOS), C y F (celulosa, control), los grupos D, E y F, se les dio tratamiento con DSS al 3% (verde).	39
10	Días de sacrificio de las ratas, para realizar el análisis citológico y microbiológico (cuadros marcados en rojo) y la duración del tratamiento con DSS (cuadros marcados en verde).	40
11	Heces características según la dieta.	46
12	Diseción de los ratones en el día 4 del experimental. A, rata alimentada con inulina de agave; B, rata alimentada con FOS/GOS y C, rata control.	48
13	Diseción ratas a los 17 días del tratamiento. D, rata alimentada con inulina y DSS al 3.0%; E, rata alimentada con FS/GOS y DSS al 3.0%; F, rata control alimentada con celulosa y DSS al 3.0%.	50

Lista de Figuras (continuación)

Figura		Página
14	Tinción Gram de control (izquierda, <i>Bifidobacterium animalis</i>) y muestra de bifidobacterias (derecha, cepa 2-C1S11), formas características de bifidobacterias encerradas en círculos azules.	52
15	Colonias características de Bifidobacterias, aisladas en el medio TOS, de los animales del estudio.	53
16	Cuenta de Bifidobacterias obtenidos para cada uno de los grupos de estudio. Parte superior del gráfico se muestran las cuentas bacterias de los grupos A, B y C: en la parte inferior, los grupos D, E y F, tratadas con DSS al 3%.	54
17	Muestras positivas de Bifidobacterias, 1-7, 9, control 10 (<i>Bifidobacterium lactis</i>); M, marcador de peso molecular (100 pb ladder).	58
18	Amplificación de un fragmento 1500 pb del Gen 16S para la secuenciación, muestras 1-9, control 10 (<i>Bifidobacterium lactis</i>); M, marcador de peso molecular (100 pb ladder).	59
19	Ejemplo de los archivos de las secuencias. Los datos pertenecen a la cepa 34 y que fue identificada como <i>B. animalis</i> subsp <i>animalis</i> .	61
20	Agrupamiento filogenético construido con el método NJ, de las secuencias del fragmento de 575 pb del ARNr 16S, de las bacterias aisladas del TGI de ratas. Los valores del bootstrap, representan el porcentaje de 1000 replicaciones.	68

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Evolución del concepto de probiótico según las investigaciones realizadas.	20
2	Composición de dieta AIN93G.	37
3	Identidad de las especies de <i>Bifidobacterium</i> spp., aisladas del TGI de las ratas, alimentadas con diferentes dietas.	62

RESUMEN

Los prebióticos son carbohidratos no digeribles por las enzimas del tracto gastrointestinal humano, que benefician al huésped estimulando selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas o probióticas. Las bifidobacterias se encuentran dentro del grupo de bacterias probióticas y su desarrollo se ve favorecido en presencia de oligo- o poli-sacáridos, como galactooligosacáridos (GOS) fructooligosacáridos (FOS) e inulina. Una fuente importante de inulina son los Agaves ya que tienen un alto contenido de este polisacárido, como carbohidrato de reserva. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto bifidogénico de la inulina del *Agave tequilana* var. Azul, en ratas *Sprague Dawley* sanas y con colitis inducida con dextran sulfato de sodio (DSS) al 3%, además identificar las especies de bifidobacterias presentes en el contenido intestinal de las ratas. El experimental fue de 25 días, con 6 grupos de ratas alimentadas con diferentes dietas, donde la variable fue el contenido de fibra (5%). Dietas A y D con inulina de agave, dietas B y E una mezcla 1:1 de GOS/FOS y dietas C y D celulosa, a partir del día 4 y a los 8 días de alimentación con las dietas de los tratamientos (día 12 del experimental), se inició la administración del DSS al 3% (grupos D, E y F), por 3 días para inducir la inflamación. Durante los días 4, 10, 19, 22 y 25 se tomaron las muestras fecales para el análisis de las cuentas de bifidobacterias totales y la identificación de especie, por técnicas moleculares, mediante el PCR del gen *xfp* y secuenciación de un fragmento del gen 16S del operon ribosomal. Se observó que tanto la inulina de agave como la mezcla de FOS/GOS, presentaron efecto bifidogénico, en comparación con la celulosa. Las ratas alimentadas con inulina de agave, mostraron una recuperación más rápida de la inflamación intestinal inducida y un aumento en la población total de bifidobacterias, que aquellas alimentadas con FOS/GOS. Mientras que éste último grupo, pero con inflamación intestinal, no presentaron recuperación y se observó una disminución en la población de bifidobacterias. En total, se

recuperaron 32 cepas que mostraron la presencia del gen *xfp* y mediante la secuenciación sólo 30 fueron del género *Bifidobacterium*, siendo las especies predominantes *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium pseudolongum*.

1. INTRODUCCIÓN

Los conceptos de probióticos y prebióticos han sido modificados conforme han avanzado las investigaciones y se han dado a conocer los beneficios que ambos aportan a la salud de los animales. Los probióticos son microorganismos vivos, que administrados en cantidades adecuadas confieren o brindan al hospedero un efecto positivo en su salud (FAO/WHO. 2001). Los prebióticos son, carbohidratos no digeribles por las enzimas del tracto gastrointestinal, que benefician al huésped por la estimulación selectiva del crecimiento de bacterias benéficas (Gibson y Roberfroid, 1995) y en el 2007 la FAO los define como un componente alimenticio no viable que confieren un efecto benéfico al hospedero lo cual está asociado con la modulación de la microbiota. Se ha determinado que ambos juegan una función importante en la salud del huésped, principalmente protegiéndolo contra enfermedades intestinales como colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn y su acción antagónica contra bacterias patógenas. Además, probióticos y prebióticos ayudan a mantener la buena salud de la microbiota normal del tracto gastrointestinal (Graeme *et al.* 1999; Kalliomaki, 2003). Sin embargo, aún es poco el conocimiento acerca del impacto en la salud del huésped por el consumo de algunos carbohidratos complejos, sobre las poblaciones de bacterias con potencial probiótico en el tracto gastrointestinal, como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Kleessen *et al.* 1994; 1997; Rossi *et al.* 2005).

Las bifidobacterias son un grupo importante de bacterias que pueden desarrollarse adecuadamente en presencia de oligo- o poli-sacáridos, como los galactooligosacáridos (GOS), fructooligosacáridos (FOS) y la inulina (Amaretti *et al.*, 2007). Los carbohidratos utilizados comercialmente como sustituto del azúcar es la inulina, que es extraída de la raíz de achicoria (Debruyne *et al.*, 1992). Las principales fuentes comerciales de inulina son las raíces carnosas de

Dahlia spp. y *Chicorium intyvus* L. (achicoria) (Machado *et al.*, 1998). La inulina también puede obtenerse de plantas desérticas como el *Agave* spp. El agave es utilizado principalmente para la elaboración de bebidas alcohólicas; sin embargo, su alto contenido de inulina, también podría aprovecharse como prebiótico (Urías-Silvas y López, 2004). Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* (modelos animales) con inulina proveniente de diferentes fuentes, han demostrado que producen beneficios a la salud de hospederos animales sanos y enfermos (Bouhnik *et al.*, 1997; Urías-Silvas, 2004; Amaretti *et al.*, 2007). Sin embargo, todas las bacterias residentes del tracto gastrointestinal se comportan y desarrollan según su ambiente y nutrientes con los que cuenta en su entorno (Wang y Gibson, 1993; Nielsen *et al.*, 2003). Se ha observado que las especies de bifidobacterias y lactobacilos, presentan diferentes comportamientos de acuerdo al tipo de prebiótico que consume el huésped (Rossi *et al.*, 2005). Por lo anterior es importante determinar cómo reaccionan estos microorganismos en presencia de inulina.

Actualmente se siguen desarrollando formulaciones simbióticas constituidas por probióticos y prebióticos para el consumo en humano y animales. Las etiquetas de productos indican que contienen una cierta cantidad de bacterias probióticas “vivas”, pero por las condiciones en las que se encuentran dichos productos gran porcentaje de éstas ya no son viables. Además, aquellas que llegan a sobrevivir el tiempo de almacenamiento, no sobreviven al paso del tracto gastrointestinal para llegar vivas al colon. Por ello es factible como alternativa utilizar los prebióticos para estimular el crecimiento de las bifidobacterias autóctonas del hospedero (Roberfroid *et al.* 1998).

La inulina del agave es un compuesto poco estudiado desde el punto de vista de sus efectos prebióticos. El hecho de que su estructura sea ramificada y no lineal, como la de la inulina de achicoria podría influenciar su efecto prebiótico. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto bifidogénico de la inulina del *Agave tequilana* administrada a través de la dieta en ratas *Sprague*

Dawley tanto en animales sanas como en aquellos con inflamación intestinal inducida, e identificar las especies de bifidobacterias aisladas a partir de las heces. Además, hacer una comparación entre las diferentes dietas utilizadas, una con inulina de *Agave tequilana*, otra con una mezcla de FOS/GOS obtenida de una fuente comercial y otro con celulosa como control.

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

2.1. Tracto gastrointestinal.

El aparato digestivo es un tubo altamente especializado, dividido en diferentes regiones anatómicamente bien definidas que se extiende desde los labios, hasta el ano (Rouvière, 2001). También es llamado tubo digestivo, canal alimentario o tracto gastrointestinal y es un sistema de órganos en animales multicelulares, encargado de digerir los alimentos, con el fin de extraer los nutrientes para la demanda metabólica del organismo y expulsar los residuos que quedan. En general, se pueden resumir las funciones del tracto gastrointestinal en: ingestión, digestión, absorción y excreción. El tracto gastrointestinal difiere sustancialmente de una especie a otra; algunas especies tienen estómago con varias cámaras, mientras que otros animales tienen estómagos que contienen una sola cámara (König, 2005; Rouvière, 2001). En un humano adulto normal, el tracto gastrointestinal mide aproximadamente de 11 a 12 m de largo y se divide en la porción superior y la inferior. El tracto gastrointestinal superior está compuesto por la boca, la faringe, el esófago y el estómago, mientras que el inferior comprende el intestino delgado, intestino grueso y ano. El intestino delgado consta de tres partes, duodeno, yeyuno e íleo (ileon) y el grueso, constituido por ciego, colon (ascendente, transverso, descendente y sigmoide), el recto y ano. Para realizar sus funciones de digestión, cuenta con los órganos accesorios: hígado, vesícula biliar y páncreas (Mackie *et al.*, 1999).

2.1.1. Función inmune del tracto gastrointestinal.

El tracto gastrointestinal, es también una parte importante del sistema inmune, cuya actividad protectora se produce de varias formas. El pH bajo del estómago (entre 1-4) es letal para muchos microorganismos que llegan al

estómago. El contenido de IgA del mucus (mucosa intestinal), neutraliza muchos de los microorganismos resistentes al ácido que son ajenos a la microbiota normal del hospedero. Otros factores en el tracto intestinal que ayudan con la función inmune incluyen enzimas líticas en la saliva y la bilis, así como algunas enzimas detoxificantes que utilizan el intestino para la neutralización de xenobióticos y drogas. Las bacterias intestinales que mejoran la salud, sirven para prevenir el sobre crecimiento de bacterias potencialmente patógenas en el intestino. Así mismo, el tejido linfoide asociado con el intestino, permite controlar los niveles de microorganismos presentes (O'Hara y Shanahan, 2006).

2.2. Microbiota intestinal.

Un gran número de bacterias se han adaptado, para crecer en el intestino del humano y de los animales. El intestino del ser humano contiene entre 300 y 500 diferentes especies de microorganismos, las cuales en términos absolutos representan un total de células 10 veces mayor que todas las células eucariotas del cuerpo humano (Simon y Gorbach, 1984; Bengmark, 1998). El estómago y el intestino delgado contiene una población menor de bacterias adheridas en el epitelio en comparación con el intestino grueso; esto es por el tipo de ambiente hostil del medio, debido a la presencia del ácido estomacal, bilis y secreciones pancreáticas. Por el contrario en el intestino grueso se encuentra un complejo y dinámico ecosistema microbiano (Guarner y Malagelada, 2003).

La salud de cualquier huésped puede ser afectada solo con algunos cientos de bacterias vivas que colonizan el intestino. Algunas de estas bacterias son potencialmente patógenas y pueden causar algún tipo de infección o inflamación. Sin embargo la interacción que existe entre el hospedero y la microbiota normal ayuda a mantener alejados a aquellos microorganismos que

puedan provocar el deterioro de la salud intestinal del huésped humano o animal (Kitajima *et al.*, 2001).

2.2.1. Principales funciones de la microbiota intestinal.

La evidencia obtenida a través de diferentes estudios sugiere que la microbiota tiene funciones tróficas, de protección y metabólicas. Las funciones tróficas se refieren al control de la diferenciación y proliferación de las células epiteliales intestinales (colonocitos), además del desarrollo y homeostasis del sistema inmune. La protección contra patógenos, es un efecto de barrera en el tracto gastrointestinal, donde la presencia y modos de acción (competencia por nutrientes, factores antagónicos, entre otros) de las bacterias benéficas, es crucial para mantener el equilibrio entre especies. Algunas de las funciones metabólicas más importantes de la microbiota intestinal en el humano es la fermentación de carbohidratos no digeribles y la síntesis de algunas vitaminas (K, B12), ya que el hospedero carece de las rutas bioquímicas y/o del desarrollo de varias enzimas necesarias para dichos fines (Roberfroid *et al.*, 1995). La microbiota intestinal utiliza carbohidratos no digeribles por el humano que incluyen polisacáridos de cadenas largas (pectinas o gomas), algunos oligosacáridos (GOS, FOS) y polisacáridos como la inulina. El metabolito final de la fermentación de estos últimos son ácidos grasos de cadena corta (Roberfroid *et al.*, 1995).

En el tracto gastrointestinal, al inicio de la vida, existe un predominio de microorganismos aeróbios o anaeróbios facultativos (*Enterobacteriaceae* y *Lactobacillus*), pero posteriormente empieza a desarrollarse la población de bacterias anaerobias estrictas (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, etc.), hasta que se establece una microbiota definida. La composición de la microbiota fecal depende de diversos factores y, entre ellos, especialmente del tipo de alimentación (Sans *et al.*, 2006).

2.2.2. Interacciones de la microbiota del tracto gastrointestinal con el hospedero.

La microbiota intestinal ha sido considerada como uno más de los “órganos accesorios” del tracto gastrointestinal por diferentes autores (Guarner, 2007; O’Hara y Sanahan, 2006). El intestino humano alberga una comunidad diversa de bacterias que se encuentran en una relación de simbiosis con el huésped, de tal manera que dichas bacterias influyen permanentemente en la fisiología, estructura y funciones del intestino (Rath y Sartor, 1999). Se ha demostrado que las interacciones bacteria-hospedero en la mucosa del intestino, desempeñan un papel muy importante en el desarrollo y regulación del sistema inmune mucosal. Si esta interacción no es la adecuada, la homeostasis entre la carga antigénica ambiental y la respuesta del individuo puede fallar, lo que repercute en el desarrollo de patologías autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal, mismas que pueden llegar a convertirse en inflamaciones crónicas (Guarner, 2002; O’Hara y Sanahan, 2006). Tal es el caso de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (Sartor, 2004).

En la enfermedad de Crohn, el sistema inmune del individuo ataca a su propio intestino, produciendo una inflamación. En esta enfermedad los linfocitos T intestinales son hiper-reactivos contra los antígenos bacterianos; frecuentemente se presenta en el íleon o el tramo final del intestino delgado. Por otro lado la colitis ulcerosa se caracteriza por la inflamación y ulceración de la pared interna del colon y del recto, donde puede presentar diarrea, algunas veces con sangre y con frecuencia dolor abdominal. Se ha observado que ambas enfermedades muestran un incremento en la secreción de anticuerpos tipo IgG en la mucosa intestinal, en contra de una gama de bacterias comensales. La respuesta inmuno-inflamatoria mediada por IgG puede dañar la mucosa intestinal, al contrario de la respuesta normal de las IgA, que activan los complementos y la cascada de mediadores inflamatorios. También se ha observado que pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales tienen una

mayor cantidad de bacterias patógenas adheridas a la superficie epitelial intestinal que las personas sin dichos padecimientos (Kitajima *et al.*, 2001).

La relación que existe entre las alteraciones de la microbiota intestinal y la colitis ulcerosa aun no se conoce, en relación a nivel humano. Sin embargo, estudios con modelos animales sugieren que la microbiota normal interviene en la inflamación de la mucosa intestinal al disminuirla (Mutsunori, *et al.*, 2003). Uno de los métodos más comunes para la inducción de una inflamación intestinal (Venkatraman, 2000) es mediante la utilización de dextran sulfato de sodio (DSS). Éste es un polisacárido formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces α -D (1-6), contiene aproximadamente 17% a 20% de S (azufre), 3 ó 4 grupos sulfato por molécula de glucosa y su masa molecular se encuentra entre 4,000 a 500,000 Da (Porter, 2004). El DSS es un compuesto soluble en agua y además es dulce, por ello es adecuado y fácil de utilizar para fines de investigación. En un estudio determinaron el efecto que causaba el DSS en una solución al 4%, la cual se administró a ratas adultas (200 g), esto por vía oral durante 7 días. Observaron que a los 2 días después del tratamiento con DSS se manifestó la inflamación en la superficie del intestino, además notaron que la permeabilidad de los colonocitos se vio incrementada (Venkatraman, 2000).

Al inducir o provocar algún tipo de enfermedad o padecimiento, se puede determinar si un tratamiento es capaz de controlar o disminuir el grado de la afección que se contrajo. Se han utilizado antibióticos de amplio espectro en ratas y ratones, y aunque inicialmente se observa una disminución de la inflamación intestinal, el uso prolongado de los mismos genera resistencia bacteriana. También se han sugerido estrategias, como la administración de probióticos, a través de los alimentos para ver su efecto en la disminución de una inflamación intestinal (Klijn, *et al.*, 2005).

2.3. Bifidobacterias.

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo con numerosas especies bacterianas. Se han aislado cepas del tracto gastrointestinal del ser humano como las bifidobacterias, que son de las primeras especies en colonizar dicho tracto y que desempeñan un papel importante en el adecuado desarrollo del intestino (Klijn, *et al.*, 2005). Las bifidobacterias son microorganismos Gram positivos, anaerobios estrictos, sacarolíticos, heterofermentativos, no móviles, sin esporas que producen ácido acético y láctico a partir de la fermentación de los carbohidratos. En su morfología microscópica se pueden encontrar en largas cadenas, en agregados con forma de estrella o solas en forma de “V”, de ahí su nombre Bifido. Su forma puede variar dependiendo de la especie, del medio de cultivo, las condiciones en las que se encuentre y la fase de crecimiento. A la fecha existen 38 especies y 9 subespecies validadas como bifidobacterias (Euzéby, 2010).

Las bifidobacterias se encuentran en mayor concentración en el segmento final del intestino delgado (íleon) y en el intestino grueso, formando parte de la microbiota normal. Se caracterizan por inhibir el crecimiento de bacterias patógenas mediante varios mecanismos, como es la reducción del pH del tubo digestivo y la producción de algunos metabolitos con actividad antibacteriana (Collado y Sanz, 2007). También estimulan al sistema inmune, ya que inducen la proliferación de monocitos, la fagocitosis por macrófagos, el desarrollo de inmunidad celular y la modulación de la autoinmunidad (Lenoir-Wijnkoop *et al.*, 2007).

2.3.1. Aislamiento e Identificación de *Bifidobacterium*.

Las bifidobacterias fueron aisladas por primera vez en 1899 por Tissier, a partir de heces en animales recién nacidos. Sin embargo, son una comunidad

bacteriana difícil de cuantificar mediante técnicas de cultivo, debido a las condiciones requeridas para su crecimiento y desarrollo. Recientemente, se han reportado algunas técnicas para el conteo viable utilizando medios selectivos desarrollados específicamente para este género. Rada (1997) realizó pruebas de susceptibilidad para 24 especies de bifidobacterias y 16 especies de lactobacilos; las 30 especies se obtuvieron de diferentes tipos de fuentes (heces de humano, ratón, rata, gallina, de leche fermentada, etc.) con mupirocina (200 µg por disco) y metronidazol (50 µg por disco) por el método de difusión con discos. Las 24 especies de bifidobacterias fueron resistentes a la mupirocina, mientras que los 16 lactobacilos fueron susceptibles. Se realizó un estudio por Simpson *et al.* 2003 en el cual utilizaron diferentes cepas de probióticos (bifidobacterias, lactobacilos, lactococos, estreptococos, enterococos, etc.) para alimento en animales. Al medio de cultivo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) adicionaron algunos suplementos para ayudar al crecimiento de las bifidobacterias y de igual manera poder inhibir el crecimiento de las otras especies de bacterias presentes. En este estudio los suplementos adicionados de L-cisteína (0.5 g/l) y mupirocina (0.05 µg/l), dieron mejores resultados para la cuantificación de *Bifidobacterium* spp., en conjunto con el medio MRS. Además, con la combinación de mupirocina y L-cisteína, ayudaron a distinguir notoriamente las colonias de bifidobacterias por su tamaño, las cuales median >1 mm, en comparación con otras cepas como *Enterococcus* que median < 0.5 mm de diámetro.

En la respiración anaerobia de las bifidobacterias, el último aceptor de electrones es un elemento diferente al oxígeno (sustancia oxidante distinta), el cual puede ser a partir de glucosa, aminoácidos o triglicéridos. La L-cisteína es un aminoácido no esencial para el humano, tiene un grupo tiol (-SH), el cual es no polar, por ello es hidrofóbico y es susceptible a la oxidación (actuando como agente reductor) formando puentes disulfuros. La L-cisteína es un sustrato del cual se parte, como posible aceptor de electrones en la respiración anaerobia, donde reduce el potencial de reducción, así contribuye a la generación de un

sistema anaerobio (bajas concentraciones de oxígeno) el cual es propicio para el desarrollo de bifidobacterias. Por otro lado, el medio TOS (agar propionato Transoligosacáridos) contiene galactooligosacáridos como fuente de carbono y se ha reportado como altamente específico para el desarrollo de bifidobacterias, por lo que se considera una opción adecuada para ser utilizada en la cuantificación mediante el cultivo en placa (Thitaram et al., 2005).

En un estudio realizado por Heredia (2010), se aislaron 60 cepas de bacterias anaerobias, ácido lácticas, del tracto gastrointestinal de cerdos, utilizando medios tradicionales de cultivo a base de galactooligosacáridos (Medio TOS-propionato). El enriquecimiento selectivo, previo al aislamiento, se realizó en caldo MRS, adicionado con mupirocina (75 µg/ml). La selección de las bacterias y la diferenciación primaria se llevó a cabo mediante la técnica de ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), para posteriormente identificar las bacterias mediante secuenciación de un fragmento de la subunidad pequeña del operón ribosómico (ADNr 16S). Se lograron aislar e identificar dos especies de *Bifidobacterium*: *B. thermophilum* y *B. thermoacidophilum*. Se aislaron también las especies de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus ruminis*. Por lo que el medio TOS en conjunto con la mupirocina y la L-cisteína se obtienen los resultados indicados para la determinación del género *Bifidobacterium*.

2.3.2. Caracterización de *Bifidobacterium* por Técnicas Moleculares.

En la actualidad no es suficiente con determinar únicamente las características fenotípicas de las bacterias aisladas en un estudio, ya que la expresión del fenotipo se ve afectada por las condiciones ambientales (como las de cultivo), por lo que existe el riesgo que en un mismo medio, diferentes géneros expresen fenotipos (características) similares. Debido a lo anterior, se sugiere que las técnicas microbiológicas tradicionales se complementen con

técnicas moleculares, es decir, caracterizaciones polifásicas, las cuales son más completas y precisas. Existe una gran cantidad de técnicas moleculares utilizada para caracterizar a las bifidobacterias, las cuales han mostrado diferentes grados de resolución para el agrupamiento, caracterización y/o identificación (Vandame *et al.*, 1996).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una de las más utilizadas es la PCR, esta técnica consiste en amplificar un segmento del ADN, específico para el género del microorganismo generando de miles a millones de copias o amplicones. Las bifidobacterias utilizan una ruta metabólica característica para la utilización de los carbohidratos. Las bifidobacterias contienen dos tipos de fosfoctolosas, la Fructosa-6-fosfato (F6P) una enzima específica (F6PPK) en especies presentes en humanos como *B. dentium* y otra que se encuentra en especies de la microbiota de animales como *B. globosum* la cual está dividida en D-xilulosa-5-fosfato fosfoctolasa y Fructosa-6-fosfato fosfoctolasa (X5P/F6P) (Sgorbati *et al.*, 1976). Estas enzimas son codificadas por el gen *xfp*, descrito por primera vez para *B. animalis* subsp. *Lactis* (Meile *et al.*, 2001). Así, este tipo de fosfoctolosas se describen como enzimas clave de la ruta metabólica de bacterias ácido lácticas heterofermentativas y homofermentativas facultativas y de bifidobacterias por la D-Fructosa-6-fosfato (F6P) (Buckel, 1999).

Xianhua Yin *et al* (2005) caracterizaron el gen *xfp* de 10 diferentes especies de bifidobacterias, 8 de las cuales se compararon con 2 secuencias ya reportadas, *B. animalis* subsp. *lactis* DSM10140 y *B. longum* variedad *longum* NCC2705. Las 10 secuencias codificadas de las especies de bifidobacterias del gen *xfp* mostraron tener una identidad del 73%. Para la determinación de las secuencias utilizaron 19 oligonucleótidos como iniciadores, 2 de los cuales producían amplicones con todas las especies de bifidobacterias, pero además con otros géneros. Solo 4 de los iniciadores fueron específicos para el género *Bifidobacterium* spp. Al utilizar oligonucleótidos específicos y combinarlos se pueden detectar e identificar bifidobacterias aisladas.

La presencia del gen para la enzima Fructosa-6-fosfato fosfocatalasa (F6PPK), no es exclusiva del género *Bifidobacterium*. Se ha encontrado que algunas especies diferentes a *Bifidobacterium* también cuentan con esta enzima por ejemplo *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacilos*, etc. (Gavini *et al.*, 1996). Xianhua Yin *et al* (2005) probaron la presencia de la enzima en 33 especies diferentes al género *Bifidobacterium*, donde dentro de éstos, 7 están reportados que poseen la enzima F6P; sin embargo, al determinar las secuencias y compararlas es posible diferenciar y distinguir a las bifidobacterias.

2.3.2.1. Secuenciación del gen para la región 16S del ribosoma.

En los últimos años, se ha utilizado el análisis de genes codificantes para la región 16S ribosomal debido a que presenta regiones altamente conservadas y otras variables dentro del mismo grupo bacteriano. La caracterización del gen 16S ribosomal ayuda a estudiar la diversidad bacteriana. Las regiones altamente conservadas son utilizadas para la detección de bacterias en general, mientras que algunas regiones variables son utilizadas para la identificación de géneros y especies. Estas mismas regiones variables son útiles para la identificación a nivel genero o especie, pero además son útiles para el diseño de iniciadores en los mismos niveles para la detección en PCR dirigida.

Una pequeña diferencia en la secuencia del 16S ADN_r altera el comportamiento de la migración de los fragmentos de PCR en DGGE, como se mostró en un estudio donde se empleo *B. adolescentis* (Satokari *et al.*, 2001). De esta manera se permite un rápido monitoreo de los cambios que ocurren de los miembros predominantes en la comunidad de bifidobacterias. Sin embargo, este método no proporciona discriminación definitiva o cuantificación de diferentes cepas.

Requena *et al.* (2002), realizaron la amplificación del gen de la transaldolasa para la determinación de bifidobacterias, las cuales fueron aisladas de muestras fecales de recién nacidos. El gen transaldolasa de 301 pb (pares de bases) fue amplificado por PCR y después realizaron comparaciones de la migración relativa de los amplicones por electroforesis en gel por gradiente de desnaturalización (DGGE). Donde observaron que la mayoría de las especies de bifidobacterias reportadas que se encuentran en muestras de heces humanas pueden ser diferenciadas por la combinación de PCR-DGGE utilizando el gen de la transaldolasa. Sin embargo, de entre las especies de bifidobacterias estudiadas, no fue posible la diferenciación entre *B. catenulatum* y *B. angulatum*, recomiendan utilizar la combinación de PCR-DGGE amplificando el gen de la transaldolasa en poblaciones microbianas para identificar bifidobacterias, pero, si se desea conocer con mayor certeza cada especie es requerida la confirmación amplificando el gen ADN 16S ribosomal (ADNr). De esta manera el análisis genómico brinda una de las más rápidas y precisas formas para caracterizar a las bifidobacterias.

2.3.2.2. Hibridación.

El método de hibridación del ADN-ADN es una de las pruebas más viables para la identificación de las especies microbianas, como las *Bifidobacterium*. Consiste en buscar complementariedad entre dos cadenas sencillas de ADN bajo ciertas condiciones. Existen variantes a la técnica de hibridación dependiendo del tipo de ácido nucleico que se utilice (ADN-ADN, ADN-ARN, ARN-ARN). Inness *et al.* (2007), determinaron poblaciones de bacterias específicas en gatos normales y enfermos con inflamación intestinal, como *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium histolyticum* y *Desulfovibrio* spp., utilizando la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La técnica de FISH se basa en la hibridación por medio de oligonucleótidos o sondas fluorescentes (moléculas de ADN de una sola hebra, marcadas con moléculas

fluorescentes como biotina o fluorescencia) las cuales se une de forma complementaria para localizar genes o fragmentos de ADN que se quieren marcar o examinar. En este estudio se proporciono una dosis de *Bifidobacterium* spp. como probiótico y observaron un aumento significativo en los gatos sanos y en los gatos con inflamación intestinal una recuperación, donde la población de *Bifidobacterium* spp aumentó y *Desulfovibrio* spp., disminuyó. Aquí se muestra por primera vez la presencia de *Desulfovibrio* spp en gatos. La técnica de FISH se ha usado además para la cuantificación de los grupos de bacterias dominantes en muestras fecales de humanos, como *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp., lactobacilos (Harmsen *et al.*, 2000), la cual compararon con una cuenta convencional en placa. Los autores observaron que para que se obtengan resultados similares a las cuentas convencionales es necesario contar con el mayor número posible de sondas la detección de las especies de interés.

2.3.2.3. PFGE.

La electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE) es un método molecular de tipificación reproducible y con un alto poder discriminatorio a nivel de cepas de bacterias (Bolado-Martínez y Acedo-Félix, 2009). La PFGE utiliza enzimas de restricción, las cuales realizan cortes en el genoma bacteriano, generando un número determinado de fragmento, donde son separados de acuerdo a la diferencia de tamaño y carga eléctrica. En un estudio realizado por Kimura *et al.* (1997) compararon las técnicas de ribotipado y PFGE, encontrando que ésta tiene un mayor poder discriminatorio a nivel genómico para bifidobacterias intestinales de humanos. Caso similar se observó en el estudio polifásico de *Lactobacillus reuteri* realizado por Bolado-Martínez y Acedo-Félix (2009), donde se utilizó la técnica de PFGE y ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences). Matto *et al.* (2004) determinaron con PFGE, 32 tipos

diferentes de bifidobacterias de 42 cepas diferentes del género de bifidobacterias, de las cuales 34 eran muestras y 8 controles, donde además, la digestión e identificación se basó solo en una sola enzima *EcoRI*. La PFGE mostró mayor discriminación entre las especies de bifidobacterias en comparación con las técnicas de ribotipado y RAPD (Amplificación al azar del polimorfismo del ADN), es una amplificación de secuencias aleatorias por medio de un conjunto de iniciadores por PCR. De esta manera se observa que varias especies de bifidobacterias colonizan el tracto gastrointestinal, son genéticamente heterogéneas y por medio de esta técnica es factible su determinación.

2.3.3. Metabolismo de los carbohidratos por Bifidobacterias.

La fuente principal de energía de las bacterias son los monosacáridos y disacáridos, los cuales son utilizados en la primera sección del tracto gastrointestinal humano, mientras que los carbohidratos más complejos son abundantes en la parte distal. Las especies de bacterias que componen la microbiota están determinadas en gran medida, por el tipo de carbohidrato que se encuentre disponible. Las bacterias que se localizan en la región final del colon tienen un mayor potencial para la degradación de azúcares complejos (Cummings *et al.*, 1996). Las Bifidobacterias utilizan la ruta de la Fructosa-6-fosfato fosfoetolasa para metabolizar carbohidratos. Esto por la presencia de la enzima Fructosa-6-fosfato fosfoetolasa (F6PPK), característica de este género. Esta ruta convierte a las hexosas en ácido acético y láctico (Figura 1), teóricamente en un rango molar de 3:2, seguido después en menor rango por la producción de ácido butírico y propiónico. En estudios realizados en ratas alimentadas con inulina, para determinar la presencia de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), se determinó un aumento en la concentración de ácidos butírico y propiónico en comparación con ratas control (Levrat *et al.*, 1991).

Para la fermentación de carbohidratos por las bifidobacterias, existen 2 diferentes enzimas de Fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (Sgorbati *et al.*, 1976). Una de ellas es específica para el sustrato fructosa-6-fosfato, mientras que la otra es menos específica, ya que es capaz de utilizar como sustrato alternativo a la D-xilulosa-5-fosfato (X5P). Los puntos principales de esta ruta metabólica son las reacciones catalizadas por la acción de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa/Fructosa-6-fosfato fosfocetolasa, la cual interviene para que; i) la fructosa-6-fosfato se transforme en D-eritrosa-4-fosfato y acetil fosfato, y ii) que la D-xilulosa-5-fosfato se divide en D-3-gliceraldehido-fosfato y acetil fosfato. Por otro lado la D-eritrosa-4-fosfato junto con otra molécula de Fructosa-6-fosfato es procesada por enzimas de la ruta de pentosas-fosfato, donde primera interviene una transcetolasa para formar D-3-gliceraldehido-fosfato y D-Sedoheptulosa-7-fosfato. Después por una glicolaldehido transferasa de los 2 compuestos anteriores se forman D-ribosa-5-fosfato y D-ribulosa-5-fosfato, las cuales son isómeros. De esta última molécula formada y la acción de la enzima pentosa-6-fosfato epimerasa se forma la D-xilulosa-5-fosfato, en la cual es esta donde actúa la X5P/F6P fosfocetolasa. El acetil fosfato que se forma por ambas enzimas es convertido en acetato. El D-3-gliceraldehido-fosfato es procesado por la vía glicolítica de la ruta de Embden-Meyerhof y formar piruvato, donde después es convertido a S-lactato (de Vries *et al.*, 1967; de Vries *et al.*, 1967; Wolin *et al.*, 1998).

2.4. Probióticos.

La definición de probióticos ha evolucionado a la par del estudio de sus efectos benéficos sobre la salud y el bienestar del hospedero. Como puede observarse en la Tabla 1, se menciona la definición de probióticos ha sido un tema de discusión y debate.

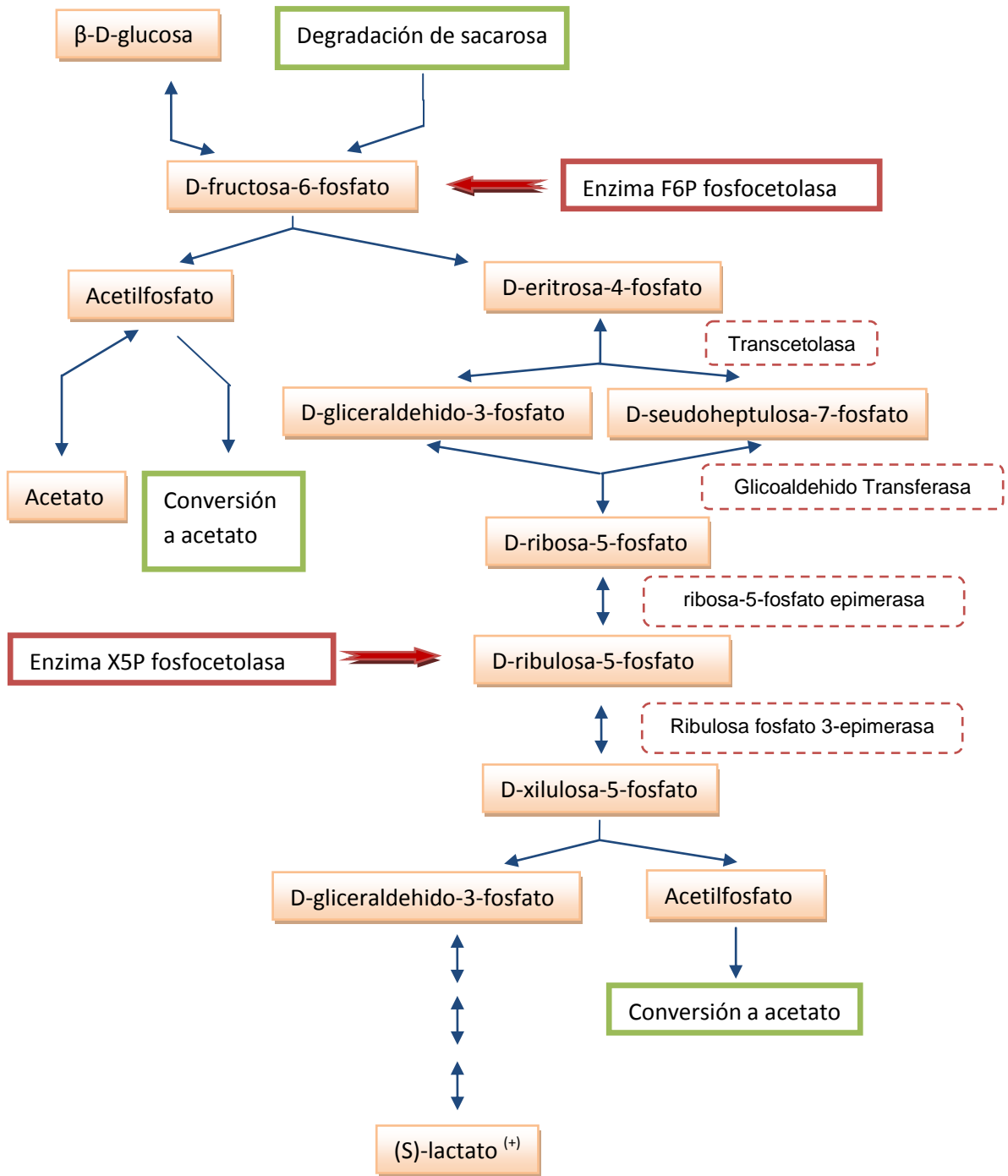


Figura 1. Ruta metabólica de los carbohidratos por la acción de la enzima de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa/Fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (X5P/F6P) de las bifidobacterias.

Fuente: <http://metacyc.org/META/new-image?type=PATHWAY&object=P124-PWY>

Los probióticos son considerados como biorreguladores, ya que ayudan a mantener el balance del ecosistema del tracto gastrointestinal mediante una gran variedad de mecanismos, entre ellos la prevención de la colonización por bacterias patógenas. Sin embargo, son muchos los factores que pueden ser adversos para que se produzcan los efectos deseados de los probióticos en el organismo. Se han descrito varios mecanismos por los cuales se puede mejorar la eficacia de los probióticos: i) Selección de cepas de microorganismos más eficientes; ii) Manipulación genética; iii) El empleo de cultivos mixtos de cepas probióticas y iv) La combinación de probióticos y prebióticos. Las sustancias sinérgicas o prebióticas, pueden ser oligosacáridos, fitocomponentes, nutrientes y factores de crecimiento, proteínas, ácidos grasos poli-insaturados y metabolitos bacterianos (Bomba *et al.*, 2002).

2.4.1. El uso de probióticos en humanos y animales.

Se ha encontrado que las especies productoras de ácido láctico como las *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium choerinum*, aisladas del colon de cerdos, tienen un efecto antagonista *in vitro* contra *E. coli* K88 y *Salmonella choleraesuis* (Corona, 2003). En otro estudio realizado se aislaron cepas de *Enterococcus* las cuales presentan acción antagonista y pueden ser usados como un probiótico (García-Galaz *et al.*, 2004). También estudios *in vitro* con *Lactobacillus* spp demostraron que ofrecen protección contra agentes patógenos en humanos, como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Clostridium* spp (Yusof *et al.*, 2000).

Estos estudios sugieren que existen soluciones viables para disminuir o prevenir las enfermedades intestinales en cerdos y en otros animales, sin el uso de antibióticos (Mutsunori *et al.*, 2003).

Tabla 1. Evolución del concepto de probiótico según las investigaciones realizadas.

Año	Definición	Comentario	Autor
1965	Describen a sustancias producidas por un microorganismo, que estimulan el crecimiento de otro, de forma opuesta a los antibióticos.	Primer término.	Lilly, D.M. y Stillwell, R.H.
1974	Los probióticos son organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal	La definición no excluye a los antibióticos.	Parker, D.M.
1989	Los probióticos son un suplemento microbiano alimenticio que afecta benéficamente al huésped animal, mejorando el balance intestinal microbiano.	Definición más utilizada.	Fuller, R.
1998	Los probióticos son ingredientes alimentarios microbianos vivos que tienen un efecto benéfico sobre la salud humana.	Incluye otros mecanismos además del balance de la microbiota.	Salminen, S. <i>et al.</i>
1999	Los probióticos son preparaciones celulares microbianas o componentes de células microbianas que tienen un efecto benéfico sobre la salud y el bienestar del hospedero.	Los probióticos no necesariamente necesitan estar viables, ya que la forma no viable o los microorganismos lizados, han mostrado tener efectos benéficos. No restringe al uso de probióticos en alimentos exclusivamente y los metabolitos están fuera de la definición, para excluir a los antibióticos.	Salminen, S. <i>et al.</i>
2001	Microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidades adecuadas, que le confiere un beneficio a la salud del hospedero.	Incluye y discute cuál sería la dosis adecuada o efectiva de administración en un tratamiento con probióticos. FAO/WHO	La Organización en Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas y La Organización Mundial de la Salud.

Los animales de granja para el consumo humano son tratados con antibióticos cuando se encuentran enfermos por causa de alguna infección. *E. coli* K88 se ha identificado como un agente causal de enfermedades en los cerdos (Meng *et al.* 1998). Estas bacterias invaden la mucosa celular y produce endotoxinas que causan diarreas y la muerte a cerdos infectados. Los antibióticos son usados para prevenir o eliminar estas infecciones, desafortunadamente existe muy poco control en su administración. La peor desventaja de esta práctica es que las bacterias desarrollan resistencia, por ello es necesario buscar alternativas para el uso de antibióticos. La utilización de *L. acidophilus* en ratas, a los cuales se les indujo cáncer intestinal, mostro ser efectiva para inhibir el desarrollo de tumores en el colon. (Graeme *et al.*, 1999). Se han demostrado grandes beneficios en la salud del hospedero al administrar algunas formulaciones de probiótico. Sobre todo con el propósito de controlar o disminuir una enfermedad, pero en otros casos tiene un efecto negativo aun empleando la misma formulación.

En estudios realizados a bebés recién nacidos se observó que cuando se administró *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), la bacteria provocó la reducción del grado de eczema atópico cuando los niños alcanzaron la edad de 2 y 4 años (Rosenfeldt *et al.*, 2003), pero también provocó un incremento en la respuesta alérgica a la edad de 4 años (Kalliomaki *et al.*, 2003). Este tipo de reacción depende principalmente del individuo que la consume y en una reacción auto-inmune, la respuesta inmune a los probióticos puede ser positiva o negativa. También se ha determinado que al administrar LGG a pacientes que padecen la enfermedad de Crohn empeora la situación de algunos individuos (Seksik *et al.*, 2003). Es por ello que hoy en día se busca nuevas estrategias para mantener o en su caso, mejorar la salud de pacientes con inflamación intestinal, por ejemplo el uso de prebióticos aumentando la población de bacterias benéficas existentes en el tracto gastrointestinal.

2.5. Prebióticos.

Los animales tienden a seleccionar de forma general o muy específicamente su alimento (herbívoros, carnívoros, omnívoros), dependiendo de la disponibilidad de los diferentes nutrientes para cada especie en un ecosistema. Existen principios similares en el tracto gastrointestinal, en el cual las diferentes especies de bacterias tienen preferencias y habilidades diferentes para la obtención de nutrientes específicos. Los carbohidratos son una de las principales limitantes para muchas especies bacterianas en el tracto intestinal, ya que el tipo de carbohidrato disponible influye en el crecimiento de las poblaciones de bacterias presentes (Patterson, 2005). Por ejemplo, *Lactobacillus johnsonii* en intestino delgado, fermenta principalmente mono, di, y trisacáridos (Pridmore *et al.*, 2004); en el intestino grueso, *B. longum* y *B. tetaiotaomicron* degradan y metabolizan principalmente carbohidratos complejos (Siezen *et al.*, 2004). Algunos estudios han demostrado que la presencia de prebióticos promueve el crecimiento de probióticos, y por consiguiente se mantiene y mejora la salud y bienestar del huésped y se disminuye el riesgo de padecer varios tipos de enfermedades (Roberfroid, 2007).

Los prebióticos se definen como “Un ingrediente alimentario no digerible por el hospedero, que lo afecta benéficamente por la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de probióticos en el colon, mejorando así su estado de salud” (Roberfroid, 2007). Desde su introducción, el concepto de prebióticos ha atraído mucho la atención, despertando el interés en los científicos así como en la industria. Sin embargo, muchos componentes de los alimentos, especialmente muchos oligosacáridos y polisacáridos alimentarios (incluyendo fibra dietaria), han sido considerados como compuestos con actividad prebiótica, sin la debida consideración de los criterios requeridos. No todos los carbohidratos dietarios son prebióticos, deben cumplir con varios criterios: 1) Resistencia a la acidez gástrica, a la hidrólisis por las enzimas de mamíferos y a la absorción gastrointestinal; 2) ser fermentados por la flora intestinal y 3) estimular

selectivamente el crecimiento y/o actividad de aquellas bacterias intestinales que contribuyan a la salud y al bienestar del huésped (Gibson y Roberfroid, 1995). El criterio de resistencia, no necesariamente quiere decir que el prebiótico sea completamente indigerible, pero si se deberá garantizar que una cantidad significativa del compuesto está disponible en el intestino grueso para servir como un sustrato de fermentación. Aun cuando todos los criterios son importantes, el tercero es el más difícil de cumplir (Gibson *et al.*, 2004; Kip *et al.*, 2005). Actualmente sólo son dos carbohidratos alimentarios los que cumplen con el concepto de prebióticos, ya que son oligosacáridos esencialmente no digeribles: inulina y fructooligosacáridos (Roberfroid, 2007).

El reporte de la fermentación en cultivos puros de cepas microbianas o un incremento en un número limitado de géneros bacterianos en una mezcla compleja de bacterias (lodos fecales), ya sea *in vitro* o *in vivo*, no pueden ser aceptados para demostrar la efectividad prebiótica, si no se toman en cuenta las interacciones bacterianas. Se deberá demostrar la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de esas bacterias intestinales que contribuyen a la salud y el bienestar. Además se requiere del muestreo anaerobio de las heces, seguida por un análisis cuantitativo confiable de una gran variedad de géneros, como aerobios/anaerobios totales, bacteroides, bifidobacterias, clostridios, enterobacterias, eubacterias y lactobacilos (Amaretti *et al.*, 2007; de Vrese y Schrezenmeir, 2008). Como ya se ha mencionado, para todos los ingredientes funcionales, debe demostrarse el efecto prebiótico, a través de ensayos de nutrición *in vivo* en las especies de interés (humanos, animales de granja o de compañía), usando metodologías apropiadas para producir resultados científicos. En el caso de los glucooligosacáridos, isomaltooligosacáridos, lactosucrosa, polidextrosa, oligosacáridos de soya y xilooligosacáridos son oligosacáridos para los que existen sólo datos primarios y promisorios. Sin embargo, la evidencia para considerarlos prebióticos aun no es suficiente (Gibson *et al.*, 2004). Se ha probado el potencial prebiótico en otros compuestos como germinados de cebada, oligodextranos, ácido glucónico,

gentiooligosacáridos, oligosacáridos pécticos, oligosacáridos mananos, lactosa, glutamina, sustratos ricos en hemicelulosa, almidón resistente y sus derivados, oligosacáridos de melibiosa, péptidos derivados de lactoferrina y N-acetyl-qhitooligosacáridos (Gibson *et al.*, 2004). En el 2007 la FAO (Organización de la Agricultura y los Alimentos, por sus siglas en inglés) define a los prebióticos como “un componente alimenticio no viable que confiere un efecto benéfico al hospedero, lo cual está asociado con la modulación de la microbiota”.

2.5.1. Galactooligosacáridos.

Los galactooligosacáridos (GOS) son carbohidratos que como su nombre indica están compuestos de unidades monoméricas de galactosa (Figura 2), unidas por enlaces $\alpha\text{Gal}(1-6)-\beta\text{-Gal}(1-4)$ y en las terminaciones de las cadenas una molécula de glucosa unida por enlaces $\beta\text{-Glu}(1-4)$. Los GOS se obtienen industrialmente a partir de altas concentraciones de lactosa, que se consigue principalmente del suero de la leche (Yanahira, 1995) y por la acción de la enzima β -galactosidasa, la cual se obtiene de *Bacillus circulans* (bacteria), *Kluyveromyces* spp (levadura) y de *Aspergillus oryzae* (hongo) (Boon *et al.*, 2000). La enzima β -galactosidasa es una glicosidasa que tiene actividad de transgalactosilación (síntesis enzimática) y origina la formación de cadenas 4' o 6'-galactosil-lactosa. Los GOS comerciales son una mezcla de carbohidratos de varios grados de polimerización (GP), unidos por enlaces glicosídicos y contiene una gran cantidad de glucosa y lactosa sin reaccionar. Los enlaces entre los monómeros de galactosa, la eficiencia de la transgalactosidación y los componentes del producto final dependen de las enzimas y las condiciones de reacción (Cheng *et al.*, 2006).

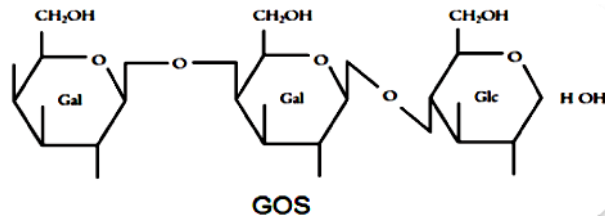


Figura 2. Estructura química de Galactooligosacáridos (GOS).

Se ha demostrado en varios estudios *in vitro* e *in vivo* que los GOS resisten la hidrólisis de las enzimas digestivas humanas y no son absorbidos cuando pasan por el intestino delgado, de esta manera, pueden ser fermentados por la microbiota del colon (Bouhnik *et al.*, 1997). Boehm *et al.* (2004), realizaron pruebas donde demuestran que formulaciones con suplementos con GOS y FOS (90% y 10%, respectivamente) de 0.8 g/100 ml de la formula, donde afecta la microbiota benéfica de recién nacidos de igual manera que aquellos alimentados con leche materna. Rycroft *et al.* (2001), realizaron una comparación fermentativa *in vitro* con 4 oligosacáridos (xilo-oligosacáridos, lactulosa, FOS y GOS) para determinar sus propiedades como prebióticos. Los 4 oligosacáridos aumentaron la población de bifidobacterias y además los GOS produjeron una mayor disminución en la población de clostridios. Los estudios realizados con GOS han demostrado que promueven el crecimiento y la estabilidad de probióticos o la microbiota normal en el intestino, brindando un efecto benéfico a quien los consuma.

2.5.2. Fructooligosacáridos.

Los fructooligosacáridos (FOS) son definidos por la IUB-IUPAC en conjunto con la Comisión de Bioquímica en Nomenclatura y la AOAC como oligosacáridos que contiene de 2 a 10 residuos de monosacáridos de fructosa conectados por enlaces glicosídicos $\beta(2-1)$ con una glucosa terminal $\alpha(1-2)$

(Figura 3). Son prebióticos que se encuentran naturalmente en gran cantidad de plantas y es un oligosacárido de la inulina. Los FOS se obtienen principalmente de la planta de achicoria, al igual que la inulina. La diferencia para la obtención de los oligosacáridos radica en la adición de una hidrólisis después de la extracción. La enzima endoinulinasa se utiliza para romper las cadenas de la inulina, la cual deja cadenas de 2 a 10 monómeros y aproximadamente un GP (grado de polimerización) de 4. Los fructooligosacáridos también pueden sintetizados a partir de la sacarosa por medio de una transfructosilación con la enzima β -fructosidasa que se puede obtener del hongo *Aspergillus niger*. Esta enzima adiciona monómeros de fructosa a una molécula de sacarosa (Crittenden, 1996). Los fructooligosacáridos también se encuentran naturalmente en alimentos de origen vegetal, como agaves, cebollas, alcachofas, espárragos, puerros, y ajos (Van Loo *et al.*, 1995).

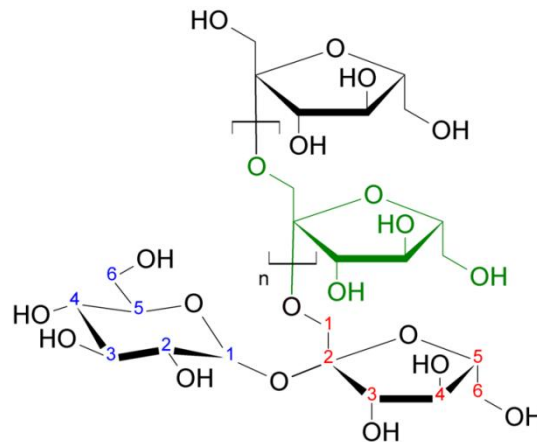


Figura 3. Estructura química de Fructooligosacáridos (FOS).

Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Inulin_strukturformel.png

2.5.3. Inulina.

La inulina es una fibra soluble, heterogénea, compuesta de unidades de fructosa en forma lineal, unidas por enlaces $\beta(2-1)$ fructosil-fructosa y una molécula de glucosa se encuentra unida al final de cada cadena de fructosas con enlace $\alpha(1-2)$, como una sacarosa (Figura 3). La longitud de sus cadenas se encuentra de entre 2 a 100 unidades monoméricas de carbohidratos. La característica principal de la estructura los FOS e inulina es su enlace $\beta(2-1)$, el cual no puede ser degradado por las enzimas de los mamíferos como cualquier carbohidrato y es responsable del valor calórico reducido y efectos de una fibra dietética (Hoebregs, 1997). Los fructanos en general aportan un valor calórico reducido de 1.5 kcal/g, en comparación con los carbohidratos digeribles con 4 kcal/g (Roberfroid *et al.*, 1993).

Los términos inulina y fructooligosacáridos pueden utilizarse como un mismo concepto o por separado. Inulina es un término genérico que engloba todas las moléculas lineales con enlace $\beta(1-2)$. En cualquier circunstancia para la identificación de los oligómeros/polímeros de este tipo de cadenas, el término oligofructosa y/o inulina puede ser usada, respectivamente. Además, los términos Oligofructosa y fructooligosacáridos se consideran sinónimos con GP máximo a 10 (Roberfroid, M., 2007).

La inulina y los fructooligosacáridos son utilizados para adicionarse como fibra en productos alimenticios. Estos carbohidratos no adicionan ningún tipo de sabor a los alimentos (Niness, 1999). La inulina es menos soluble que los fructooligosacáridos y tiene la habilidad de formar microcristales al ser agregados a agua o leche. Estos cristales no son perceptibles directamente en la boca, pero interactúan entre ellos para formar una textura suave y cremosa, dando la sensación oleosa en el producto. La inulina se ha utilizado para reemplazar la grasa en postres congelados, aderezos de ensaladas, cereales, productos cárnicos, etc. (Madrigal y Sangronis, 2007).

La inulina pasa por el estómago y el intestino, sin ser absorbida y sin sufrir ningún cambio en su estructura, llegando así hasta el colon. En este punto es fermentada por las bacterias y promueve la proliferación de bacterias benéficas, entre ellas las bifidobacterias. Por tanto la inulina es un prebiótico efectivo y benéfico para el huésped, por la selectividad del crecimiento o actividad de un número limitado de bacterias en el colon (Roberfroid *et al.*, 1998).

2.5.3.1. Fuente principal de inulina.

La fuente principal de inulina en la industria es la raíz de la achicoria, la cual contiene de un 10% a 15% de la misma, en base húmeda. La achicoria (*Chicorium intyvus*) es una hierba que puede alcanzar 1 metro de altura (Figura 4). Tiene numerosas ramificaciones, las hojas son basales y tiene hojas brácteas. La floración es de color azul, tiene la particularidad de seguir la trayectoria del sol al igual que los girasoles. Son hermafroditas la mayoría de las veces. La raíz es gruesa, cilíndrica y puntiaguda (parecida al nabo). La achicoria proviene originariamente de Europa, donde se reproduce de manera silvestre en los prados y campos, así también como en las orillas de los caminos. La achicoria estimula el crecimiento de bacterias benéficas por la inulina presente, provocando un efecto bifidogénico. La mayor parte de la inulina y los FOS comerciales están disponibles en la industria de los alimentos (De Leenheer y Hoebregs, 1994). Existen patentes para la preparación de la inulina a partir de diferentes vegetales como la achicoria, la alcachofa y la dalia. El proceso de extracción de inulina consta de varias etapas. La manufactura de la inulina de la raíz de la achicoria es similar que la extracción del azúcar en la industria azucarera. Las raíces son cortadas, lavadas y se realiza un proceso de difusión en agua caliente, después se purifica y se seca. El producto resultante es un polvo de inulina que contiene de 6 a 10 % de glucosa, fructosa y sacarosa (Laufenberg, 2010).



Figura 4. Planta de achicoria, de cuyas raíces se extrae la mayor parte de la inulina comercial.

La inulina, por sus propiedades y nutrientes, ayuda al estímulo del funcionamiento adecuado del hígado y a la secreción de bilis, es desintoxicante, depurativa, cicatrizante, sedante y diurética. La inulina a nivel industrial se presenta como un polvo blanco sin olor, con sabor neutro y sin efecto residual (Kip *et al.*, 2005).

2.5.3.2. Metabolismo de inulina y fructooligosacáridos.

En los últimos años se ha determinado la actividad prebiótica de la inulina y los FOS de diferentes plantas, pero aún no se conoce la relación entre el largo de la cadena de los fructanos y la habilidad de las bifidobacterias a los oligosacáridos y polisacáridos. Se realizó un estudio con 55 cepas de diferentes especies de *Bifidobacterium* en el cual el dato más sorprendente fue que todas ellas fermentaron los FOS y que la mayoría de las bacterias utilizadas en el análisis, no crecieron en presencia de la inulina. Esto concuerda con estudios donde las bifidobacterias tienen preferencia por FOS de cadenas cortas para

desarrollarse. Algunos reportes sostienen que bacterias obtenidas de animales pueden metabolizar la inulina mucho mejor que las bacterias del ser humano (McKellar *et al.*, 1993; McKellar y Modler, 1989). En un estudio realizado con 13 animales diferentes, se observó que solo en 1 de ellos (rumiante) se aisló *B. thermophilum* ATCC 25866 en presencia de la inulina. Con estos estudios se abren nuevas perspectivas en la selección de probióticos y prebióticos para obtener formulaciones simbióticas (la combinación en un alimento funcional de probióticos y prebióticos) (Rossi *et al.* 2005).

Se ha demostrado el uso efectivo de FOS como prebiótico, sin alterar parámetros fisiológicos, como niveles de insulina y fructosa (López, 1996). Aunque los efectos de los FOS en animales no pueden ser transferidos automáticamente a los humanos, se ha observado que en pruebas realizadas en aves con dietas de FOS, hay un incremento en la eficiencia de los alimentos, al sustituir el tipo de carbohidrato, y reduce la mortalidad. Esto nos dice que un efecto indirecto de la modificación y estabilidad de la microbiota intestinal que puede mejorar la salud de las aves, especialmente cuando se encuentran en condiciones de estrés (López, 1996).

Los FOS son mejor conocidos por su capacidad para incrementar bifidobacterias de la microbiota intestinal y constituyen una fuente importante de ácido butírico, el cual es un nutriente esencial para las células epiteliales. Las bifidobacterias reducen la producción de fenol, cresol, e indol, que son sustancias de putrefacción, generadas principalmente en el intestino grueso por poblaciones bacterianas como clostridios y por ello la carga de trabajo en el hígado para eliminarlas también se reduce. Al administrar regularmente FOS en la dieta se produce una reducción significativa del colesterol total y triglicéridos en la sangre. Es por ello que los FOS son utilizados como ingredientes en la dieta de animales y humanos, incrementando la población de bacterias probióticas en la microbiota (Hate *et al.*, 1983).

Un estudio realizado en personas alimentadas con FOS e inulina mostraron que el número de bifidobacterias excretadas después 24 h fue de 5 a 8 veces mayor que las personas sin suplemento prebiótico. En términos de composición de la microbiota intestinal el contenido de bifidobacterias fue el grupo de bacterias predominantes por la presencia de inulina y FOS. Pero el incremento del número de bifidobacterias fue el mismo estadísticamente para la inulina y FOS (Gibson *et al.*, 1995). También se ha encontrado que en personas mayores al ser alimentadas con 20 a 40 g/d de inulina provoca un incremento significativo de la cuenta de bifidobacterias en el contenido fecal. En poblaciones de Europa, Japón y Estados Unidos se ha reportado el uso de FOS, en donde algunos voluntarios fueron alimentados con 4-12.5 g por día de FOS de la achicoria mostrando un incremento significativo de bifidobacterias en el contenido fecal. El incremento de estas cuentas está relacionado con la cantidad o dosis administrada (Kleessen *et al.*, 1994, 1997).

2.5.4. Experimentación *in vitro* e *in vivo* en presencia de prebióticos.

Se ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* que los GOS, resisten la hidrólisis de las enzimas digestivas humanas y no son absorbidas por el intestino delgado. Las especies de *Bifidobacterium* y algunos *Lactobacillus* fermentan los GOS, pero otras bacterias no pueden fermentarlos, como *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus* y *Fusobacterium* spp y *Escherichia coli*. En estudios, *in vitro* e *in vivo*, se encontró que los GOS llevan a una selección en el crecimiento de probióticos, modificando la actividad fermentativa intestinal, aumentando la concentración y la producción de ácidos grasos de cadenas cortas. Las mezclas de galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) estimulan el crecimiento de la microbiota (Ito *et al.*, 1993).

Se compararon estudios *in vivo* e *in vitro*, utilizando dietas que contienen inulina y FOS, donde *in vivo* se determinó la utilización de estos carbohidratos por el aumento de las bifidobacterias, e *in vitro* demostraron la fermentación de FOS en cultivos puros de *Bifidobacterium*. Sin embargo, poco se conoce de la influencia que existe de los diferentes grados de polimerización de los fructanos en la capacidad de fermentación de los probióticos. Se ha encontrado en un solo estudio *in vitro* que 3 cepas de *Bifidobacterium* fermentan en mayor grado, cadenas cortas que cadenas largas de FOS, obteniéndose un aumento en el rendimiento de la biomasa de bacterias (Perrin *et al.*, 2002).

2.6. Agaves.

En México se cuenta con una fuente de inulina que son los agaves. Se conocen más de 200 especies que pertenecen a este género las cuales son de una gran diversidad en formas, tamaños y colores. Tiene la forma de una roseta de hojas gruesas y carnosas que en su mayoría terminan en una espina, el tallo suele ser muy corto, por lo que se cree que las hojas salen de la raíz. La mayor parte de la cabeza del agave está compuesta por inulina, esta parte es conocida como piña. La inulina actúa como una fuente de energía de reserva en el agave. Mediante una hidrólisis parcial (calor o químico) en la piña se producen FOS y fructosa, además se ha detectado glucosa, xilosa y arabinosa (Urías-Silvas y López, 2004).

El uso más importante del agave es la producción de bebidas alcohólicas. En México se cuenta con una gran variedad de productos derivados del agave, como el tequila, el mezcal, el sotol y el bacanora, originario de Sonora (Núñez, 2001). El tequila mexicano, derivado del *Agave tequilana* Weber var. Azul (Figura 5), con denominación de origen, es la bebida alcohólica de mayor consumo a nivel mundial. Investigaciones recientes sobre las propiedades de diferentes tipos de agave muestran que puede tener otro tipo de uso que solo la

producción de bebidas alcohólicas. Es por ello que se pretende desarrollar alternativas para el uso del agave y que brinde un beneficio económico, y que no se contraponga a la denominación de origen, ya que el agave cultivado fuera de la misma, no puede ser utilizado para la elaboración de tequila como tal (SAGARPA 2009).



Figura 5. *Agave tequilana* Weber var. Azul.

Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Agave_tequilana_1.jpg

El uso de la inulina del agave como prebiótico o como ingrediente en algún alimento ha sido muy poco reportado, pero se cree que puede tener el mismo efecto que la inulina que se obtiene de la raíz de achicoria, además de otras plantas. La diferencia entre la inulina de la achicoria y del agave es su estructura. Se sabe que en la achicoria las fructosas que forman la inulina están distribuidas de forma lineal (Figura 3), mientras que la inulina del agave se presenta en forma ramificada (Figura 6).

Estudios realizados por López *et al.* (2003), han determinado diferentes estructuras que comprenden la inulina dependiendo de la especie del agave. La polimerización y depolimerización de los carbohidratos presentes en las diferentes especies de agaves dependen en gran parte de las condiciones ambientales en las que se encuentran para su desarrollo. Los fructanos

representan la mayor cantidad de carbohidratos almacenados en las diferentes especies de agave. Las cadenas de fructanos de los agaves presentan ramificaciones mixtas, con diferentes longitudes. La cadena principal es la inulina, formada por enlaces $\beta(2-1)$ la cual inicia de la fructosa que forma parte del disacárido original, la sacarosa. Otro tipo de ramificación que se puede encontrar en la glucosa del disacárido en sentido contrario, formando una cadena de fructosas unidas por enlaces $\beta(2-1)$, esta se conoce como neoserie (Figura 6). También forma ramificaciones llamadas Levano, esta es una cadena de fructosas unidas por enlaces $\beta(2-6)$ que parte de la fructosa del disacárido original (Mancilla-Margalli y Lopez-Garcia, 2006).

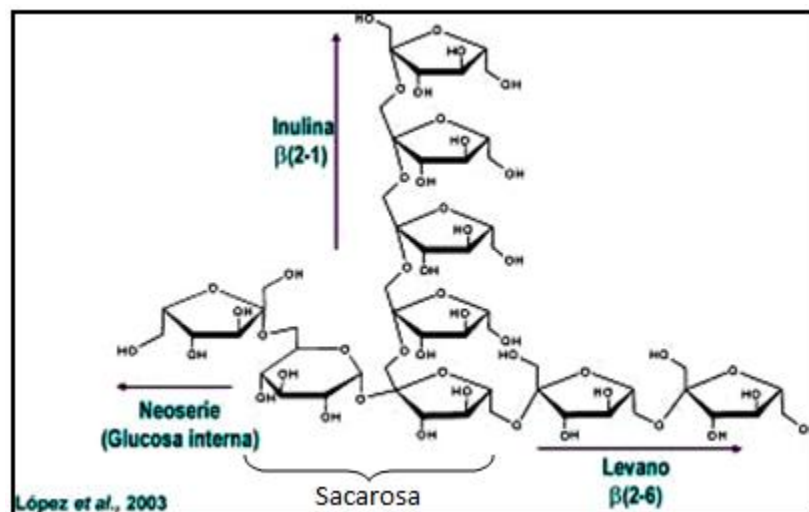


Figura 6. Estructura básica de los fructanos de agave.

2.6.1. Estudios realizados con inulina de agave como prebióticos.

Se realizó un estudio *in vitro*, para realizar el crecimiento de *Bifidobacterium breve* (ATCC 15700) utilizando fructanos de diferentes agaves. Se utilizó el medio MRS, sin glucosa y L-cisteína con una concentración final de

fructanos de agave de 10 g/L. Se pudo observar que los diferentes agaves utilizados mostraron distintos efectos en el crecimiento de *B. breve* y los fructanos con cadena más corta estimulan el crecimiento de la bacteria. En este estudio los agaves que presentaron un mayor crecimiento de *B. breve* fue *A. angustifolia* Oax., *Dasyrillion* spp. y *A. tequilana* Gto., en comparación con el control (Raftilose®Synergy1, Marca Orafiti), el cual tiene mayor grado de polimerización. Además se observó un mayor crecimiento en comparación con la fructosa (Urías-Silvas, 2004). Este estudio es limitante, ya que existen más especies de bifidobacterias y de bacterias benéficas que ayudan en la salud del tracto gastrointestinal (Urías-Silvas y López, 2004).

Un estudio realizado en el cual se utilizó inulina de *Agave tequilana* y aparte una mezcla de FOS/GOS, a las cuales se les indujo una inflamación química con DSS. Se observó que aquellas ratas que fueron alimentadas con la inulina de agave mostraron un retraso en la aparición de la inflamación, el tiempo de recuperación se vio acortado y la población de coliformes disminuyó en su contenido fecal (Domínguez-Vergara, 2009). En este estudio se comprobó que existe un efecto fisiológico benéfico. Sin embargo no se conoce el efecto bifidogénico en la microbiota normal del tracto gastrointestinal de tales ratas, así también conocer el tipo de especies de bifidobacterias que están siendo influenciadas por la inulina de *Agave tequilana* Weber como prebiótico y su efecto sobre una inflamación inducida.

3. HIPOTESIS

La inulina del *Agave tequilana* produce un efecto bifidogénico en ratas *Sprague Dawley* sanas, así como también en aquellas con inflamación intestinal inducida.

4. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar la población de *Bifidobacterium* spp. e identificar las especies aisladas en ratas *Sprague Dawley* sanas y con inflamación intestinal inducida, alimentadas con dietas conteniendo inulina de *Agave tequilana*.

4.1. Objetivos particulares

1. Cuantificar bifidobacterias a partir de las heces de ratas *Sprague Dawley* sanas y con inflamación intestinal aguda, inducida por un tratamiento de 3 días con dextrán sulfato de sodio (DSS) al 3%.
2. Determinar el efecto bifidogénico de la inulina de *Agave tequilana* sobre las ratas sanas y enfermas y compararlo con el efecto de una mezcla 1:1 de fructooligosacáridos y galactooligosacáridos, provenientes de achicoria y de la transgalactosilación de lactosa, respectivamente.
3. Identificar a las especies de bifidobacterias aisladas, mediante técnicas moleculares y determinar la influencia del tipo de carbohidrato en la dieta en el tipo de especies aisladas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales de experimentación

Para éste trabajo se utilizaron ratas macho *Sprague Dawley* de 35-36 días de edad, con un peso de entre 50 a 75 g. Las ratas se aclimataron primeramente por 3 días a las condiciones del bioterio de CIAD, con ciclos de 12 h luz/oscuridad y temperatura controlada (25-26° C). Las ratas tuvieron acceso libre al agua y se les suministró la dieta AIN93G para roedores, de acuerdo a los criterios del Instituto Americano de Nutrición (AIN, 1993; Reeves *et al.* 1993). Los componentes de dicha dieta se resumen en la Tabla 2. El alimento de las ratas se mantuvo en refrigeración a 2 °C. El periodo del tratamiento experimental fue de 25 días. Se monitorio el peso de las ratas y del alimento consumido todos los días del tratamiento.

Tabla 2. Composición de dieta AIN93G.

Componente	Control (%)
Caseína	20
DL Metionina	0.3
Almidón de maíz	60
Sacarosa	5
Fibra (celulosa)*	5
Mezcla de minerales AIN	3.5
Mezcla de vitaminas AIN	1
Bitartrato de colina	0.2
Aceite	5

*El total de celulosa se sustituyó en cada caso por los prebióticos del estudio.

Después de la aclimatación, se sacrificaron las primeras 3 ratas, para tomarlas como control inicial y hacer el análisis microbiológico de las heces de intestino, así como observaciones del aspecto del intestino y órganos interno. Los animales se sacrificaron de acuerdo a los cuidados y procedimientos establecidos por el Comité de Ética del CIAD para Animales de Laboratorio. Las muestras se tomaron en un ambiente lo más estéril posible (Figura 7).



Figura 7. Disección de las ratas para la toma de muestras de heces intestinales y observación de los daños de intestinos.

El DSS (Figura 8) se adquirió de MP Biomedicals (Solon, Ohio, USA) que tiene un rango de masa molecular entre 36,000 y 50,000 Daltones. El DSS se disolvió en agua purificada, al 3% y se les dio ad libitum. Los medios de cultivo MRS (caldo y agar) son marca DIFCO y el medio TOS de la marca Yakult Pharmaceutical Industry Co. LTD. Los reactivos empleados fueron de Sigma Aldrich, grado analítico.

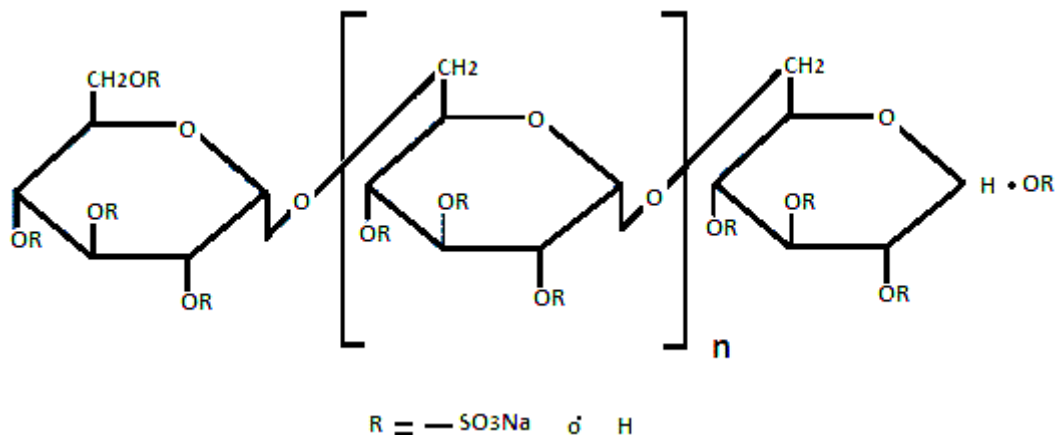


Figura 8. Estructura química del compuesto dextran sulfato de sodio.

Fuente: <httpwww5.mediagalaxy.co.jpmeitokaseihindsds.html>

5.1.1. Tratamientos.

Las ratas se dividieron de forma aleatoria en 6 grupos de 10 animales, los grupos A, B y C, fueron alimentadas con inulina de agave, una mezcla de FOS/GOS (1:1) y celulosa como control, respectivamente. Mientras que a los grupos D, E y F se les provocó una colitis con DSS, al 3 %, como se observa en la Figura 9.

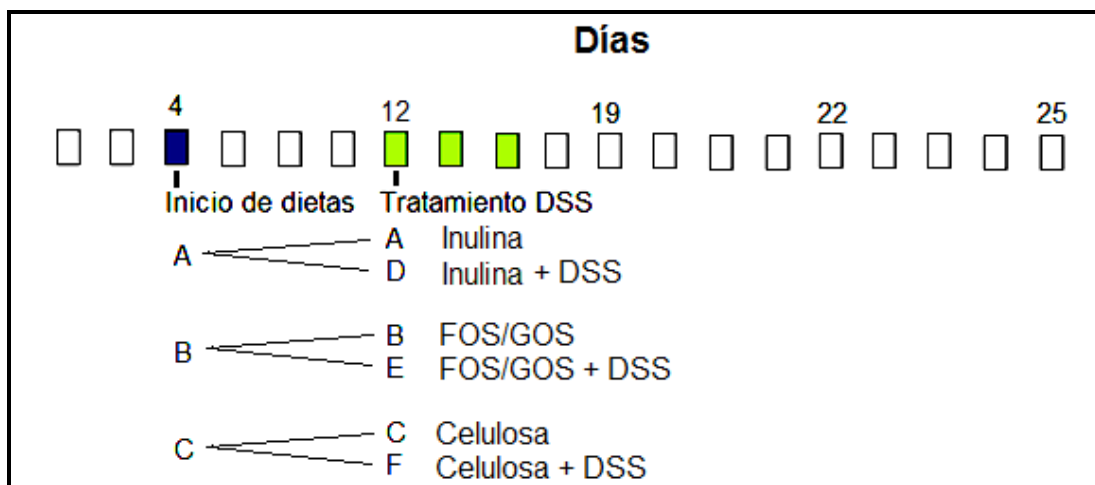


Figura 9. Inicio de las dietas 4º día. Formación de los grupos, 3 dietas, A y D (Inulina), B y E (FOS/GOS), C y F (celulosa, control), los grupos D, E y F, se les dio tratamiento con DSS al 3% (verde).

A partir del 4° día, a los grupo A y D, se les alimentó con inulina de *Agave tequilana*; los grupos B y E fueron alimentados con una mezcla de FOS/GOS (1:1); los grupos C y F con celulosa (control). En el día 10 se sacrificó 1 rata por grupo (3 ratas), y en el día 12 se inicio en tratamiento con DSS al 3%, durante 3 días. Este tratamiento se aplicó a los grupos D, E y F quedando así constituidos los 6 grupos (Figura 9). En los días 19, 22 y 25, se realizó el sacrificio de 2 ratas por cada grupo. Se recolectaron muestras fecales en cada sacrificio (Figura 10) para el análisis citológico y microbiológico.

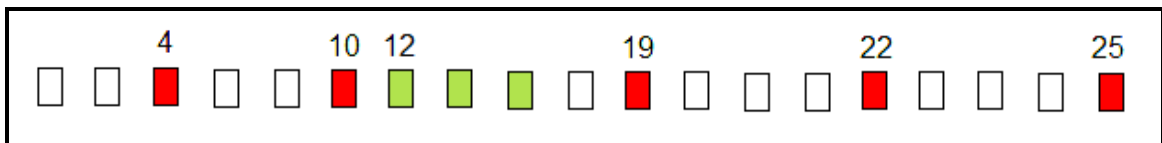


Figura 10. Días de sacrificio de las ratas, para realizar el análisis citológico y microbiológico (cuadros marcados en rojo) y la duración del tratamiento con DSS (cuadros marcados en verde).

5.2. Análisis microbiológico.

Se tomaron 2 muestras diferentes para el aislamiento y cuenta de *Bifidobacterium* spp.

1. Aislamiento de bifidobacterias. De las ratas sacrificadas se tomó una porción de 1 a 0.5 cm del colon, incluyendo las con heces. Se colocó cada porción, en tubos con caldo MRS a pH 6, como medio de enriquecimiento selectivo, adicionados con 0.075 g/ml Mupirocina y 0.5 g/L L-Cisteína. Las muestras se incubaron a 37° C por 72 horas utilizando un generador de CO₂ (GasPak EZ (CO₂)). Después se tomó una muestra del fondo de cada tubo con una asa estéril, se estrió en placas con agar TOS, adicionado con 0.5 g/L L-

Cisteína y se incubó a 37° C por 72 horas, en las mismas condiciones mencionadas anteriores (Munoa y Pares, 1988).

2. Cuenta por difusión en placa. Se recolectaron 0.5 g de heces del intestino grueso (1 muestra por grupo), en una bolsa estéril y se le agregaron 4.5 ml de solución amortiguadora y se homogenizó la solución, para posteriormente realizar diluciones seriadas. Se tomaron 50 µl de cada una de las diluciones y se colocaron en una placa con medio TOS, (medio de cultivo propianato con 0.075 g/ml Mupirocina y 0.5 g/L de L-Cisteína, Anexo 8.1), por duplicado y se dispersó con una varilla estéril. Las placas se incubaron a 37° C por 72 horas en ambiente anaerobio, donde se utilizó un sistema de recipiente de generación de gas GasPak EZ (CO₂). La cuenta de bifidobacterias se realizó en las placas que tenían entre 25 a 250 UFC/g (Thitaram *et al.*, 2005; Rada, 1997; Rada *et al.*, 1999; Munoa y Pares, 1988).

Se adquirieron colonias aisladas características del género *Bifidobacterium* spp (blancas, circulares de tamaño mediano), se les realizó Tinción Gram y una prueba de aerobiosis-anaerobiosis (Scardovi, 1986), la cual consiste en sembrar las colonias seleccionadas en placas con medio MRS y TOS, con L-cisteína ambos medios, se incubaron en ambiente aerobio y anaerobio respectivamente a 37 °C. Aquellas que presentaron crecimiento en el medio MRS se descartaron ya que las bifidobacterias no crecen en un porcentaje alto de O₂ (Heredía, 2010).

Las colonias obtenidas, después de 3 pruebas de aerobiosis-anaerobiosis, se inocularon en tubos con caldo MRS (0.5 gr/L L-Cisteína) a pH 6 y se incubaron a 37° C por 72 horas en condiciones anaerobias. Los tubos con crecimiento se colocaron en microtubos de 1.5 ml con tapón de rosca, conteniendo 0.3 ml de glicerol al 80% estéril y se congelaron a -20° C (cepas de estudio) y -80° C (preservación) para la caracterización molecular de las cepas obtenidas.

5.3. Caracterización de *Bifidobacterium* por técnicas moleculares.

El análisis molecular se utilizó siguiendo el protocolo diseñado por Heredia (2010), en el Laboratorio de Microbiología Molecular del CIAD., AC., para el aislamiento e identificación de bifidobacterias.

5.3.1. Extracción de ADN cromosómico.

La extracción de ADN cromosómico o total de las cepas se realizó por medio de la técnica de Marmur (Anexo 8.2), modificada en el laboratorio de Microbiología Molecular del CIAD. Para determinar la presencia del ADN, una vez extraído este, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (peso/vol) con TBE (Tris, A. Bórico y EDTA) 1X y con bromuro de etidio (0.01 g/ml) para observar las bandas específicas mediante UV.

5.3.2. Amplificación del Gen *xfp*.

Se realizó una amplificación por PCR para la determinación de la presencia de la enzima F6PPK (Anexo 8.3). La PCR amplifica un fragmento de 560 pb, específico del Gen *xfp* que codifica la producción de la enzima, utilizando los iniciadores degenerados diseñados por Sakata *et al.* (2006):

Keto For: gCYAAYCCNRWYRCYAAIggIgg

Keto Rev: TggTglgWgWASCCRTTITgITC

El fragmento se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, a 80 volts, durante 70 min, junto con un marcador de peso molecular de 100 pb en escala, la cual consiste en 11 bandas de fragmentos de ADN de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000 y 1,500. La banda de 500 pb se presenta con triple intensidad la cual sirve como una referencia (Promega). Esto es visualizado en luz UV.

5.3.3. Amplificación del Gen 16S (rRNA).

A las muestras que presentaron el Gen *xfp* que codifica para formación de la enzima F6PPK, se les realizó la amplificación de un fragmento de 1,500 pb del Gen 16S del DNAr (Anexo 8.4). Utilizando los iniciadores desarrollados por Lane (1986):

27F: AgAgTTTgATCCTggCTCAg

1492R: ggTTACCTTgTTACgACTT

La amplificación de las muestras se comprobó por electroforesis, en las mismas condiciones que para el gen *xfp* y se utilizó el mismo marcador de la escala de 100 pb.

5.3.4. Secuenciación.

Las muestras amplificadas y purificadas, de 1500 pb, del gen 16S, se enviaron al Laboratorio Macrogen en Korea para su secuenciación. Se analizaron las secuencias por medio de programa Chromas Lite (Chromas Lite 2.01), y posteriormente mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para conocer las identidades de las especies de bifidobacterias aisladas. El BLAST es una herramienta de búsqueda que se hace la comparación de las

secuencias en bancos de datos públicos, para conocer el porcentaje de similitud y/o identificación de la secuencia consultada (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El agrupamiento de las cepas se realizó mediante la comparación de las secuencias en el programa DNAMAN (<http://www.lynnon.com/>) versión 6 para windows, el cual nos ayudó a determinar los porcentajes de similitudes con las secuencias de las bacterias aisladas y para obtener el árbol filogenético.

5.4. Diseño de experimentos.

Los datos se analizaron en el paquete estadístico NCSS (2007), y se utilizó el Método no paramétrico de Kruskal Wallis, teniendo como variable de respuesta la cuenta de bifidobacterias UFC/gr de muestra. Los datos obtenidos fueron transformados a unidades de \log_{10} y se utilizó el programa SigmaPlot 10.0 para la obtención de graficas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo fue realizado en conjunto de los estudios realizados por Domínguez-Vergara (2009), quien probó el efecto de la inulina y una mezcla de fructooligosacáridos en ratas con inflamación intestinal aguda. Se concluyó en el estudio que el consumo de inulina de *Agave tequilana* Weber o de la mezcla FOS/GOS modulan el crecimiento de coliformes (inhibió), aunque no de lactobacilos (sin cambio). Además que la inulina mostró un efecto protector contra el DSS al 3%, retrasando la aparición de la inflamación, y disminuyendo el tiempo de recuperación de las ratas, mientras que la mezcla FOS/GOS, presentó un efecto negativo, aditivo al del DSS al 3%. En los animales de experimentación no hubo adición intencional de ninguna bacteria, sólo se buscó probar el efecto de la inulina de *Agave tequilana* y la mezcla FOS/GOS, sobre la microbiota intestinal residente de los animales.

6.1. Desarrollo de las ratas *Sprague Dawley* durante el experimental.

Se partió de ratas que tenían características fisiológicas similares para el presente estudio. Durante el período de adaptación de los animales a las 3 diferentes dietas, las ratas no mostraron retraso en el crecimiento o algún signo de diarreas imputables al tipo de dieta consumida. Sólo se observaron diferencias en el tamaño y color de las heces de cada grupo. Una coloración normal en las heces es por causa de la bilirrubina, la cual es un compuesto secretado en forma de bilis en el intestino delgado y se transforma en biliverdina por causa de la microbiota intestinal dando así un color oscuro marrón casi

negro (entre mayor exposición al aire). El aspecto de las heces da una idea general sobre la salud intestinal de un individuo.

Las ratas del grupo A y B alimentadas con inulina y con la mezcla de FOS/GOS, respectivamente, mostraron heces blandas, pequeñas y oscuras. Por otro lado, los del grupo C alimentadas con celulosa, las heces mostraron ser consistentes, formadas, firmes, grandes y de color café claro (Figura 11). Los prebióticos (inulina, FOS y GOS) utilizados en este estudio son fibras solubles y la celulosa es una fibra insoluble, por lo cual tienen diferentes efectos en las características particulares de las heces. El efecto que provoca una fibra depende mucho de su composición y funcionalidad (López Román *et al.*, 2008).

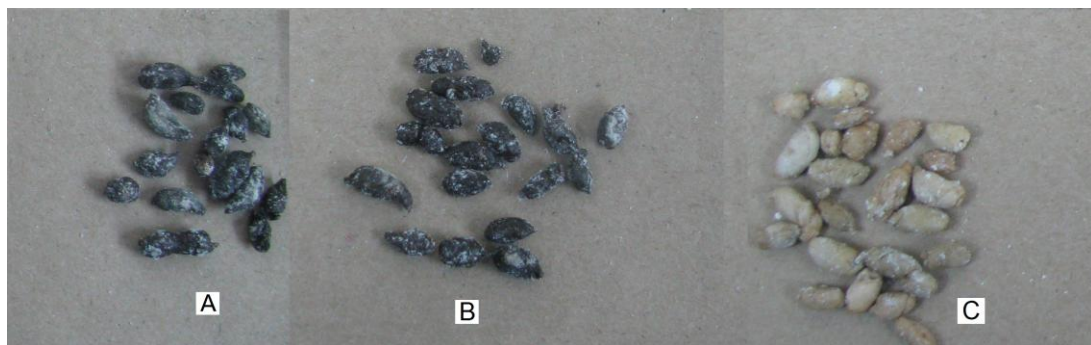


Figura 11. Heces características según la dieta.

El contenido de fibra en un alimento es necesario, ya que conlleva a un beneficio de salud. Los prebióticos pasan por el estómago sin ser degradados, estas fibras, llegan al intestino delgado formando soluciones viscosas, donde se incrementa el espesor de la capa de agua que transporta los alimentos digeridos disminuyendo así la absorción de glucosa, lípidos y aminoácidos por la falta de contacto con la membrana del enterocito (Escudero y González, 2006). Además, existe una disminución en la absorción de ácidos biliares, por consiguiente disminuye la absorción de las grasas. Esto es a causa de la formación de enlaces de tipo fenólico y urónico en la matriz de polisacáridos con los ácidos

biliares (Trantwein *et al.*, 1999). Después, estos llegan al intestino grueso y los prebióticos (principalmente en el colon) son metabolizados por la microbiota intestinal (Escudero y González, 2006), así se desarrollan metabolitos los cuales ayudan a la funcionalidad del tracto gastrointestinal.

La celulosa es un polisacárido de unidades monoméricas de β -glucosa que no puede ser metabolizada por las enzimas del humano y tampoco por su microbiota, pero existen animales, como los rumiantes que producen la enzima celulasa la cual es capaz de romper el enlace β -glucosídico, quedando las glucosas libres como fuente de energía (<http://es.wikipedia.org/wiki/Celulosa>). Uno de los beneficios de la fibra insoluble es el incremento de la masa de las heces que acelera el movimiento intestinal y como consecuencia ayuda a una mejor evacuación (Mataix y Gassull, 2002). En las heces de las ratas alimentadas con celulosa, se observó un mayor volumen en comparación con las otras dietas, además su color café claro puede ser a causa de que el metabolismo de componentes o sustratos es menor en comparación con aquellas dietas que involucraron a los prebióticos.

En la disección de las ratas de los grupos A, B y C se observó que sus órganos internos tenían un buen aspecto, la coloración del hígado, bazo y riñones se observaron normales. Esto es un punto importante ya que indica que el tratamiento de las dietas con los prebióticos a simple vista, no causa daño alguno a los órganos principales. Por otro lado, en este estudio se observó que en los grupos A y B (prebióticos), las ratas presentaron una ligera hinchazón del intestino grueso y producción de gas (al observar el intestino se apreció un movimiento como de gusano) probablemente por la fermentación de los carbohidratos de la dieta (Figura 12). Los metabolitos que se forman a partir de carbohidratos prebióticos por las bacterias (bifidobacterias y lactobacilos) son principalmente los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), ácido acético, láctico, propiónico y butírico. Además en menor grado dióxido de carbono (CO_2) e hidrógeno (H_2) (Cummings y Englyst, 1995). De esta manera, los productos de la

fermentación por la presencia de prebióticos, como los utilizados en el presente trabajo, pueden provocar flatulencias o gases y se puede tomar como un efecto adverso a la dieta sin mayor consecuencia negativa.

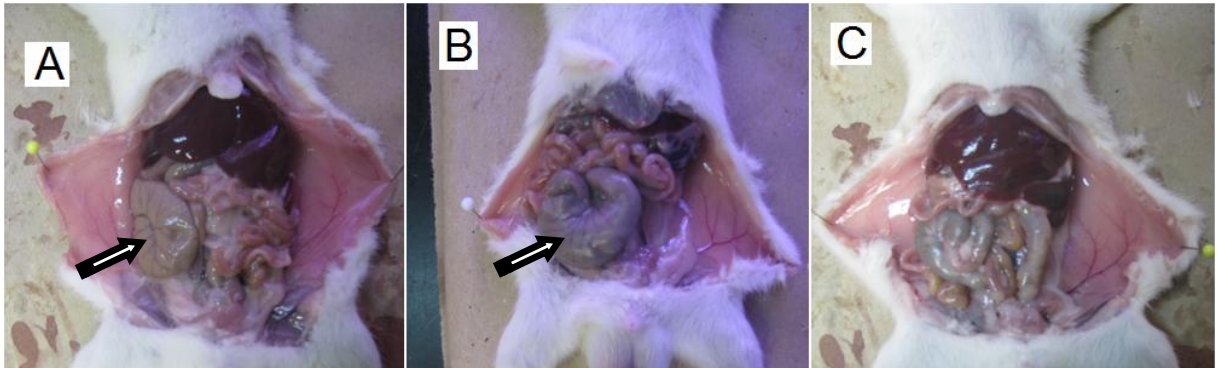


Figura 12. Disección de los ratones en el día 4 del experimental. A, rata alimentada con inulina de agave; B, rata alimentada con FOS/GOS y C, rata control.

6.1.1. Tratamiento con DSS.

Al iniciar el tratamiento con DSS al 3%, las ratas del grupo E (alimentada con FOS/GOS) mostraron una colitis aguda más severa que los grupos D y F. Los signos de la colitis se presentaron a los 3 días del tratamiento con el DSS al 3% y se manifestaron con falta de apetito, pérdida de peso, diarrea abundante con sangre, moco y olores fétidos, es por ello que se suspendió el tratamiento con DSS del 3% al 3° día. En el día 17 del experimental, 2 de las ratas murieron en este grupo y en el día 18, otra más, pudiendo ser atribuible a la combinación de la dieta de FOS/GOS y el tratamiento con DSS.

Tanto los FOS como los GOS, son oligosacáridos de cadenas cortas, no metabolizadas por el hospedero. Las bacterias del colon si metabolizan estos carbohidratos y se ha observado que son metabolizados más rápido que la inulina de achicoria (Roberfroid *et al.*, 1998). Se han realizado estudios donde se encontró que la velocidad de fermentación de los prebióticos está afectada por el

largo de las ramificaciones de la cadena polisacárida. Estos datos muestran que específicamente inulina y FOS, son metabolizados rápidamente de manera total y que entre más larga la cadena, más tiempo toma en ser degradados por la microbiota (Van Loo *et al.*, 1995; Rossi *et al.*, 2005; Perrin *et al.*, 2002). Además en análisis más detallados observaron que con moléculas con un grado de polimerización (GP) <10, la velocidad de degradación fue el doble de rápido, que aquellas con GP >10 (Roberfroid *et al.*, 1998). Sin embargo, esto puede manifestarse con una diarrea más profusa en comparación con una dieta que contiene inulina con un GP alto, sobre todo, si el individuo no está acostumbrado con un alimento que contenga estos carbohidratos (Coussement, 1999).

Las ratas alimentadas con FOS/GOS y tratadas con DSS (grupo E) presentaron deterioro de sus órganos (Figura 13). Además, antes del sacrificio, las ratas se observaron débiles y el aspecto de su pelaje se tornó seco y sin brillo. Se observó necrosis en el intestino delgado, formación de gases y partes de los intestinos grueso y delgado, se encontraban endurecidos.

El DSS es un compuesto químico que se ha utilizado para simular una enfermedad inflamatoria en el intestino. Un estudio realizado en ratas adultas albinas (200 g) mostró los efectos causados por este compuesto, a una concentración del 4%, durante 7 días; se observó que a los 2 días del tratamiento se presentaba inflamación y derrame del epitelio, ya que la permeabilidad del intestino se incrementa, a los 5 días el epitelio se lisó en áreas adjuntas y se presentó fibrosis en el día 7 (Venkatraman *et al.*, 2000). De esta manera, la combinación de los FOS/GOS y el DSS afectó negativamente a las ratas, ya que por la presencia de estos prebióticos de cadena corta, donde el metabolismo de los carbohidratos fue más rápido en comparación con la inulina, las ratas no podían obtener los nutrientes necesarios, por ello los signos que se presentaron de la enfermedad y de malnutrición. De esta manera, la recuperación del grupo E fue lenta, casi nula, aún en el último día del sacrificio.



Figura 13. Disección ratas a los 17 días del tratamiento. D, rata alimentada con inulina y DSS al 3.0%; E, rata alimentada con FS/GOS y DSS al 3.0%; F, rata control alimentada con celulosa y DSS al 3.0%.

Las ratas alimentadas con inulina y el tratamiento con DSS (E), tuvieron síntomas similares a los del grupo F (FOS/GOS). Sin embargo tuvieron mejor resistencia a la combinación de la dieta y el tratamiento con DSS al 3%. En el día 21 del experimental, la recuperación fue más rápida en los tratamientos con inulina y la combinación FOS/GOS, en comparación a los grupos alimentados con celulosa (grupo F). La recuperación fue de 2 a 3 días, después de que se suspendió la administración de DSS, aun cuando presentaban diarrea y sangre en heces, pero menos fuerte que el grupo E. Entre los productos finales del metabolismo de carbohidratos de las bifidobacterias, son los ácidos grasos de cadena corta, entre ellos el ácido butírico, el cuál es utilizado por los colonocitos para la producción de energía y por lo tanto, para la reparación de los daños ocasionados por el DSS (Mutsunori *et al.*, 2003). Venkatraman *et al.* (2000) indujeron una colitis en un grupo de ratas, a las cuales después les administraron butirato y encontraron que la permeabilidad del epitelio regresaba a la normalidad. La rápida recuperación de las ratas, puede ser un indicio de la presencia de un importante número de *Bifidobacterium*, ya que estas producen el ácido butírico en mayor porcentaje, mientras que los lactobacilos producen más el ácido acético y láctico. Rossi *et al.*, (2005) determinaron que la inulina en

comparación con FOS afecta la producción de ácido butírico aumentándola más del doble, que cuando las bifidobacterias consumen los FOS. También se pudo observar durante el último sacrificio, que el grupo alimentado con inulina tenía un mejor aspecto en la salud de las ratas, que aquellas alimentadas con FOS/GOS. Estas últimas, aún presentaban signos de la enfermedad provocados por el DSS, sin ninguna señal de recuperación.

El grupo control de ratas con el tratamiento con DSS no se recuperaron tan rápido en comparación con aquellas alimentadas con inulina. Mostraron los mismos signos de la enfermedad inducida que los otros grupos, como diarrea abundante con sangre (heces de color café claro) y moco. Aunque aun así este grupo manifestó una mayor fortaleza en la inflamación que aquellas que fueron alimentadas con FOS/GOS.

6.2. Análisis microbiológico.

Se ha observado que el tamaño de las colonias de bifidobacterias puede llegar a variar de acuerdo a las especies en el medio de cultivo. El medio TOS es una preparación específica para enumerar las bifidobacterias cuando se encuentran en mezcla con bacterias ácido lácticas (BAL). En este medio, las BAL generalmente crecen más pequeñas que las bifidobacterias y de color opaco, de esta manera se pueden distinguir entre ellas. Este medio de cultivo, fue desarrollado por Rada (1997), quien determinó que el grupo de bifidobacterias que utilizó eran resistentes a la mupirocina, mientras que por otra parte, todo el grupo de lactobacilos que fueron aislados eran susceptibles a dicho antibiótico.

En un estudio realizado por Thitaram *et al.* (2005) aislaron y enumeraron *Bifidobacterium* spp., de heces de gallinas, utilizaron el medio TOS donde le adicionaron mupirocina y ácido acético glacial. De esta manera, confirmaron que

el crecimiento de las bifidobacterias no se inhibía comparándolo con el medio control, sin el antibiótico y el ácido.

Se seleccionó un 10% de las colonias contadas en cada ensayo, para determinar la morfología de las bacterias aisladas. Se realizó la Tinción de Gram (Anexo 2) y se observaron en el microscopio (100 X) bacterias Gram + en forma de bacilos, “Y” y “V” en su mayoría (Figura 14), las cuales son formas características de las bifidobacterias (Biavati y Mattarelli, 2001). En alguno de los casos se observaron bacterias en forma de cocos mezcladas con otras en forma de “Y y V. Estas mezclas se purificaron hasta obtener sólo bacilos, o se descartaron en los casos donde no se pudieron separar las diferentes formas celulares.

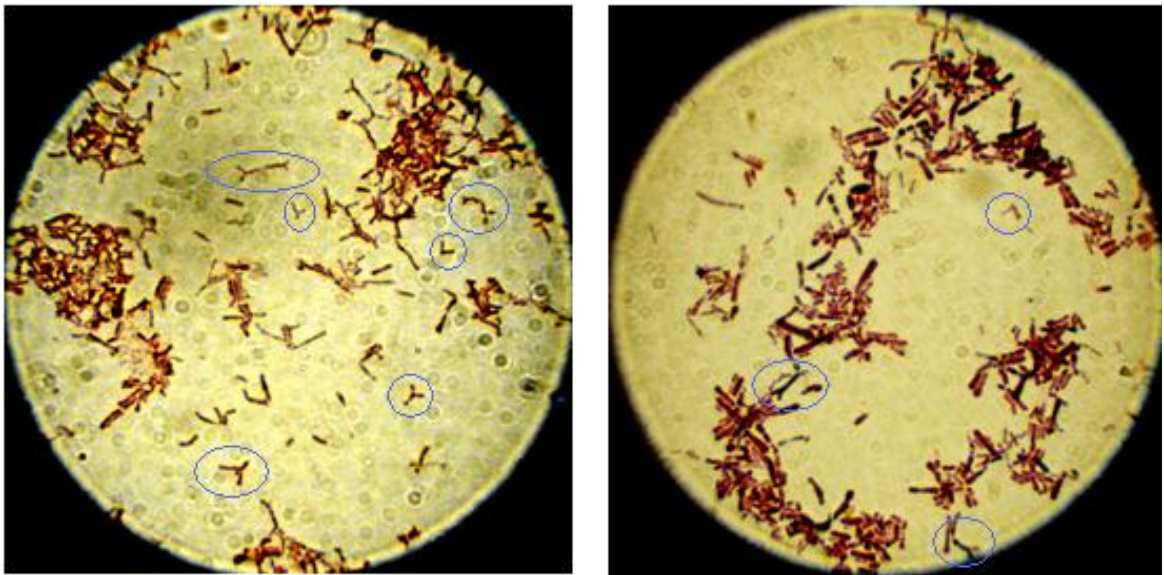


Figura 14. Tinción Gram de control (izquierda, *Bifidobacterium animalis*) y muestra de bifidobacterias (derecha, cepa 2-C1S11), formas características de bifidobacterias encerradas en círculos azules.

La cuenta de bifidobacterias de cada sacrificio se expresó en UFC/g de heces, las cuales fueron transformadas a Log_{10} , para el análisis estadístico. Se contaron colonias características para bifidobacterias, las cuales son colonias blancas, grandes y redondas (Figura 15), en las placas con agar TOS, adicionadas con L-cisteína y Mupirocina.

En la Figura 16 se presentan los datos obtenidos de las cuentas bacterianas para cada uno de los grupos. En la parte superior de la figura se muestra las cuentas de las ratas control (A, B y C), es decir, solo aquellas que fueron alimentadas con las diferentes dietas y a las que no se indujo la inflamación con el DSS 3%. En la parte inferior se muestran los grupos de ratas alimentadas con las diferentes dietas y que se les indujo el tratamiento con DSS al 3% (D, E y F). En el día 4 de ingestión de la dieta control (celulosa), el que consideramos el punto de partida para todas las ratas utilizadas en el estudio, se obtuvo una cuenta de bifidobacterias de 2×10^8 UFC/g (8.3 Log_{10} UFC/g) de heces.

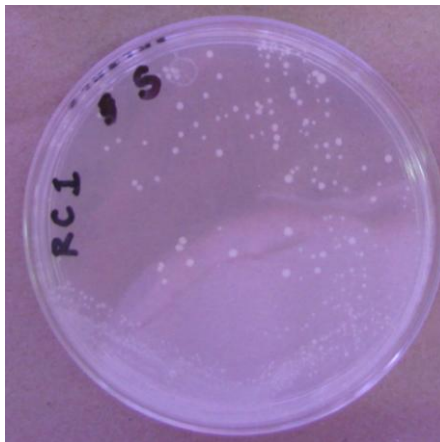


Figura 15. Colonias características de Bifidobacterias, aisladas en el medio TOS, de los animales del estudio.

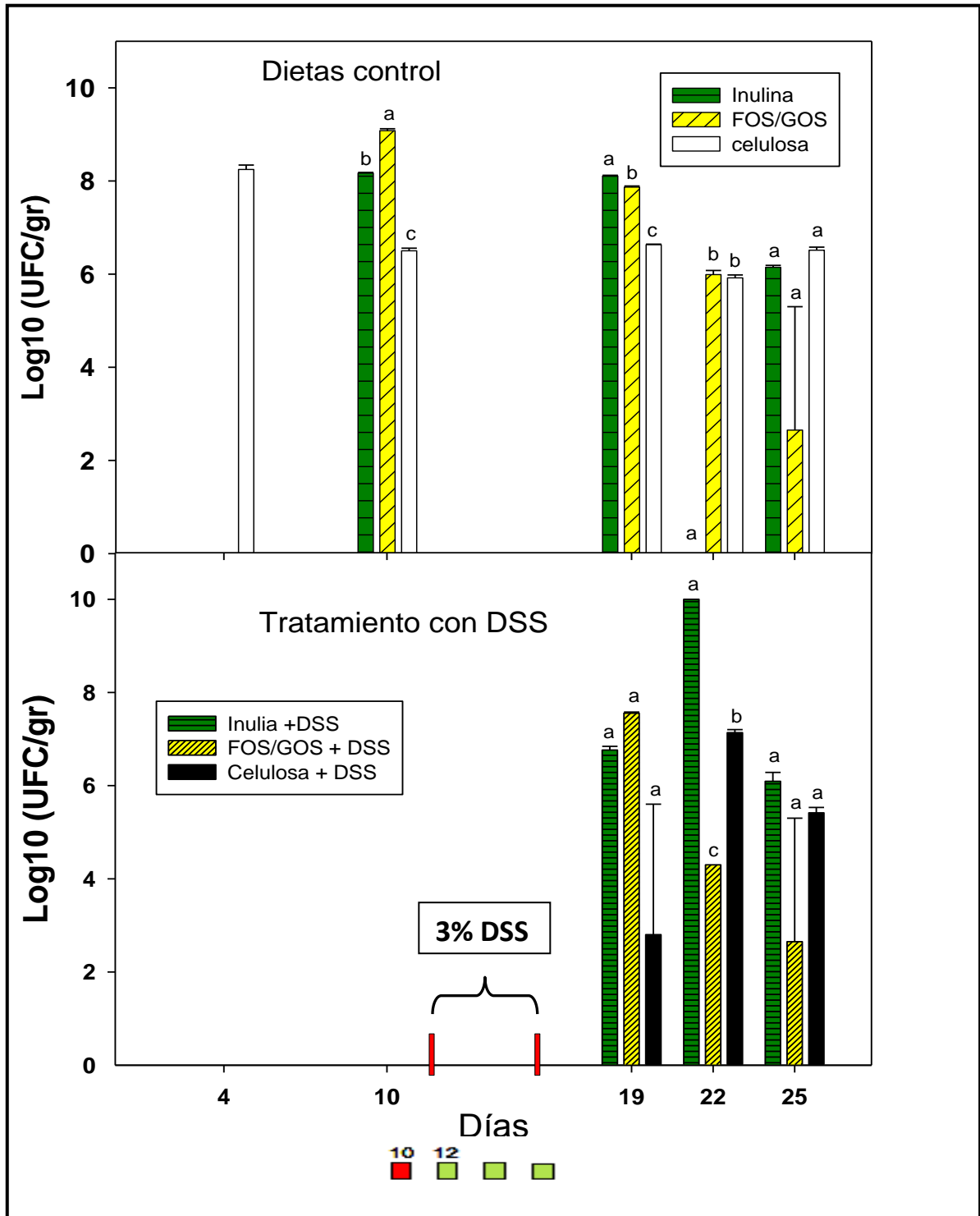


Figura 16. Cuenta de Bifidobacterias obtenidos para cada uno de los grupos de estudio. Parte superior del gráfico se muestran las cuentas bacterias de los grupos A, B y C: en la parte inferior, los grupos D, E y F, tratadas con DSS al 3%.

En las cuentas de bifidobacterias del día 10, se observó que las cuentas de los grupos de FOS/GOS (B) e inulina (A), son mayores en comparación con la dieta con celulosa (C), encontrándose diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los 3 grupos. Los grupos alimentados con inulina y celulosa se mantuvieron más o menos estables, de acuerdo a las cuentas del día 19, pero aquellas alimentadas con FOS/GOS disminuyeron las cuentas por debajo de inulina, de forma significativa ($P < 0.05$), mientras que en los otros días no se observó diferencia entre las cuentas. Existe mucha variabilidad en los estudios realizados sobre el contenido de bifidobacterias en diferentes animales, en condiciones normales, por ejemplo para conejos se ha encontrado 3×10^3 UFC/g (Rada *et al.*, 1999), en humanos 5×10^6 UFC/ml (Marteau *et al.*, 2001), en gallina 4×10^9 UFC/g (Rada *et al.*, 1999). Es difícil hacer la comparación del dato de las cuentas para las ratas *Sprague Dawley*, ya que sólo se encontraron los datos para el ratón (*Mus musculus*), que es de 7.02 Log_{10} UFC/g de heces, para ratas (*Rattus norvegicus*) de 5.8 Log_{10} UFC/g de heces (Rada, 2002), y de acuerdo este mismo autor, las cuentas para humanos es de 9.79 Log_{10} UFC/g de heces.

Kolida *et al.* (2007) observaron un aumento en la población de bifidobacterias mediante un tratamiento de inulina, con 2 diferentes dosis, la determinación fue realizada con la técnica de FISH. En el estudio de Kolida, utilizaron 8 g/día de inulina (dosis alta) provocando un efecto bifidogénico, pero en otro estudio, también monitoreado por FISH, donde utilizaron 10 g/día no se encontró tal efecto (Bouhnik *et al.*, 2004). De esta manera la falta de selectividad de métodos impide la evaluación eficiente de los prebióticos utilizados, aunque debe tomarse en cuenta que las bifidobacterias son difíciles de cuantificar por las condiciones de crecimiento que necesitan.

Posteriormente, conforme pasaron los días de los muestreos en las dietas control se observa variabilidad en las cuentas de bifidobacterias, sin embargo la tendencia es que se mantengan las cuentas de las bacterias más altas con la dieta que contiene inulina, seguida de FOS/GOS y finalmente el

control. Esto nos dice que los prebióticos utilizados muestran un efecto bifidogénico en la microbiota normal de las ratas, en comparación con el control y la disminución de las cuentas en todas las dietas, puede deberse a la maduración de los animales. Se tiene bien establecido que a pesar de que la microbiota del colon es relativamente estable durante la vida adulta, se producen cambios en el tracto gastrointestinal, además con el cambio de la dieta, lo que produce cambios en el sistema inmunológico que afectan inevitablemente la composición de la población microbiana (Rada, 2002).

Se ha determinado la presencia de un mayor número de anaerobios facultativos en el tracto intestinal durante la maduración, en relación de los organismos benéficos como *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp., así como la variabilidad de especies, desencadenándose así una serie de cambios en la fisiología digestiva, haciendo más lento el tránsito intestinal y aumentando el contenido de bacterias putrefactoras y la aparición de diferentes enfermedades (Woodmansey, 2007). Las ratas utilizadas al término del experimental tenían un peso entre 170 y 260 g (contemplando los 6 grupos), donde se considera adultos a ratas machos *Sprague Dawley* en relación al peso de 450 a 520 g (<http://aceanimals.com/SpragueDawley.htm>), además la madurez sexual del macho ocurre a los 40-60 días, con un peso de 100 a 140 g y podríamos decir que los grupos de ratas llegaron a la maduración fisiológica.

Se observó que las ratas enfermas por el tratamiento con DSS al 3% y que fueron alimentadas con inulina de agave (grupo D) mostraron una recuperación más rápida, en comparación con aquellas alimentadas con la mezcla de FOS/GOS. La cuenta de bifidobacterias en el día 22 del experimental fue la más alta, que la dieta con FOS/GOS (4.3 Log₁₀ UFC/g) y presento un diferencia significativa (P<0.05) entre los grupos de ratas enfermas.

Para la cuenta de bifidobacterias del día 22 de las ratas alimentadas con inulina de agave y el tratamiento con DSS se esperaba que la cuenta no disminuyera en comparación con el control, por ello se realizaron las mismas diluciones del sacrificio anterior, pero en realidad se obtuvo una cuenta fuera del rango. Las placas mostraron una sobre población las cuales fueron imposibles de contar, por ello se tomo como valor estimado (ve), y la barra solo es representativa y hacer notar tal acontecimiento.

La cuenta de bifidobacterias de las ratas alimentadas con inulina y con el tratamiento con DSS del día 25 fue menor ($6.09 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$), en comparación con la cuenta del día 22, pero en comparación con aquellas alimentadas con FOS/GOS fue mayor ($5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$), además con FOS/GOS presentaron menor crecimiento aun que las dietas con celulosa. Por otro lado, la dieta que contenía FOS/GOS no disminuyó los efectos de la inflamación por el DSS al 3% donde además la población de bifidobacterias disminuyó en este mismo día del experimental (Figura 16). En este punto del tratamiento la inulina de agave mostró un mejor efecto en la salud intestinal y su aspecto, además en las evacuaciones de las ratas el sangrado se vio disminuido, en comparación con aquellas que fueron alimentadas con FOS/GOS, aproximadamente entre el día 21-23 del experimental. Para ello las ratas tenían aprox. 6 días sin el tratamiento con DSS al 3%.

6.3. Caracterización de las cepas obtenidas por técnicas moleculares.

PCR Gen F6PPK. Se seleccionaron 114 cepas de las heces de ratas sacrificadas y que presentaron crecimiento característico de bifidobacterias. Después de la búsqueda de la presencia del Gen *xpf* que codifica la enzima F6PPK, por medio de la técnica de PCR, se obtuvieron 32 cepas positivas. Como controles de PCR se utilizaron: control negativo (*L. reuteri* ATCE 53608 y

Enterococcus BC) y control positivos (*B. infantis* ATCC 15697 y *B. lactis* Bb12). Aquellas muestras que resultaron negativas se les repitió la prueba, si la tercera repetición continuaba siendo negativa, se descartaba como otras cepas, no del género *Bifidobacterium*. En la figura 17 se muestran los resultados de 9 de las cepas seleccionadas en base a la morfología colonial, de las cuales solo la muestra del carril 8 es negativa. La banda que se observa más intensa es un fragmento de 550 pb, lo cual concuerda con los reportes de los autores que diseñaron los primers utilizados. Estos mismos primers han sido utilizados previamente en nuestro laboratorio donde se combinó el medio de cultivo TOS y el PCR de la F6PPK, para el aislamiento y selección de cepas de *Bifidobacterium* spp (Heredia, 2010).

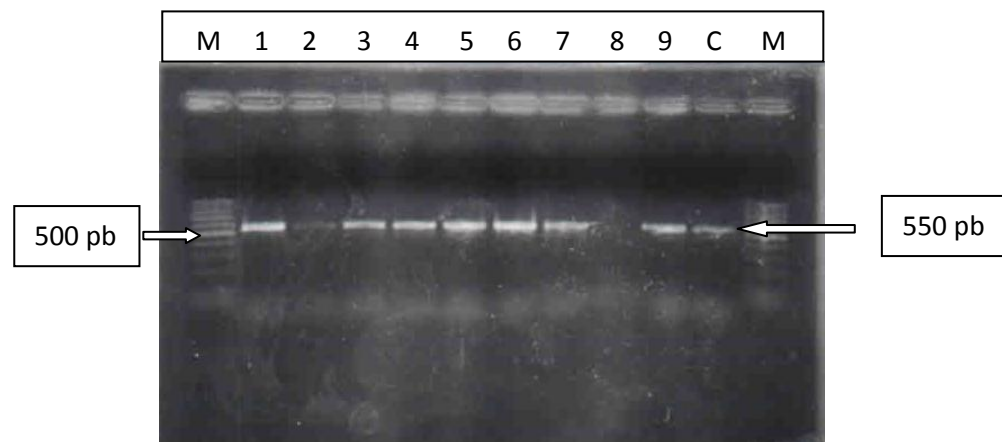


Figura 17. Muestras positivas de Bifidobacterias, 1-7, 9, control 10 (*Bifidobacterium lactis*); M, marcador de peso molecular (100 pb ladder).

PCR del Gen 16S del Operon ribosomal. Los genes 16S del ADNr han sido utilizados como marcadores moleculares para el estudio de una gran diversidad de bacterias, tanto para fines taxonómicos, como filogenéticos. Las principales razones son: i) su presencia en casi la mayoría de las bacterias está en forma de una familia multigenómica u operón; ii) La función del gen 16S no ha sufrido cambios en el tiempo, sugiriendo que los cambios al azar de las

secuencias son una medición del tiempo segura (evolución); y iii) El tamaño del gen 16S (aprox. 1500 pb) es lo suficientemente grande para hacer el análisis estadístico de las secuencias (Janda y Abbot, 2007; Woo *et al.*, 2008).

Se amplificó el fragmento completo de 1500 pb del ADNr 16S (Figura18), esto se realizó a las 32 cepas de nuestras muestras que resultaron positivas en la determinación del gen que codifica la F6PPK. La imagen muestra un gel de agarosa, en el cual se corrieron algunas de las muestras. El gel es de 12 carriles, donde el primero (M) se observa el marcador de la escalera de 100 pb y el primer fragmento que se aprecia es de 1500 pb. Los carriles del 2 al 8 y el 10 muestran el fragmento del gen 16S y el 11 (C) es una cepa control de *Bifidobacterium lactis*. Aquellas cepas que no se amplificaron solo se repitieron, hasta obtener los 32 fragmentos de las cepas como posibles bifidobacterias.

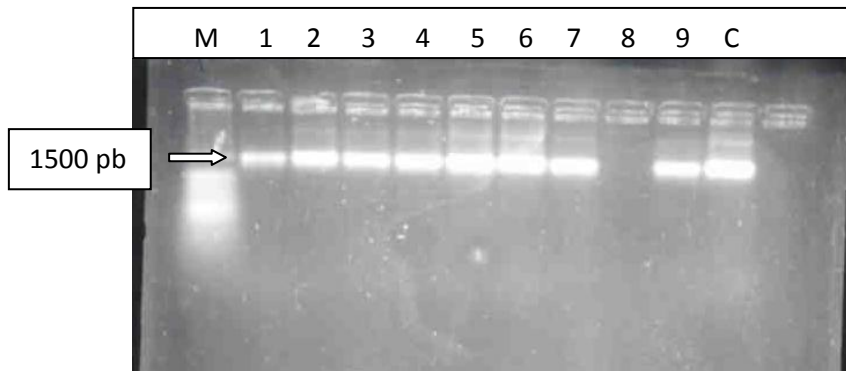


Figura 18. Amplificación de un fragmento 1500 pb del Gen 16S para la secuenciación, muestras 1-9, control 10 (*Bifidobacterium lactis*); M, marcador de peso molecular (100 pb ladder).

6.3.1. Análisis de las Secuencias.

Del fragmento completo de 1500 pb del ADNr 16S, se envió a secuenciar sólo la primera zona variable de las secuencias, que corresponde a los primeros 500-580 pb, utilizando primers universales. Lo anterior debido a que se sabe

actualmente que para la mayoría de los aislamientos clínicos, la secuencia inicial de 500pb produce una diferenciación adecuada para la identificación y de hecho puede proveer el mayor porcentaje de diferenciación entre cepas ya que es la región que muestra mayor diversidad por kilobase secuenciada (Clarridge, 2004). Bordetella presenta el 66% de su variabilidad en el gen 16S en los primeros 500 pb (Kattar *et al.*, 2001).

Las secuencias obtenidas, se analizaron en el programa Chromas Lite (2.01). En este programa se puede observar el gráfico de las secuencias, la pureza del ADN secuenciado y permite corroborar que la base o nucleótido que lee el secuenciador, corresponde al observado en el espectro. Con este programa se puede hacer modificaciones de las bases, según la intensidad de la línea o pico de los nucleótidos cuando existe alguna indeterminación en la lectura, lo que puede dar una lectura errónea de la base correspondiente (Figura 19). Posteriormente se realizó un análisis de las secuencias nucleótídicas de la base de datos pública del GCG, utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), el cuál proporcionó la identidad de las cepas comparando las secuencias, así como el porcentaje de homología de las secuencias analizadas (Tabla 3). Las especies predominantes aisladas fueron *B. animalis* (24) y *B. pseudolongum* (5).

Es importante considerar hasta qué punto es necesario secuenciar todo el gen 16S o hasta donde los fragmentos más cortos, comúnmente reportados proveen información que pueda ser comparable en las bases de datos. La secuencia de los 1500 pb será necesaria sólo si se quiere diferenciar taxones particulares o a nivel de cepas de bacterias y cuando se describe alguna nueva especie. Sin embargo algunos trabajos han sido realizados utilizando secuencias de diferentes tamaños de fragmentos del 16S (400 o aun menos de 200 pb), produciéndose dendrogramas o agrupamientos muy similares (Clarridge, 2004).

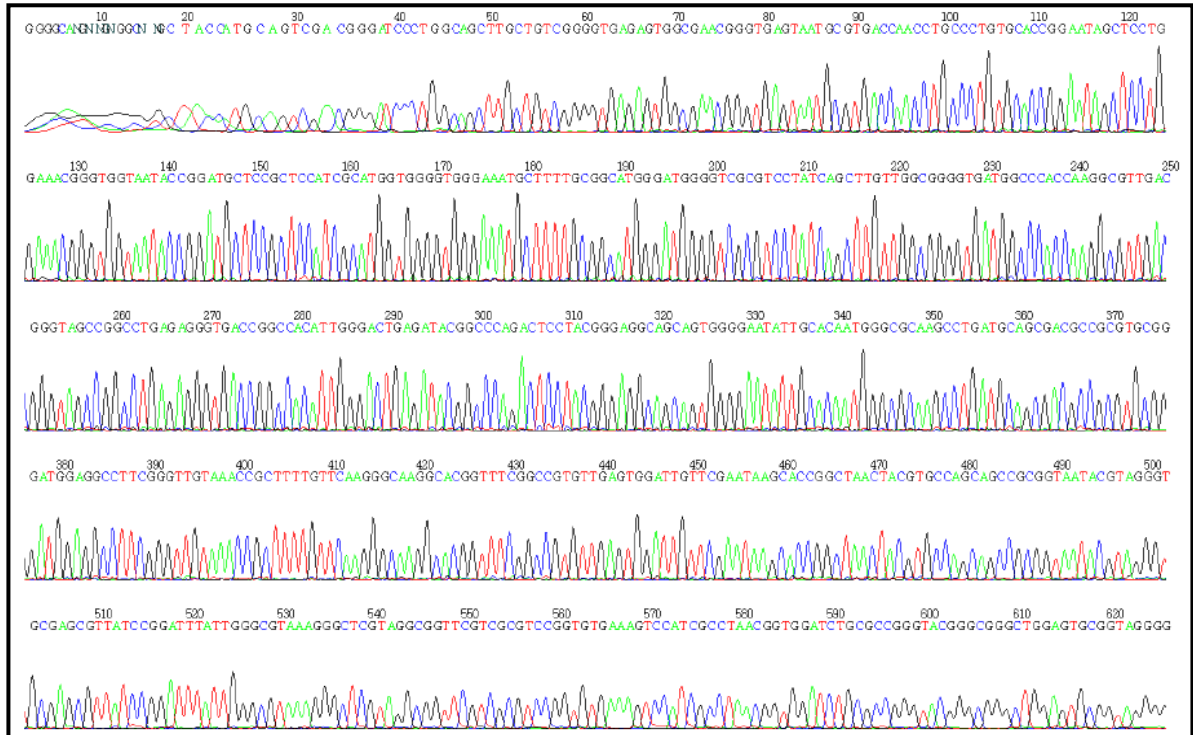


Figura 19. Ejemplo de los archivos de las secuencias. Los datos pertenecen a la cepa 34 y que fue identificada como *B. animalis* subsp *animalis*.

Las especies fueron identificadas a nivel de subespecie para ambas especies predominantes: *B. animalis* subsp *animalis* (21 cepa); *B. pseudolongum* subsp *pseudolongum* (5 cepas); *B. animalis* subsp *lactis* (3 cepas). Otra cepa aislada no pertenece a estas dos especies predominantes de *Bifidobacterium*, y dos cepas no pertenecientes al género: *Lactobacillus* y *Enterococcus*.

Tabla 3. Identidad de las especies de *Bifidobacterium* spp aisladas del TGI de las ratas, alimentadas con diferentes dietas.

No de cepa	Clave cepa	Dieta	Identidad	% Homología	Clave de referencia (Base de datos)
Preliminar					
1	P3	Celulosa (control)	<i>Lactobacillus reuteri</i>	89	gb EU547309.1
I					
2	C1S11	Control	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	99	dbj D86185.1
3	C2S12	Control	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	96	gb GU361812.1
II					
4	XXF2.14	FOS/GOS	<i>Enterococcus faecium</i>	100	gb HQ005363.1
5	XXF1.2	FOS/GOS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	81	dbj AB507070.1
III					
6	XXXI27	Inulina	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	99	gb GU361812.1
7	XXXID24	Inulina/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>		
8	XXXID26	Inulina/DSS	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	98	gb GU902754.1
9	XXXF24	FOS/GOS	<i>Bifidobacterium</i> sp.	86	gb FJ518641.1
10	XXXFD8	FOS/GOS/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	98	gb GU361812.1
11	XXXFD19	FOS/GOS/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i>	96	dbj D86185.1
12	XXXFD8	FOS/GOS/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i>	99	dbj D86185.1
IV					
13	IVI13	Inulina	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	99	gb GU361812.1
14	IVI17	Inulina	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	99	dbj AB507070.1
15	IVI122	Inulina	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	99	gb CP001892.1
16	IVI18	Inulina	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	97	dbj AB507070.1
17	IVI111	Inulina	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	92	dbj AB507070.1
18	IVI114	Inulina	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	99	dbj D86185.1
19	IVID17	Inulina/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	91	dbj AB507070.1
20	IVID21	Inulina/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	99	gb GU361812.1
21	IVID22	Inulina/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	91	gb GU361812.1
22	IVID17	Inulina/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i>	79	dbj AB507070.1

			subsp. <i>Animalis</i>		
23	IVID210	Inulina/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	90	gb CP001606.1
24	IVID110	Inulina/DSS	<i>Bifidobacterium</i> <i>pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	99	dbj AB116335.1
25	IVF28	FOS/GOS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	90	gb FJ518654.1
26	IVCAD14	Control/DSS	<i>Bifidobacterium</i> <i>pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	98	dbj AB507143.1
27	IVCAD111	Control/DSS	<i>Bifidobacterium</i> <i>pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	100	dbj AB507143.1
28	IVCAD29	Control/DSS	<i>Bifidobacterium</i> <i>pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	92	dbj AB507144.1
29	IVCAD211	Control/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	91	gb GU361812.1
30	IVCAD213	Control/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	97	emb AM902692.1
V					
31	VID27	Inulina/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	84	gb GU361812.1
32	VFD13	FOS/GOS/DSS	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Animalis</i>	97	gb GU361812.1

Los números romanos representan los diferentes sacrificios del experimental.

El aislamiento de *Enterococcus faecium* en este estudio fue del grupo de ratas alimentadas con la dieta que contiene FOS/GOS, lo que indica que *E. faecium* es capaz de fermentar alguno de estos dos prebióticos (oligosacáridos de cadenas cortas). La presencia de *Enterococcus faecium* fue inesperada, aunque ya se ha determinado que otras especies diferentes a las bifidobacterias y lactobacilos metabolizan los FOS y GOS como ya se había mencionado. Anteriormente, la especie *Enterococcus faecium* se conocía como una especie dentro del grupo de *Streptococcus*, pero por estudios realizados (Hibridación ADN-ADN y secuenciación) se concluyó que es distinta a este género y la incluyeron en el género *Enterococcus* (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984).

Los enterococos son gran positivos, no esporulan, son catalasa y oxidasa negativo y es un coco anaerobio facultativo. Se encuentran distribuidos en el

ambiente, principalmente en el tracto intestinal de humanos y animales. También se pueden encontrar en la superficie de aguas, plantas, vegetales e insectos (Mundt, 1986). El género *Enterococcus* son microorganismos que se encuentran dentro del grupo conocido como bacterias ácido lácticas. Este tipo de bacterias contribuyen principalmente al sabor y textura de quesos tradicionales (Manolopoulou, 2003). Tiene la capacidad de resistir temperaturas de pasteurización, es por ello que los enterococos son utilizados para la preparación de productos fermentados (quesos, embutidos) y además actualmente son empleados como probióticos.

El *Enterococcus faecium* SF 68 es desarrollo en Suiza utilizado como un probiótico y se recomienda para prevenir diarreas asociadas con los antibióticos y diarreas en niños (Cylactin\ LBC SF68 ME10, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland). Se han desarrollado diferentes cepas de *E. faecium* que se encuentren contenidas en ciertos productos con potencial probiótico. El uso de *Enterococcus* como probióticos se toma como un tema controversial, ya que existen especies dentro de este grupo que están asociadas con enfermedades en el humano y a la resistencia a antibióticos. Es por ello que se tiene cierto temor que en algún momento los factores de virulencia sean transferidos a otras bacterias contenidas en el tracto gastrointestinal que se consideren benéficas para el hospedero (Franz *et al.*, 2003). La presencia de esta bacteria causa cierto conflicto, por ello es recomendable investigar más detenidamente este tipo de cepas.

Las bifidobacterias lograron aislarse de las 3 diferentes tipos de dietas, de donde se obtuvieron 114 cepas de los cuales 32 fueron F6PPK positivas y 30 resultaron Bifidobacterias confirmadas por secuenciación. Esto indica que del total de colonias aisladas el 31% fueron Bifidobacterias. Este dato es similar al encontrado por Hartemink y Rombouts (1999) quienes utilizaron el medio de cultivo RB (Rafinosa *Bifidobacterium*) para cuantificar y determinaron que de las colonias aisladas de heces en cerdos, el 30% de ellas eran bifidobacterias.

Mikkelsen *et al.* (2003) utilizaron el mismo medio y obtuvieron el 2% en 2 de 3 grupos de muestras, pero con el medio modificado de Wilkins-Chalgren (MW) determinaron el 30% de los 3 grupos. Las medidas con las que se realiza el aislamiento y determinación de bifidobacterias son tomarse en cuenta y con estos datos obtenidos se observa que se encuentran dentro de un resultado confiable.

Se ha determinado que el mayor número de bifidobacterias es aislado del contenido fecal del colon de humanos y animales. Nilsson y Bjorck (1988) demostraron que aparentemente toda la inulina y el almidón que llega al intestino se fermentan, principalmente en el colon. En las heces sólo se encontraron cantidades mínimas de la inulina suministrada a las ratas, las cuales fueron alimentadas con fructanos de cereal e inulina en diferentes concentraciones y observaron un aumento en la población de bifidobacterias. Amaretti *et al.* (2007), demostraron la preferencia de *B. adolescentis* MB 239 por los oligosacáridos sobre monosacáridos. Este comportamiento fermentativo indica la adaptación de la especie a un nicho ecológico especial del ambiente colónico, donde los monosacáridos están naturalmente ausentes. Además la producción simultánea de diferentes enzimas glicosil-hidrolasas y el co-metabolismo de di, oligosacáridos y polisacáridos indigestibles representan una ventaja selectiva sobre las bacterias colónicas para la utilización de fuentes de carbono intestinales fermentables. Además, como resultado de la digestión y absorción en el tracto gastrointestinal superior, el colon es un medio ambiente pobre en mono y disacáridos. Por tanto, la microbiota comensal se ha adaptado al consumo y utilización de carbohidratos complejos que escapan a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas y llegan al colon sin absorberse (Salminen *et al.* 1998). La hidrólisis de dichos carbohidratos se debe a la actividad metabólica de la comunidad intestinal. En tránsito a través del intestino delgado, los oligosacáridos no digeridos y los polisacáridos son hidrolizados, ingeridos y fermentados por la flora microbiana. Las bifidobacterias juegan un papel importante en la hidrólisis y fermentación de los carbohidratos complejos,

produciendo principalmente ácido láctico y ácido acético en relación 2:3 mediante la ruta de la fructosa-6-fosfato.

Se han realizado estudios donde se observó cómo se encuentra la distribución de las bifidobacterias en diferentes hábitats. Por ejemplo, en el humano se han encontrado en heces de infantes (Biavati *et al.*, 1984) y adultos (Biavati *et al.*, 1986), en la vagina y cuando se presentan condiciones patológicas como caries dentales o hipoclorhidria (producción de ácido gástrico) en el estómago (Brandi *et al.*, 1996). En estos sitios son diferentes especies de bifidobacterias las que se pueden observar, por ejemplo, *Bifidobacterium bifidum* y *B. longum* son las bifidobacterias representativas en el intestino de infantes y adultos, mientras que *B. denticolens*, *B. inopinatum* y *B. dentium* son especies típicas que se encuentran en las caries dentales y en el estómago (hipoclorhidria). Muchos factores controlan las poblaciones bacterianas, las cuales cada especie pertenece a un ambiente. Se han logrado aislar las bifidobacterias de diferentes fuentes, de humanos, animales y del medio ambiente.

El número de colonias aisladas al inicio de cada grupo fue en promedio casi el mismo, pero las colonias como bifidobacterias positivas se obtuvieron en un mayor porcentaje de las ratas alimentadas con inulina de agave. En el grupo A se aislaron 8 cepas y en el grupo D se obtuvieron 9 cepas de bifidobacterias, esto representa en 56.6% del total de las bifidobacterias confirmadas. Mientras que en las ratas alimentadas con FOS/GOS resultó un menor porcentaje en comparación con aquellas alimentadas con inulina, en el grupo B se encontraron 3 cepas y en el grupo E 3 cepas, las cuales representan en 20% del total. Por otro lado, en los grupos C y F se determinaron 1 y 6 respectivamente, siendo esto un 23.3% del total.

Las especies dominantes de bifidobacterias son generalmente diferentes entre humanos y los animales. En los humanos se han aislado *B. adolescentis* y *B. dentium*, mientras que en los animales se han encontrado *B. thermophilum*, *B. animalis* subsp. *animalis* y *B. pseudolongum* (Gavini *et al.*, 1991). En un

estudio realizado por Itoh *et al.*, (1989) para conocer la flora bacteriana de ratas de laboratorio (cotton rats, *Sigmondon hispidus*), encontraron mayor cantidad de bifidobacterias, predominando *B. animalis* y *B. pseudolongum*, pero no pudieron aislar lactobacilos de ninguno de los órganos del TGI, concluyeron además que en general, los animales de la misma especie, excepto gnotobioticos, tienen un patrón común de flora intestinal. Sin embargo, las ratas utilizadas en el estudio habían sido mantenidas en bioterios convencionales como animales de experimentación por largo tiempo, tal es el caso de las ratas utilizadas en el presente estudio, que los aislamientos de bifidobacterias fue similar, aun cuando en el estudio mencionado, no se suplementó la alimentación, por lo que puede considerarse como la flora basal de animales de experimentación, mantenidas por generaciones en bioterios.

6.3.2. Agrupamiento de cepas

Se construyó un árbol filogenético utilizando los datos de la matriz de distancias, obtenidas de las secuencias del ADNr 16S y el método NJ (neighbor-joining). Las secuencias caen dentro de tres grupos principales: grupo I formado por las dos subespecies de *B. animalis*; el grupo II por *B. pseudolongum* subsp *pseudolongum* y el grupo III formado por una cepa de *Bifidobacterium* spp., junto a las especies de *Lactobacillus reuteri* y *Enterococcus faecium*. Todos los grupos fueron separados por altos valores de bootstrap (> 90%) (Cada número indicado sobre las ramas, indica el número de veces, más de 100, que la ubicación de los nodos de separación fue coincidente con los resultados del análisis de bootstrap). La divergencia de las secuencias está determinada por el porcentaje señalado en la barra superior y significa proporción de diferencias encontradas entre las secuencias analizadas (Figura 20). El árbol que se observa de las secuencias es sencillo, ya que las cepas que se obtuvieron, no muestran mucha diversidad entre las especies de *Bifidobacterium* aisladas, por que estas se encuentran compartiendo muchas características.

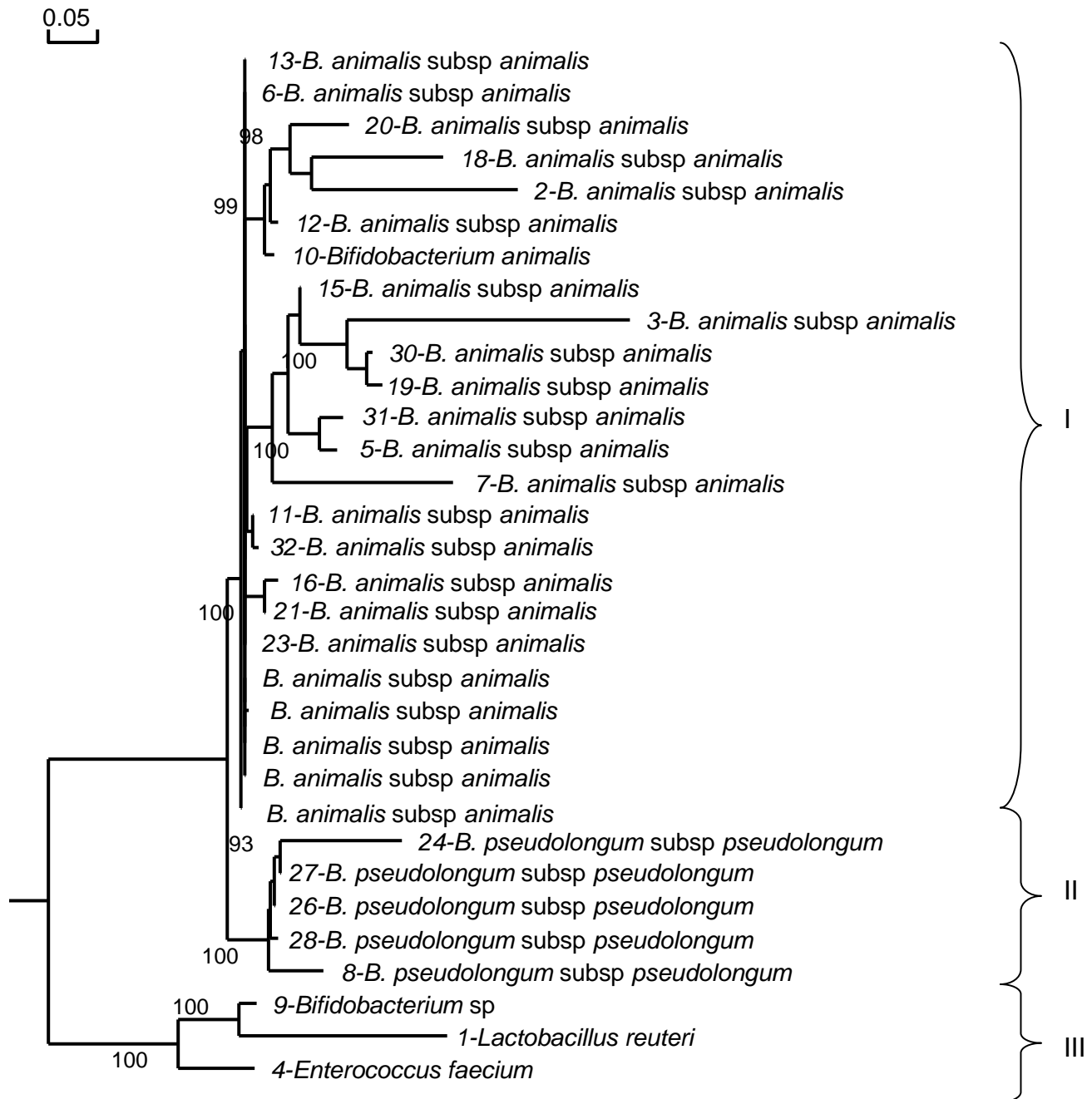


Figura 20. Agrupamiento filogenético construido con el método NJ, de las secuencias del fragmento de 575 pb del ARNr 16S, de las bacterias aisladas del TGI de ratas. Los valores del bootstrap, representan el porcentaje de 1000 replicaciones.

7. CONCLUSIONES

La inulina de agave *tequilana* produjo un efecto bifidogénico en ratas sanas y en ratas con inflamación inducida por DSS al 3%. Tal efecto coincidió con la rápida recuperación de las ratas, corroborada en una investigación alterna.

La combinación de FOS/GOS mostró efecto bifidogenico en las ratas sanas, sin embargo no logró inducir el mismo efecto en las ratas tratadas con DSS al 3%. Lo que indica que los FOS/GOS en presencia de una inflamación intestinal provocan un efecto negativo.

Las especies predominantes en las ratas de estudio fueron *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium pseudolongum*.

La inulina de agave *tequilana* induce el crecimiento de ambas especies de Bifidobacterias y el 56.6% de las cepas obtenidas fue en presencia de este polisacárido, mientras que en presencia de FOS/GOS fue un 20% a un menor que las obtenidas por la celulosa de 23.3%.

El microorganismo *Enterococcus faecium* aislado cuenta con la capacidad de metabolizar FOS y/o GOS, lo cual no se había observado anteriormente.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Amaretti, A., Bernardi, T., Tamburini, E., Zanoni, S., Lomma, M., Matteuzzi, D., Rossi, M. (2007). "*Kinetics and Metabolism of Bifidobacterium adolescentis* MB 239 Growing on Glucose, Galactose, Lactose, and Galactooligosaccharides". Applied and Environmental Microbiology. Vol. 73, No. 11, 3637–3644.
- Bengmark S. (1998). "*Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora.*" Gut. 42, 2–7.
- Biavati, B. and Mattarelli, P. (2001). The family Bifidobacteriaceae. In: The Prokaryotes (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E., Eds.), pp. 1–70.
- Biavati, B., P. Castagnoli, and L. D. Trovatelli. (1986). "*Species of the genus Bifidobacterium in the feces of human adults.*" Microbiologica 9:39–45.
- Biavati, B., P. Castagnoli, F. Crociani, and L. D. Trovatelli. (1984). "*Species of the Bifidobacterium in the feces of infants.*" Microbiologica 7:341–345.
- Boehm G, Jelinek J, Stahl B and et al. (2004). Prebiotics in Infant Formulas. Journal of Clinical Gastroenterology 38(Supl. 2):76-79.
- Bolado-Martínez, E. and E. Acedo-Félix. 2009. Differentiation of porcine wild-type lactobacilli strains, with ERIC-PCR and PFGE band patterns included in polyphasic taxonomy. Czech J. Anim. Sci. 54:307–314
- Bomba, A., R. Nemcova, D. Mudronova and P. Guba. (2002). "*The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics.*" Trends in Food Science & Technology 13(4): 121-126.
- Boon, M.A., Janssen, A.E.M. (2000). "*Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharide.*" Enzyme and Microbial Technol. 26, 271 –281.
- Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Vicaut E, Neut C, Flourie B et al. (2004). "*The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose response relation study.*" Am J Clin Nutr. 80, 1658–1664.
- Bouhnik, Y., Floure, B., D'Agay-Abensour, L., Pochart, P., Gramet, G., Durand, M., Rambaud. J. C. (1997). "*Administration of transgalactooligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans.*" J. Nutr. Vol. 127, 444–448.
- Brandi, G., S. Sarchielli, P. Mordenti, S. Tambieri, C. Calabrese, P. Mattarelli, B. Biavati, and G. Biasco. (1996). "*Colonization of human achloridric stomach by bifidobacterias.*" Gut 39, Suppl. 3:A229.
- Buckel, W. (1999). Anaerobic energy metabolism, p. 278–326. In J. W. Lengeler, G. Drews, and H. G. Schlegel (ed.), Thieme-Verlag, Stuttgart, Germany
- Cheng, C. C., Yu, M. C., Cheng, T. C., Sheu, D. C., Duan, K. J., Tai, W. L. (2006). "*Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with Kluyveromyces marxianus.*" Biotechnol. Lett. Vol. 28, 793–797.

- Clarridge, Jill E. (2004). "Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases". Clin Microbiol Rev. 17(4). 840–862.
- Collado, M.C. y Y. Sanz (2007). "Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains." Journal of Applied Microbiology 103. 1147–1157.
- Corona V. (2003). "Evaluación probiótica de especies de *Bifidobacterium* en cerdos lactantes". Thesis. Research Center in Food and Development. Sonora, Mexico.
- Coussement, P. (1999). Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status.
- Crittenden, R. y Planyne, M. (1996). Production, properties and applications of food grade oligosaccharides. Trends Food Sci. Technol. 7: 357.
- Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA, Englyst HN. (1996) "Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel." Br J Nutr. 75, 733–47.
- Cummings John H and Englyst Hans N. (1995). Gastrointestinal effects of food carbohydrate. Am J Clin Nutr. 61(suppl): 938S-45S.
- De Leenheer, L. and Hoebregs, H. (1994). Progress in the elucidation of the composition of chicory. Starch/Staerke 46: 193–196.
- de Vries, W., Gerbrandy, S.J., Stouthamer, A.H. (1967). "Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*." Biochim Biophys Acta 136(3);415-25.
- de Vries, W., Stouthamer, A.H. (1967). "Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria." J Bacteriol 93(2);574-6.
- Debruyne A, Alvarez A P, Sandra P and De Leenheer L (1992). "Isolation and identification of b-D-fructofuranosyl-(2,1)- D-fructose, a product of the enzymatic hydrolysis of the inulin from *Cichorium intybus*." Carbohydr. Res. 235, 303–308.
- Escudero Álvarez, E. y González Sánchez, P. (2006). "La fibra dietética". Nutr. Hosp. 2 (Supl. 2) 61-72.
- Euzéby, J.P. 2010. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. Int. J. Syst. Bacteriol., 1997, 47, 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>). Última actualización Diciembre 2010.
- FAO/WHO. (2001). "Evaluation of health and nutritional properties of probióticos in food, including powder milk with live lactic acid bacteria." Food and Agriculture of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzappel, W.H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology 88, 105– 122.
- Fuller, R. (1989). "Probiotics in man and animals". J. Appl. Bacteriol. Vol. 66, 365–78.
- García-Galaz, Alfonso, Pérez-Morales, Rosalva, Díaz-Cinco, Martha, Acedo-Félix, Evelia. (2004). "Resistance of *Enterococcus* strains isolated from

- pigs to gastrointestinal tract and antagonistic effect against Escherichia coli K88*". Rev Latinoam Microbiol 2004; 46 (1-2): 5-11.
- Gavini F., Van Esbroeck M.b, Touzel J. P., Fourment A. y Goossens H. (1996). "Detection of Fructose-6-phosphate Phosphoketolase (F6PPK), a Key Enzyme of the Bifid-Shunt, in Gardnerella vaginalis." Vol 2. No 3. 191-193.
- Gavini, F., A. M. Pourcher, C. Neut, D. Monget, C. Romond, C. Oger, and D. 8 Izard. (1991). "Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal 9 origins." Int J Syst. Bacteriol. 41:548-557.
- Gibson GR, Probert HM, Van Loo JAE, Roberfroid MB. (2004). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics". Nutr. Res Rev. 17, 257–9.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. & Cummings, J. H. (1995). "Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin." 108: 975–982.
- Gibson, G.R. Roberfroid. M. B. (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." J. Nutr. Vol. 125, 1401-1412.
- Graeme H. McIntosh, Peter J. Royle, Martin J. Playne (1999). "A probiotic strain of L. acidophilus reduces DMH-induced large intestinal tumors in males Sprague-Dawley rats." Nutrition and Cancer, Vol. 35, No. 2, 153-159.
- Guarner, F. Juan-R Malagelada (2003). "Gut flora in health and disease." THE LANCET, Vol 360, www.thelancet.com
- Guarner. F. (2007). "Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad". Nutr Hosp. 22. Supl. 2, 14-9.
- Harmsen, H. J. M.; Gibson, G. R.; Elferrich, P.; Raangs, G. C.; Wildeboer-Veloo, A. C. M.; Argaiz, A.; Roberfroid, M. B.; Welling, G. W., (2000). "Comparison of viable counts and fluorescent in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human faecal bacteria." FEMS Microbiology Letters. 183, 125–129.
- Hate, Y. et al (1983). "Effects of fructooligosaccharides on hyperlipidemia." Geriatric Medicine. 126-156.
- Heredia R. R. 2010. Aislamiento de cepas de Bifidobacterium sp., del tracto gastrointestinal de cerdos sanos e identificación por técnicas moleculares. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Pp 63.
- Hoebregs, H. (1997). "Fructans in foods and food products, ion-exchange chromatographic method: collaborative study." J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. Vol. 80, 1029-1037.
- <http://es.wikipedia.org/wiki/Achicoria>
- http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2002066517&IA=MX2001000011&DISP_LAY=CLAIMS
- Inness V. L., McCartney A. L., Khoo C., Gross K. L., Gibson G. R. (2007). "Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation

- with special reference to Desulfovibrio spp*". Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 91, 1-2, 48-53.
- Ito, M., Deguchi, Y., Matsumoto, K., Kimura, M., Onodera, N., Yajima, T. (1993). "*Influence of galactooligosaccharides on the human fecal microflora*". J. Nutr. Sci. Vitaminol. Vol. 39, 635–640.
- Itoh, K., Tamura, H. and Mitsuokai, T. (1989). "Gastrointestinal flora of cotton rats. *Laboratory Animals*. 23, 62-65.
- Kalliomaki, E. Isolauri, and S. Salminen, (2003). "*Probiotics and prevention of atopic disease: 4 year follow-up of randomized placebo-controlled trial*." Lancet. Vol. 361, 1869-1871.
- Kimura, K., McCartney, A.L., McConnell, M.A. and Tannock, G.A. (1997) "*Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains*." Applied and Environmental Microbiology. 63, 3394–3398.
- Kip P, Meyer D, Jellema R. (2005). "*Inulin improve sensoric and textural properties of low fat yogurts*." Int Dairy J. Vol. 16, 1098-1103.
- Kitajima S, Morimoto M, Sagara E, Shimizu C, Ikeda Y. (2001). "*Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice*". 50: 387–95.
- Kleessen, B., Noack, J. & Zunft, H. J. (1994). "*Effect of inulin on colonic Bifidobacteria of elderly man*." FASEB J. 8: A185 (abs.).
- Kleessen, B., Sykura, B., Zunft, H. J. & Blaut, M. (1997). "*Effects of inulin and lactose on faecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons*." Am. J. Clin. Nutr. 65: 1397–1402.
- Klijn, A., Annick Mercenier, Fabrizio Arigoni *(2005). "*Lessons from the genomes of bifidobacterias*." FEMS Microbiology Reviews 29, 491–509.
- Kolida, S., Meyer, D. y Gibson, GR. (2007). "*A double-blind placebo-controlled study to establish the bifidogenic dose of inulin in healthy humans*." European Journal of Clinical Nutrition. 61, 1189–11.
- König, Horst Erich, Liebich Hans-Georg. (2005). Anatomía de los animales domésticos. Ed. Cartoné 2^a. Tomo 2. Cap. 7.
- Lenoir-Wijnkoop I., Sanders M. E., Cabana M. D., et al. (2007). "*Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract*." Nutr Rev. Vol. 65, 469–89.
- Levrat, M. A., Remesy, C., Demigne, C., (1991). "*High propionate acid fermentation and mineral accumulation in the caecum adapted to different levels of inulin*"; J. Nutr. 121 1730–1737.
- Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. (1965). "*Probiotics: Growth Pro-moting Factors Produced by Microorganisms*". Science. 147, 747-748.
- López P. (1996). Fructooligosacáridos. El mundo de los alimentos funcionales. Alimentaria. 21, 21–3.
- López Román J., Martínez González A. B., Luque A., Pons Miñano J. A., Vargas Acosta A., Iglesias J. R., Hernández, M., Villegas. J. A. (2008). "*Efecto de la ingesta de un preparado lácteo con fibra dietética sobre el estreñimiento crónico primario idiopático*". Nutr Hosp. 23,12-19.

- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., Mendoza-Díaz., G. (2003). “*Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul*”. J. Agric. Food Chem. Vol. 51, 7835-7840.
- Madrigal L., Sangronis , E. (2007). “*La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos Funcionales.*” Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Vol. 57 N° 4, 387-396.
- Mancilla-Margalli. Lopez-Garcia. (2006). “*Water-Soluble carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and Dasilyrion Species.*” J. Agric. Food Chem. 54, 7832-7839.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., Anifantakis, E.M. (2003). “*Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening*”. International Journal of Food Microbiology 82, 153– 161.
- Marteau, P., P. Pochart, J. Dore, C. Bera-Maillet, A. Bernalier, and G. Corthier. (2001). “*Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota*”. Appl. Environ. Microbiol. 67:4939–4942.
- Mataix, J., Gassull, M. A. (2002). “Fibra alimentaria”. Mataix J (ed.). Nutrición y alimentación humana. Ergon. Madrid. 119-137.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Tanaka, R., Fukuda, M., Oyaizu, H. (1999). “*Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers.*” Appl. Environ. Microbiol. 65, 4506-4512.
- Matto, J., E. Malinen, M.-L. Suihko, M. Alander, A. Palva y M. Saarela. (2004). “*Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacterias.*” Journal of Applied Microbiology. 97, 459–470.
- McKellar, R. C., and H. W. Modler. (1989). “*Metabolism of fructooligosaccharides by Bifidobacterium spp*”. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:537–541.
- McKellar, R. C., Modler, H. W., and Mullin, J. (1993). “*Characterization of growth and inulinase production by Bifidobacterium spp. on fructooligosaccharides*”. Bifidobact. Microflora 12:75–86.
- Meile, L., Rohr, L.M., Geissmann, T.A., Herensperger, M. and Teuber, M. (2001). “*Characterization of the D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (xfp) from Bifidobacterium lactis*”. J. Bacteriol. 183, 2929–2936.
- Meng, Q., Kerley, M. S., Russel, T. J., Allee, G. L. (1998). “*Lectin-like activity of Escherichia coli K88, Salmonella choleraesuis and Bifidobacterium Pseudolongum of porcine gastrointestinal origin.*” J. Anim. Sci. Vol. 76, 551-556.
- Mikkelsen, Lene Lind, Bendixen Christian, Jakobsen Mogens, and Jensen Bent Borg (2003). “Enumeration of Bifidobacteria in Gastrointestinal Samples from Piglets”. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 69, 1. 654–658.
- Mundt, O.J. (1986). Enterococci. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1063– 1065.

- Munoa, F. J., Pares, R. (1988). "Selective Medium for Isolation and Enumeration of *Bifidobacterium spp*". APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, JULY 1988, Vol. 54, No. 7, 1715-1718.
- Mutsunori Fujiwaraa, Tsutomu Kanekob, Hirokazu Iwanab, Naoki Taketomob, Hajime Tsunooe, Jun Kannoc, Toshifumi Ohkusad y Isao Okayasuf. (2003). "Inhibitory Effects of *Bifidobacterium longum* on Experimental Ulcerative Colitis Induced in Mice by Synthetic Dextran Sulfate Sodium". Digestion. 67, 90–95.
- Nielsen, D.S., Moller, P.L., Rosenfeldt, V., Paerregaard, A., Michaelsen, K.F. and Jakobsen, M. (2003). "Case study of the distribution of mucosa-associated *Bifidobacterium species*, *Lactobacillus species*, and other lactic acid bacteria in the human colon". Appl. Environ. Microbiol. 69, 7545– 7548.
- Niness, K. R. (1999). "Inulin and Oligofructose: What are they?." J. Nutr. Vol. 129, 1402S-1406S.
- Núñez N. L. (2001). "La producción de mezcal bacanora: una oportunidad de económica para Sonora." pp. 63-110. Ed. Imagen digital del noreste, Hermosillo, Sonora, México.
- Parker, R.B. (1974) "Probiotics: the Other Half of the Antibiotic Story". Anim. Nutr. Health. 29, 4-8.
- Patterson, J. A. (2005). "Prebiotic Feed Additives: Rationale and Use in Pigs", Advances in Pork Production. Vol. 16, pg. 149.
- Perrin, S., Fougnyes, C., Grill, J. P., Jacobs, H., Schneider, F. (2002). "Fermentation of chicory fructooligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerization by three strains of bifidobacteria". Can. J. Microbiol. Vol. 48, 759–763.
- Porter, R.S. MD (2004). Libro Merck Sharp & Dohme Corp., Whitehouse Station, N.J., U.S.A. Copyright ©
- Pridmore, R.D., Berger, B., Desiere, F., Vilanova, D., Barretto, C., Pittet, A.C., Zwahlen, M.C., Rouvet, M., Altermann, E., Barrangou, R., Mollet, B., Mercenier, A., Klaenhammer, T., Arigoni, F. and Schell, M.A. (2004). "The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 2512–2517.
- Rada V., Sirotek K. and Petr J. (1999). Evaluation of Selective Media for Bifidobacteria in Poultry and Rabbit Caecal Samples. J. Vet. Med. B 46, 369–373.
- Rada, V. (1997). "Detection of *Bifidobacterium species* by enzymatic methods and antimicrobial susceptibility testing". Biotechnology Techniques, Vol 11, No 12, pp. 909–912.
- Rath H, Wilson K, Sartor R. (1999). "Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*". Infect Immun. 67. 2969–2974.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." J Nutr. 123. 11. 1939-51.

- Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M. A., Tanaka, R., Watanabe, K. and Tannock, G. W., (2002). "*Identification, Detection, and Enumeration of Human Bifidobacterium Species by PCR Targeting the Transaldolase Gene.*" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Vol. 68, No. 5. 2420–2427.
- Roberfroid MB, Bornet F, Bouley C, Cummings JH. (1995). "*Colonic microflora: nutrition and health: summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) (Europe)] workshop held in Barcelona, Spain.*" Nutr. Rev, 53,127–30.
- Roberfroid, M. B., Van Loo, J., Gibson, G. R. (1998). "*The bifidogenic nature of chirory inulin and its hydrolysis products*". J. Nutr. Vol. 128, 127-130.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R. & Delzenne, N. (1993). Biochemistry of oligofructose, a non-digestible fructooligosaccharide: an approach to estimate its caloric value. Nutr. Rev. 51: 137–146.
- Roberfroid, Marcel (2007). "*Prebiotics: The Concept Revisited*". J. Nutr. 137: 830S–837S.
- Roberfroid, Marcel B. (2007). "*Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*". American Society for Nutrition. 2493S- 2502S.
- Rosenfeldt, V., Benfeldt, E., Nielsen, S. D., Michaelsen, K. F., et al (2003). "*Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis*". J. Allergy Clin. Immunol. Vol. 111, 389-395.
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., Matteuzzi, D. (2005). "*Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures*". Applied and Environmental Microbiology. Vol. 71, No. 10, 6150–6158.
- Rouvière, Henri. (2001). Comprendiendo de anatomía y disección. Elsevier España. pag. 488-493.
- Rycroft CE, Jones MR, Gibson GR, Rastall RA. (2001). A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. J Appl Microbiol; 91: 878-87.
- SAGARPA (2009). Fondo Sectorial de Investigación en materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos. Demanda 2.9.
- Sakata, S., Ryu, C.S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., Fukuyama, M. and Benno, Y. (2006) Characterization of the genus Bifidobacterium by automated ribotyping and 16S rRNA gene sequences. Microbiol Immunol 50, 1-10.
- Salminen, S., Bouley, M. C., Boutron-Rualt, M. C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri E., Moreau, M. C., Roberfroid, M., Rowland, I. (1998). "*Functional Food Science and Gastro-intestinal Physiology and Function*". Br. J. Nutr. Suppl. 1, 147-171.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. and Lee, Y.K. (1999). "*Probiotics: how should they be defined?*". Trends in Food Science & Technology. 10 ,107-110.

- Sartor RB. (2004). "Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics." *Gastroenterology*. 126. 1620–33.
- Satokari, R., Vaughan, E., Akkermans, A., Saarela, M., M. DE Vos, W. (2001). "Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis". *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 504-513.
- Scardovi, V., 1986. Genus *Bifidocacterium* Orla-Jensen. 1924, 472. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath, P.H., Nair, N.S., Sharpe, M.E. & Holt, J.G., eds.), vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore, MD. pp. 1418 – 1434.
- Schleifer, K.H., Kilpper-Ba"lz, R. (1984). "Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb". nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 31– 34.
- Seksik, P., Rigottier-Gois L., Gramet G., Sutren, M., et al (2003). "Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon". *Gut*. Vol. 52, No. 2, 237-242.
- Sgorbati, B., Lenaz, G. and Casalicchio, F. (1976). "Purification and properties of two fructose-6-phosphate phosphoketolases in *Bifidobacterium*." *Anton. Leeuw.* 42, 49–57.
- Siezen, R.J., van Enckevort, F.H., Kleerebezem, M. and Teusink, B. (2004) "Genome data mining of lactic acid bacteria: the impact of bioinformatics". *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 105–115.
- Simon GL, Gorbach SL. (1984). "Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*". 86, 174–93.
- Simpson P. J., Stanton C., Fitzgerald G. F., and Ross R. P. (2003). "Genomic Diversity and Relatedness of *Bifidobacteria* Isolated from a Porcine Cecum". *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 185, 8. 2571–2581.
- Thitaram, S.N., Siragusa G.R. and Hinton A. Jr. (2005). "Bifidobacterium-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium". *Letters in Applied Microbiology*. 41, 355–360.
- Trantwein, E. A., Kunath-Ran, A., Erbersdobler, H. F. (1999). "Increased fecal bile acid excretion and changes in the circulating bile acid pool are involved in the hypocholesterolemic and gallstone-preventive actions of psyllium in hamsters". *J Nutr.* 129, 896-902.
- Urías-Silvas, J. E., López, M. G., (2004). "Efecto prebiótico de los fructanos de agave". Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Cinvestav-IPN Unidad Irapuato.
- Van Loo, J., Coussement, P., DeLeenheer, L., Hoebregs, H., Smith, G. (1995). "On thr presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet." *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35: 525-552.
- Venkatraman, A., B. S. Ramakrishna, A. B. Pulimood, S. Patra & Sreekant Murthy, (2000). "Increased Permeability in Dextran Sulphate Colitis in

- Rats: Time Course of Development and Effect of Butyrate.*” Scandinavian Journal of Gastroenterology, Vol. 35, 10:1053-1059.
- Wang X, Gibson GR. (1993). “*Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine.*” J Appl Bacteriol. 75, 373-80.
- Wolin, M.J., Zhang, Y., Bank, S., Yerry, S., Miller, T.L. (1998). “*NMR detection of $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{COOH}$ from 3- ^{13}C -glucose: a signature for Bifidobacterium fermentation in the intestinal tract*”. J Nutr 128(1); 91-6.
- Woodmansey, E.J. (2007). Intestinal bacteria and ageing. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology. 102, 1178–1186.
- Xianhua Yin, James R. Chambers, Kathleen Barlow, Aaron S. Park, Roger Wheatcroft. (2005). “*The gene encoding xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase (xfp) is conserved among Bifidobacterium species within a more variable region of the genome and both are useful for strain identification.*” FEMS Microbiology Letters. 246, 251–257.
- Yanahira, S., Kobayashi, T., Suguri, T., Ishikawa, H., Makajima, I. (1995). Formation of oligosaccharides from lactose by *Bacillus circulans* β -galactosidase. Biosci Biotech Biochem. 59, 1021 – 1026.
- Yusof, R. M., Haque, F., Ismail, M., Hassan, Z. (2000). “*Isolation of B. infantis and its antagonistic activity against ETEC O157 and Salmonella typhimurium S-285 in weaning foods*”. Asia Pacific J. Clin. Nutr. Vol. 9, 130-135.

9. ANEXOS.

9.1. Preparación de Agar TOS propionato pH 6 ± 0.2 .

Disolver 62.5 g del medio y 0.5 g de L-cisteína en 1 lt de agua destilada, que hierva por 1 min, esterilizar en una autoclave a 115 °C/15 min, cuando se encuentre templado, antes de que se solidifique, se agrega 75 µg/ml de mupirocina (antimicrobiano), colocar el medio en placas petri (15 ml) y dejar solidificar.

Tinción Gram (FDA 8ª Edición/1995)

Cristal violeta de Hucker.

Solución A

Cristal Violeta (90% de colorante)	2 g
Etanol 95%	20 ml

Solución B

Oxalato de Amonio	0.8 g
Agua destilada	80 ml

Mezclar las soluciones A y B. Almacenar por 24 h y filtrar a través de papel filtro de carbono.

Yodo-yoduro de Gram

Yodo	1 g
Yoduro de potasio (KI)	2 g
Agua destilada	300 ml

Colocar el KI en un mortero, agregar el yodo y moler con el mazo por 5-10 s. Agregar 1 ml de agua y moler; agregar 5 ml de agua y moler, agregar 10 ml agua y moler. Colocar esta solución en un frasco volumétrico. Enjuagar el mortero y el mazo con la cantidad suficiente de agua necesaria para ajustar un volumen total de 300 ml.

Colorante de contraste de Hucker (solución stock)

Safranina O (certificada)	2.5 g
Etanol al 95%	100 ml

Agregar la solución Stock a 90 ml de agua destilada.

Procedimiento de tinción (Tinción Gram)

Fijar la película de alimento secada al aire con calentamiento moderado. Teñir por 1 min con la solución de oxalato de amonio-cristal violeta. Lavar cuidadosamente en agua corriente y escurrir. Aplicar el yoduro de Gram por 1 min. Lavar con agua corriente y escurrir. Decolorar con Etanol al 95% hasta que los enjuagues no se observen azules (30 s). Alternativamente, inundar el portaobjetos con etanol, desechar inmediatamente el colorante y volver a enjuagar con etanol, desechar inmediatamente el colorante y volver a enjuagar con etanol por 10 s. Lavar cuidadosamente con agua, escurrir y aplicar el colorante de contraste de Hucker (solución de safranina) por 10-30 s. Lavar cuidadosamente con agua, escurrir, secar al aire y examinar.

9.2. Extracción de ADN cromosómico (Marmur).

Día 1.

De un cultivo líquido (MRS) de 24-48 horas, centrifugar 10 ml, durante 10 min a 3500 rpm.

Lavar dos veces con 1.5 ml de una solución de NaCl 0.9 %, en zona estéril. Centrifugar por 10 min a 4000 rpm.

Lavar dos veces con 1.5 ml de solución NaCl-EDTA pH 8.0 (NaCl 0.15 M: EDTA pH 8.0 0.1 M). Centrifugar.

Lavar con agua destilada estéril (600 µl) y centrifugar.

Re suspender el pellet con 600 µl de solución NaCl-EDTA pH 8.0 (NaCl 0.15 M, EDTA 0.1 M pH 8.0).

Añadir 5-6 U de mutanolisina, e incubar 24 horas a 37 °C.

Día 2.

Centrifugar 8,000 rpm durante 10 min y decantar el sobrenadante.

Re-suspender las células en 600 µl de TRIS 20 mM pH 8.0 y re-suspender suavemente con la pipeta, no con vortex.

Lisar las células al añadir solución de SDS al 10 % (en TRIS 50 mM, y EDTA 20 mM) a concentración final del 1 % (60 µl).

Añadir 60 µl de proteinasa K (20 mg/ml) e incubar 24 horas a 50 °C.

Día 3.

Inactivar a 65 °C/20 min. Centrifugar y recoger fase acuosa.

Añadir 1 vol. de fenol/cloroformo-isoamilico (24:1). Centrifugar 20 min 12,000 rpm. Recoger la fase acuosa.

Repetir paso 12.

Añadir NaCl 5 M en relación 1:10.

Añadir 0.6 vol. de isopropanol ó 1 vol. de etanol (-20 °C).

Dejar en el congelador de -20 C para precipitar (mínimo 20 min.) dejar 24 horas.

Día 4.

Centrifugar 30 min a 12,000 rpm y desechar el líquido.
 Lavar con 1 vol. De etanol al 70 % cada tubo (-20 °C).
 Centrifugar 10 min a 15,000 rpm.
 Secar en baño caliente (65 °C) o al aire.
 Re suspender en 50 µl de TE.
 Añadir 50 µl de RNAsa a concentración final de 1 microgramo/ml e incubar a 37 °C por 1 hora.
 Comprobar la presencia de DNA y la pureza, en un gel de agarosa al 1 %.

9.3. Amplificación del Gen F6PPK por PCR.

Preparar, en un microtubo de 2 ml estéril, la mezcla de reacción, de acuerdo al número de cepas a probar:

Tabla 4. PCR del Gen F6PPK

Cantidades por cepa a probar (µl)	Reactivos
4	dNTP's
2	Keto Forf
2	Keto Rev
2	MgCl ₂ 25 Mm
5	buffer 10X
0.4	Taq ADN polimerasa
30	agua deionizada estéril

Agitar en vortex. Distribuir la mezcla de reacción, en alícuotas de 45 µl, en microtubos de 0.5 ml, estériles y rotular con los datos de las cepas. Agregar a cada microtubo con mezcla de reacción 5 µl del ADN previamente purificado. Si la amplificación se realizara en el termociclador Perkin Elmer, adicionar 35 µl de aceite mineral estéril a cada microtubo. Si por el contrario, la amplificación se llevara a cabo en el termociclador TechGene, no adicionar el aceite a los microtubos, colocar los microtubos en el termociclador.

Programa del equipo:

1 ciclo a 94 °C por 10 min. (loop 1)
 36 ciclos a 95 °C por 1 min (loop 2)
 52 °C por 1 min 30 seg
 72 °C por 1 min`15 seg
 1 ciclo a 72 °C por 5 min (loop 3)

9.4. Amplificación por PCR del RNAr 16S (completo).

Preparar, en un microtubo de 2 ml estéril, la mezcla de reacción, de acuerdo al número de cepas a probar:

Tabla 5. PCR de RNAr 16S

Cantidades por cepa a probar (μ l)	Reactivos
4	dNTP's
2	27F
2	1492R
2	MgCl ₂ 25 mM
5	buffer 10X
0.4	Taq ADN polimerasa
32	agua deionizada estéril

Agitar en vortex. Distribuir la mezcla de reacción, en alícuotas de 47 μ l, en microtubos de 0.5 ml, estériles y rotular con los datos de las cepas. Agregar a cada microtubo con mezcla de reacción 3 μ l del ADN previamente purificado. Si la amplificación se realizara en el termociclador Perkin Elmer, adicionar 35 μ l de aceite mineral estéril a cada microtubo. Si por el contrario, la amplificación se llevara a cabo en el termociclador TechGene, no adicionar el aceite a los microtubos, colocar los microtubos en el termociclador (especificaciones de los equipos).

Programa del equipo:

1 ciclo a 96 °C por 5 min. (loop 1)
36 ciclos a 94 °C por 1 min (loop 2)
50 °C por 1 min
72 °C por 1 min
1 ciclo a 72 °C por 5 min (loop 3)