



**Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos
Maestría en Ciencias Farmacéuticas**

Línea de Investigación

Estrategias biológicas en el área farmacéutica

**“Aislamiento y cuantificación de bacterias con potencial probiótico a partir
de heces en personas delgadas y obesas”**

**Idónea comunicación de resultados para obtener el grado de Maestra en ciencias
Farmacéuticas**

Presenta

**QFB: Schahrasad Montserrat Cruz Arroyo
Matricula: 2151801895**

Comité tutorial:

**Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa
Dra. Raquel González Vázquez
Dr. Lino Mayorga Reyes**

Junio, 2018

Aislamiento y cuantificación de bacterias con potencial probiótico a partir de heces en personas delgadas y obesas

Vo.Bo.

Cotutor
Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa

Cotutor
Dra. Raquel González Vázquez

Asesor
Dr. Lino Mayorga Reyes

Aislamiento y cuantificación de bacterias con potencial probiótico a partir de heces en personas delgadas y obesas

Vo.Bo.

Presidente:
Dra. María Eugenia de la Torre Hernández

Dr. Edgar Torres Maravilla
Vocal

Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa
Secretario

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo el aislamiento y caracterización de *Faecalibacterium prausnitzii*, *Oxalobacter formigenes* y *Akkermansia muciniphila*, presentes en la microbiota intestinal de una población de individuos jóvenes delgados y obesos consideradas de importancia para la salud.

De 378 individuos que participaron en las conferencias informativas sobre el proyecto de investigación, 24 individuos cumplieron los requisitos y a los cuales se les pidió firmaran una carta de consentimiento informado para participar. Se solicitó una muestra de heces que fue utilizada para cuantificar y aislar bacterias con potencial probiótico mediante técnicas moleculares y microbiológicas.

Como resultado se obtuvo que el grupo obeso tiende a tener 3 y 4 órdenes de magnitud mayor cantidad de *A. muciniphila* y *F. prausnitzii*, que el grupo delgado. Para el caso de *O. formigenes* no se pudo llevar a cabo la cuantificación. Por lo que para futuras investigaciones se recomienda utilizar otras condiciones para su cuantificación. Por otro lado, se aislaron 10 cepas las cuales fueron identificadas por secuenciación. Los microorganismos que se aislaron en el medio de cultivo con mucina como fuente de energía corresponden a *E. coli* y *Enterobacter* sp. En el medio de cultivo con oxalato se aislaron cepas de *E. coli*. En el medio de cultivo con celobiosa se lograron identificar 4 cepas, una de *Bacillus* sp y 3 cepas de *Lysinibacillus fusiformis*.

Agradecimientos institucionales

A la Maestría en Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, perteneciente al padrón Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), el cual apoyó el presente trabajo con la beca nacional número 406041.

A mi comité tutorial por su apoyo, conocimiento brindado y sobre todo por la confianza que pusieron en mí para la realización de este proyecto.

A mis compañeros la nutrióloga Idalia Ramos Terrones y al nutriólogo Josué Cruz Rodríguez quienes me apoyaron para la selección y reclutamiento de la población participante en la presente investigación.

Dedicatoria

La presente tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A mis queridas Quetzalli Montserrat y Yara Dominic, que desde que supe que venían al mundo fueron mi motor para seguir adelante en busca de nuevas metas. Y desde que nacieron son los pequeños soles que iluminan mis mañanas y las lunas que me acompañan en las noches.

Con mucho amor a mis padres María Elena y Nicolás, quienes han estado conmigo y me han enseñado a ser una persona de bien. Por haberme apoyado cuando decidí seguir estudiando para no quedarme solamente con la licenciatura y quienes han estado en todo momento para apoyarme.

A mi hermano Leo quien siempre me ha apoyado y al que quiero mucho. Siempre contarás con mi apoyo como yo he contado con el tuyo.

A mis tías Ana Julia y Margarita por el apoyo brindado con Quetzalli y Yara durante la realización de este proyecto.

A mi esposo quien desde que lo conocí nunca me ha detenido en seguir mis sueños, al contrario, me ha alentado a no detenerme jamás seguir esforzándome para aprender nuevas cosas. Tu apoyo fue muy importante en esta etapa de mi aprendizaje profesional y que si bien el camino no fue fácil tú siempre estuviste ahí para que no tirara la toalla.

Índice

Índice de tablas	i
Índice de figuras.....	ii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
3. Marco teórico	7
3.1. Probióticos.....	7
3.1.1. Efectos benéficos reportados de los probióticos.....	8
3.1.2. Evaluación de los Probióticos.....	9
3.1.3. Fuente de aislamiento de Probióticos	13
3.1.4. Funciones de los probióticos en el huésped.....	14
3.2. Nuevos Probióticos	17
3.2.1. <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	17
3.2.2. <i>Akkermansia muciniphila</i>	18
3.2.3. <i>Oxalobacter formigenes</i>	18
4. Planteamiento del problema.....	20
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	21
6.1. General.....	21
6.2. Específicos.....	21
7. Materiales y métodos.....	22
7.1. Selección de sujetos	22
7.2. Cuantificación <i>A. muciniphila</i> , <i>F. prausnitzii</i> y <i>O. formigenes</i> en heces	26
7.3. Aislamiento de <i>A. muciniphila</i> , <i>F. prausnitzii</i> y <i>O. formigenes</i> a partir de las muestras de heces de cada condición de peso.....	29
7.4. Pruebas bioquímicas	32
7.4.1. Prueba de catalasa.....	32
7.4.2. Prueba de oxidasa	33
7.4.3. Patrón de fermentación.....	34
7.4.4. Determinación de la cuenta viable.....	34
7.5. Identificación molecular de los microorganismos aislados.....	35
7.6. Actividad hemolítica.....	35

7.7.	Evaluación <i>in vitro</i> al estrés gastrointestinal de las cepas seleccionadas ..	36
7.8.	Actividad antimicrobiana	36
7.9.	Resistencia a antibióticos	37
7.10.	Análisis estadístico	38
8.	Resultados	39
8.1.	Selección de sujetos	39
8.2.	Cuantificación de <i>A. muciniphila</i> y <i>F. prausnitzii</i> en heces.....	40
8.3.	Aislamiento	43
8.3.1.	Identificación molecular de las cepas aisladas	43
8.4.	Patrón de fermentación de carbohidratos	52
8.5.	Actividad hemolítica.....	60
8.6.	Actividad antimicrobiana	61
8.7.	Resistencia a antibióticos	62
8.8.	Evaluación <i>in vitro</i> de la tolerancia al estrés gastrointestinal	64
8.9.	Catalasa y oxidasa.....	69
9.	Conclusiones	71
10.	Perspectivas	72
11.	Referencias	73
12.	Anexos	99
12.1.	Anexo 1. Cuestionario de selección.....	99
12.2.	Anexo 2. Consentimiento informado	100
12.3.	Anexo 3 Cuestionario de frecuencia de consumo	102

Índice de tablas

Tabla 1. Iniciadores utilizados para identificar y cuantificar los microorganismos de interés.	27
Tabla 2. Características de los grupos de estudio.	39
Tabla 3. Consumo de macronutrientes de grupo de estudio.	40
Tabla 4. Identificación molecular de las cepas aisladas de muestras de heces aisladas en diferentes medios de cultivo.	46
Tabla 5. Crecimiento de las cepas aisladas en diferentes medios de cultivo.	51
Tabla 6. Actividad hemolítica de las cepas identificadas.	61
Tabla 7. Evaluación de la resistencia a antibióticos.	63
Tabla 8. Prueba de catalasa y oxidasa.	70

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama metodológico utilizado en el presente trabajo.	24
Figura 2. Proceso de obtención de las muestras de la población de estudio.	25
Figura 3. Cuantificación de las bacterias presentes en las heces de los diferentes grupos de estudio cuantificadas por qPCR	42
Figura 4. Productos de PCR obtenidos de la amplificación de las cepas aisladas.	44
Figura 5. Purificación de los productos de PCR obtenidos de las cepas aisladas en el presente trabajo.	45
Figura 6. Crecimiento en los diferentes carbohidratos.	53
Figura 7. Crecimiento a las 12 horas de <i>Bacillus oleronius</i> MCLD1.	56
Figura 8. Crecimiento a las 12 horas de <i>Lysinibacillus fusiformis</i> MCLD2.	57
Figura 9. Crecimiento a las 12 horas de <i>Lysinibacillus fusiformis</i> MCLO1.	58
Figura 10. Crecimiento a las 12 horas de <i>Lysinibacillus fusiformis</i> MCLO2.	59
Figura 11. Sobrevivencia al estrés gastrointestinal de las cepas aisladas a partir del medio que contenía celobiosa como fuente de carbono.	66
Figura 12. Sobrevivencia ante el estrés gastrointestinal simulado.....	68

1. Introducción

Actualmente, el uso de bacterias con efectos benéficos para la salud tiene un impacto en la industria alimentaria, biotecnológica, agrícola, farmacéutica y médica (Song *et al.*, 2012). Tiessier fue el primer investigador que reconoció la importancia de las bifidobacterias en el intestino de lactantes (Lauzon *et al.*, 2014). Posteriormente Metchnikoff a inicios del siglo XX, propuso que la longevidad de campesinos búlgaros estaba estrechamente ligada al consumo de leche fermentada (Lauzon *et al.*, 2014), por lo que por primera vez se propuso modular la microbiota intestinal para reemplazar la población de bacterias patógenas y aumentar la de bacterias benéficas (Lauzon *et al.*, 2014). La primera vez que se utilizó el término probiótico fue en 1965, en donde se hacía referencia al crecimiento *in vitro* de protozoarios estimulado por otros protozoarios (Espitia *et al.*, 2016). Años más tarde el término probiótico volvió a surgir, cuando Parker usó el término para hacer referencia a las interacciones de bacterias con el huésped ya sea animal o humano, y sustancias, que contribuían al equilibrio microbiano intestinal (Espitia *et al.*, 2016). Sin embargo, no fue hasta 1998 cuando se dio a conocer la definición actual de probióticos. Dicha definición hace referencia a que los probióticos tienen efectos benéficos sobre la salud del huésped. Por lo que su uso como coadyuvante en el tratamiento de diversas enfermedades ha ido en aumento (Saez-Lara *et al.*, 2015); ejemplos de éstas son: la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de intestino irritable, cáncer colorectal, obesidad, diabetes tipo II, enfermedad renal crónica, dermatitis atópica (Valcheva y Dieleman, 2016). Para que el probiótico ejerza su efecto benéfico sobre el huésped, éste debe de llegar vivo y en cantidad

suficiente al sitio de acción que son las diferentes secciones del intestino y que dependerá de la naturaleza del microorganismo en cuestión. Generalmente, son administrados a través de alimentos (Singh *et al.*, 2014) pero existen otras formas de administración entre las que se encuentran las formas farmacéuticas en diversas presentaciones como liofilizados, capsulas y tabletas, entre otras (Kaur *et al.*, 2002).

Debido a los diversos efectos benéficos de la gama de probióticos que actualmente se comercializan, el consumo de productos que los contienen ha ido en aumento. En el 2002 representaban el 65% del mercado mundial en alimentos funcionales lo que en términos económicos equivalía a 75 mil millones de dólares anuales (Holzapfel y Schillinger, 2002). En el 2010 un estudio de mercado de la BCC Research estimó un crecimiento de 144 mil millones de dólares para ese año, mientras que para el 2016 el crecimiento ya era de 259 mil millones de dólares (Di Cerbo y Palmieri, 2015). Estos datos indican que los probióticos tienen una gran demanda, la cual podría ir incrementando a partir de las investigaciones que se realicen. Actualmente, los géneros que se consideran seguros para el consumo humano son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Singh *et al.*, 2014; Leuschner *et al.*, 2010; Ishibashi y Yamazaki, 2001). Otros géneros como: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Enterococcus* también han sido utilizados como probióticos (Salminen *et al.*, 1998). Se ha reportado información de nuevas bacterias utilizadas para tratamientos de enfermedades que difieren de estos géneros, tal es el caso de *Faecalibacterium prausnitzii*, Clusters de Clostridia IV, XIVa y XVIII, *Akkermansia muciniphila* y *Bacteroides uniformis* (Patel y DuPont, 2015; Atarashi *et al.*, 2013; Everard *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2013; Gauffin Cano *et al.*, 2012;

Kailasapathy y Chin, 2000). El efecto benéfico de estos microorganismos se ha atribuido principalmente a la producción del ácido butírico, y que tiene efecto directo sobre las células del colon en modelos animales, se cree que este efecto ayuda a la diferenciación y propagación de los colonocitos (Catuogno *et al.*, 2013).

Por otro lado, hay reportes del uso de *Oxalobacter formigenes*, no como una bacteria probiótica, pero si como una bacteria que puede ser importante en la degradación de sustancias toxicas para el organismo (Ellis *et al.*, 2016), lo cual ha sido probado con éxito en ensayos preclínicos. De ahí la importancia de continuar con el estudio de estos microorganismos, para que en un futuro cercano puedan estar al alcance del consumo humano.

2. Antecedentes

El intestino humano está colonizado por trillones de microorganismos, que en conjunto se denomina microbiota intestinal; la microbiota intestinal es la encargada directa o indirectamente de regular varios aspectos fisiológicos del huésped. Entre las funciones están la maduración y modulación del sistema inmune, y cada vez la evidencia científica del papel que juega la microbiota intestinal en el desarrollo y comportamiento del cerebro ha ido en aumento (Fung *et al.*, 2017). Se ha demostrado el papel que tiene la microbiota intestinal sana en el control del metabolismo, la resistencia a infecciones por patógenos, en la prevención de la inflamación intestinal, y en enfermedades crónicas como el cáncer. Por otro lado, se ha demostrado que el desequilibrio de la microbiota intestinal puede aumentar el riesgo de enfermedades gastrointestinales (Guinane y Cotter, 2013; Bisgaard *et al.*, 2011). Debido a los beneficios que las bacterias confieren al huésped, el consumo también ha ido en aumento (Sanders *et al.*, 2013). Principalmente porque se cuenta con nueva información sobre moléculas que tienen efectos benéficos en la salud del huésped y que son producidas por dichos microorganismos, como son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), que aportan beneficios al huésped; por lo que la búsqueda de nuevos probióticos que produzcan estos ácidos van en aumento.

Un ejemplo de lo anterior es *F. prausnitzii*, el cual se encuentra disminuido en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, cáncer de colon, síndrome de colon irritable y obesidad (Graessler *et al.*, 2013; Varela *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Candela *et al.*, 2012; Hansen *et al.*, 2012; Rajilic-Stojanovic *et al.*, 2011). *F. prausnitzii* es una de las principales productoras de butirato, de ahí

que se piense que tiene un efecto benéfico en el huésped, pues el butirato regula la diferenciación celular y la expresión genética al suprimir la señalización de la inflamación a través de los receptores acoplados a proteínas G (Neef y Sanz, 2013). Por lo tanto, ayuda a los colonocitos a regenerarse y así evitar que las células muten y se conviertan en cancerígenas (Pryde *et al.*, 2002).

Por otro lado *A. muciniphila* es una bacteria que se aisló de muestras fecales humanas (Derrien *et al.*, 2004). Hasta el momento es la única bacteria intestinal representante del *phylum* Verrucomicrobia y se ha reportado una relación positiva en cuanto a su concentración en pacientes que presentan colitis ulcerosa. Y su potencial probiótico es por sus propiedades antiinflamatorias (Derrien *et al.*, 2016), y por modificar los niveles séricos de glucosa, insulina, triglicéridos y la leptina relacionadas con la saciedad (Schneeberger *et al.*, 2015).

Otro ejemplo de microorganismo con posible potencial probiótico es *O. formigenes*, bacteria que se ha usado para el tratamiento de la hiperoxaluria debido a que utiliza el oxalato como única fuente de carbono, por lo que bajas concentraciones de esta bacteria en el organismo aumentan el riesgo de la formación de cálculos renales (Ellis *et al.*, 2016).

Actualmente los probióticos son aislados de diversas fuentes, las cuales incluyen productos fermentados tradicionales, heces y leche materna de humanos (Fontana *et al.*, 2013). Cuando se logra aislar una bacteria que podría tener propiedades probióticas, se deben evaluar que sea segura para el consumidor, con el fin de evitar efectos no deseados. Por ello, la investigación de nuevas bacterias

probióticas debe tomar en cuenta que los microorganismos deben estar adecuadamente caracterizados para que puedan ser empleados en el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos que tengan un efecto en el tratamiento de enfermedades o padecimientos.

3. Marco teórico

3.1. Probióticos

De acuerdo con la sociedad española de probióticos y prebióticos, los probióticos se definen como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped” (sepy, 2009). Y de acuerdo con la FAO la cantidad mínima que debe contener un probiótico para que ejerza su efecto benéfico es 1×10^6 UFC/mL (FAO/OMS, 2001). Además, deben cumplir con criterios básicos; 1) estar identificados taxonómicamente; 2) no presentar toxicidad; 3) resistir las condiciones gastrointestinales y 4) que ejerza un efecto benéfico en la salud del huésped. Dentro de los efectos que un probiótico puede presentar en la salud del huésped se encuentran los siguientes (Woodard *et al.*, 2009):

- a) Presentar actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas.
- b) Producir de sustancias que ayudan al metabolismo del huésped como por ejemplo AGCC y bacteriocinas.
- c) Producir moléculas que modulen el sistema inmune
- d) Contribuir al balance de la microbiota intestinal.
- e) Presentar efectos en la prevención y como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades intestinales.

Como ya se mencionó, los probióticos más utilizados son bacterias ácido lácticas como por ejemplo *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc*

mesenteroides, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus thermophilus*, *Sporolactobacillus inulinus*; y Bifidobacterias como *B. adolescentes*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis* y *B. longum* (Saarela *et al.*, 2000). Sin embargo, existen otros microorganismos que no pertenecen a estos géneros pero que también se han utilizado como probióticos, tal es el caso de *Escherichia coli* Nissle 1917, *Propionibacterium freudenreichii*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* (Teotia *et al.*, 2014).

3.1.1. Efectos benéficos reportados de los probióticos

Antes de que un probiótico sea utilizado para el consumo humano, la seguridad, tolerancia al estrés gastrointestinal y sus efectos benéficos deben estar científicamente documentados y estas características dependen del género, especie y en ocasiones de la sub especie a la que pertenezca el microorganismo (Fooks y Gibson, 2002). Por ejemplo se ha utilizado *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. reuteri* DSM 17938 y *S. boulardii* CNCM I-745 para contrarrestar los episodios diarreicos, dichas bacterias han tenido éxito tras 24 horas de su administración (Guarino *et al.*, 2014; Vandenplas, 2016). Por otra parte, en el tratamiento del síndrome de intestino irritable, *B. lactis* CNCMI-2494 se utilizó y redujo de manera significativa los síntomas de éste síndrome (Didari *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2013).

Por otro lado, los efectos benéficos de los probióticos también pueden darse cuando se administran una mezcla de bacterias, tal es el caso de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, o mezclas de *L. bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve*, y *B. infantis* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*; dichas bacterias son

utilizadas para el tratamiento de la pouchitis, la cual es una afección inflamatoria idiopática de la bolsa ileal provocada por una respuesta inmune anormal entre la mucosa y la microbiota; la administración de dichas bacterias mostraron una reducción en los síntomas de esta enfermedad (Quinn *et al.*, 2016; Guslandi, 2015).

Otros beneficios que los probióticos brindan al huesped estan relacionados al estado de nutrición. Existen ensayos clinicos donde se usan bacterias probióticas para reducir el peso corporal, un ejemplo es el uso de *L. gasseri* SBT2055, el cual tiene un efecto reductor significativo sobre la adiposidad abdominal (Ogawa *et al.*, 2014; Kadooka *et al.*, 2013; Kadooka *et al.*, 2010).

3.1.2. Evaluación de los Probióticos

Para poder decir que un microorganismo tiene propiedades probióticas se deben cumplir con requisitos que sustenten dicha actividad. De acuerdo con la FAO se debe identificar taxonómicamente el microorganismo, evaluar *in vitro* e *in vivo* la seguridad de este. Cuando ya se tiene evidencia científica de que éste es seguro, se debe evaluar su capacidad para tolerar el estrés gastrointestinal, así como también el beneficio que pueda ejercer sobre la salud del huésped (Ganguly *et al.*, 2011).

Una vez que se aísla una bacteria que puede tener propiedades probióticas, se debe realizar una caracterización morfológica, mediante tinción de Gram y observaciones utilizando el microscopio y debe tomarse en cuenta que muchas bacterias patógenas son Gram negativas; sin embargo, en la actualidad, se ha reportado en la literatura la existencia de algunas bacterias probióticas que son

Gram negativas, tal es el caso de *A. muciniphila*, *F. prausnitzii* y *O. Formigenes* (Marchesi *et al.*, 2016). Además, como ya se mencionó se debe realizar una identificación molecular de la bacteria que se aisló. Una manera rápida de identificación molecular es la hibridación ADN-ADN, pero si bien es una técnica rápida es muy costosa y pocos laboratorios la pueden llevar acabo (Ganguly *et al.*, 2011). Por lo que una técnica empleada por muchos laboratorios es la secuenciación de la subunidad ribosomal 16S, esta técnica es utilizada para la identificación de bacterias en una muestra, que a su vez tiene un gran número de otras bacterias. Para realizar la secuenciación se debe amplificar los fragmentos de la región del gen 16S que se desea secuenciar. Una vez que se obtiene la secuencia de aminoácidos, se determina la identidad taxonómica por medio de comparaciones entre las secuencias obtenidas y de las referencias obtenidas de una base de datos (Galan *et al.*, 2016).

Posteriormente las bacterias deben ser caracterizadas, primero *in vitro*. En esta etapa se evalúa el comportamiento del microorganismo y se caracterizan los posibles beneficios que éste confiere a la salud del huésped y por otro lado, también se determina si provoca toxicidad al huésped. A las bacterias aisladas para ser consideradas probióticos se les debe realizar pruebas básicas (Ganguly *et al.*, 2011):

- a) Pruebas de seguridad: actividad hemolítica, resistencia a antibióticos y estudios de toxicidad.

La evaluación de la toxicidad se puede realizar mediante la prueba de hemólisis, la cual indica si los microorganismos pueden o no utilizar la sangre como fuente de energía. Esta característica es particularmente importante, ya que se ha demostrado que está asociada a bacterias patógenas principalmente, y que a través de esta actividad se favorecen los mecanismos de virulencia y toxicidad. Lo cual depende de factores como el nivel de salud del huésped y por lo tanto del sistema inmune (González Vázquez, 2014).

Otra prueba para ver la toxicidad es mediante la búsqueda de genes que codifiquen proteínas tóxicas. Por otro lado, se debe determinar si las bacterias con potencial probiótico pueden o no recibir de manera horizontal material genético, el cual codifique para factores de toxicidad (Tsai *et al.*, 2014).

Si el microorganismo no presenta toxicidad entonces se procede a las siguientes evaluaciones:

- b) Tolerancia a los jugos gástricos.
- c) Tolerancia a las sales biliares.
- d) Resistencia a antibióticos.
- e) Presentar actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas.
- f) Efecto benéfico sobre la salud del huésped.

Las pruebas de tolerancia al estrés gastrointestinal indican si los microorganismos son capaces de llegar vivos a su sitio de acción. El estrés consiste en someter a las bacterias a diversas soluciones que simulan los fluidos digestivos como son saliva, jugos gástricos y fluido intestinal en el que hay presencia de sales

biliares (Gueimonde y Salminen, 2006). La sobrevivencia de los microorganismos al paso de estas condiciones es importante que se evalúe, pues así se garantiza que una cantidad adecuada y viable llegue al sitio de acción para que pueda ejercer el efecto benéfico. Por otra parte, se sabe que los microorganismos probióticos pueden presentar efecto antimicrobiano, lo que contribuye a la prevención de infecciones gastrointestinales mediante la producción de metabolitos que modifican la acidez del intestino; ejemplo de dichos metabolitos son los AGCC y péptidos antimicrobianos (Rowland *et al.*, 2010; Servin, 2004; Gibson y Fuller, 2000; Torres-Maravilla *et al.*, 2016).

Posteriormente, estas pruebas deben ser evaluadas *in vivo*, lo que permite demostrar el beneficio clínico sobre la salud del huésped. Por ello cuando se aísla una bacteria con potencial probiótico se debe tener en cuenta para su evaluación todas las especificaciones descritas anteriormente ya que esto permitirá contar con nuevos microorganismos adecuadamente caracterizados y que puedan ser empleados para el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos que sirvan como estrategias de prevención y tratamiento (Venugopalan *et al.*, 2010).

3.1.3. Fuente de aislamiento de Probióticos

Existen diversas fuentes donde se pueden aislar microorganismos probióticos, entre las que se encuentran los alimentos fermentados, de los cuales se han aislado bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Liong, 2011). Por otra parte, la leche materna humana es una fuente rica en microorganismos probióticos, entre los cuales se encuentran *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium* (Perez-Cano, *et al.*, 2010; Solis *et al.*, 2010; Gueimonde *et al.*, 2007; O'Hara y Shanahan, 2006; Martin *et al.*, 2003).

Otra fuente importante para el aislamiento de microorganismos con potencial probiótico es el tacto gastrointestinal, que contiene más de 500 especies de bacterias. De este, se han aislado bacterias con propiedades probióticas como *L. gasseri* y *L. reuteri* (Ryan *et al.*, 2008). Por otro lado, *L. fermentum* fue aislado de biopsias de la mucosa del colon humano, esta bacteria tiene actividad antimicrobiana contra patógenos (Varma *et al.*, 2010). Por ejemplo, se han aislado *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. vaginalis*, *L. reuteri* y *L. salivarius* de muestras humanas (Ryan *et al.*, 2008). Sin embargo, no se ha reportado el aislamiento de bacterias con potencial probiótico de población mexicana y tampoco se tiene registro del aislamiento de bacterias que provengan de muestras de personas con diferente condición de peso.

3.1.4. Funciones de los probióticos en el huésped

Actualmente se sabe que en la microbiota intestinal se encuentran bacterias con potencial probiótico que tienen funciones metabólicas, de protección y tróficas en el organismo (Villanueva-Millan *et al.*, 2015)

3.1.4.1. Metabólicas

Las bacterias son el factor principal en la obtención y almacenamiento de energía en el intestino del huésped a partir de la producción de diversas enzimas que el huésped no posee. Dichas enzimas participan en la hidrólisis y fermentación de los polisacáridos no digeribles provenientes de la dieta (Guarner y Malagelada, 2003), en la producción de AGCC, los cuales tienen diversos efectos como modular la lipogénesis y como agentes inductores de la saciedad (Flint *et al.*, 2015). Otras funciones de los AGCC es la modulación del pH tanto en la mucosa y al interior de las células, además modifican el transporte de iones en las células y disminuyen la solubilidad de los ácidos biliares (Wong *et al.*, 2006).

Otra función metabólica de los microorganismos del tracto gastrointestinal es participar en la degradación de sales biliares primarias que son sintetizadas a partir del colesterol, así disminuyendo los niveles séricos del mismo. Los mecanismos probables por los cuales las bacterias pueden realizar las funciones ya mencionadas son: circulación enterohepática, la síntesis de novo de sales biliares y factor de adipocitos inducido por ayuno, la formación de emulsiones y absorción de colesterol (Martínez *et al.*, 2009). Por otro lado, los probióticos tienen la capacidad de hacer biotransformaciones de fármacos y sus metabolitos en el organismo del huésped,

de manera que puede modificarse la absorción y biodisponibilidad de dichos fármacos (Wilson y Nicholson, 2009). Por último, se ha reportado que las bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* producen tiamina, riboflavina, piridoxina y vitamina k (Gu y Li, 2016).

3.1.4.2. Tróficas

La función trófica se refiere a la intervención de las bacterias en el control, proliferación y diferenciación de células epiteliales; así como el desarrollo y la homeostasis del sistema inmune en el huésped (Guarner y Malagelada, 2003). Los microorganismos llevan a cabo las funciones tróficas mediante los AGCC que estos producen. Un ejemplo de esto es el butirato el cual modifica la microestructura del intestino delgado y grueso, es capaz de acelerar la maduración de la mucosa intestinal durante el desarrollo o en la reparación de esta y por lo tanto permitir la proliferación, diferenciación, maduración y reducción de apoptosis en los enterocitos normales del intestino. En contraste la ausencia del butirato en el colon induce apoptosis masiva de los coloncitos, debido a que el butirato es la fuente de energía principal de estos (Flint *et al.*, 2015; Guilloteau *et al.*, 2010).

Los probióticos también tienen un papel importante en el desarrollo del sistema inmune del huésped, aumentando la función de las células del epitelio intestinal, protege las células epiteliales contra el estrés fisiológico, modula los perfiles de secreción de citosinas en los linfocitos T y aumenta de la secreción de anticuerpos (Thomas y Versalovic, 2010; Guarner y Malagelada, 2003). Por ejemplo, un gran número de microorganismos probióticos han mostrado modificar

la respuesta inflamatoria de microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium paratuberculosis* entre otros (Quigley, 2011).

3.1.4.3. Protección

En la actualidad un área de investigación en la cual se ha puesto atención es en generar estrategias y mecanismos de protección del intestino contra microorganismos patógenos. En esta área de investigación es importante considerar la interacción que existe entre los probióticos y el huésped ya que las bacterias son la primera barrera del huésped ante los microorganismos patógenos (Kamada *et al.*, 2013). Existen algunas bacterias benéficas que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas mediante diversos mecanismos por ejemplo compitiendo por un mismo sitio de adhesión, mediante la producción de AGCC, péptidos antimicrobianos o bacteriocinas (Guarner y Malagelada, 2003). En el caso de la infección producida por *Clostridium difficile*, microorganismo patógeno nosocomial resistente a los antibióticos y que en el 2011 produjo 453 mil casos por infección y de estos 29 mil resultaron en muerte (Leffler y Lamont, 2015), las bacteriocinas producidas por otros microorganismos pueden ser capaces de inhibir el crecimiento de *C. difficile*, de hecho en la terapia contra este microorganismo y las diarreas asociadas a su infección se utiliza la administración de *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus acidophilus* y *bulgaricus*, *Enterococcus fecium* SF68, *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus* GG (Gebhart *et al.*, 2015; Schubert *et al.*, 2015; Quigley, 2011).

3.2. Nuevos Probióticos

3.2.1. *Faecalibacterium prausnitzii*

F. prausnitzii es un bacilo de longitud variable, Gram negativo, no forma esporas, no móvil. Utiliza glucosa, fructuosa, almidón; celobiosa, maltosa como fuente de carbono y energía (Duncan *et al.*, 2002; Vos *et al.*, 2011). Por otro lado, las colonias son circulares en agar YCFAC, translúcidas, incoloras y catalasa negativa (Vos *et al.*, 2011), es una bacteria anaerobia estricta (Ramakrishna, 2007). Pertenece al *phylum* Firmicutes (Ulluwishewa *et al.*, 2015) y es el principal productor de ácido butírico de este *phylum* (Foditsch *et al.*, 2015).

La importancia de esta bacteria está en el papel que desempeña sobre la salud del huésped. Se sabe que las altas concentraciones de ácido butírico que *F. prausnitzii* produce tiene un efecto benéfico sobre las células del colon al favorecer la diferenciación y proliferación de dichas células, asimismo, tiene efecto en la disminución de procesos inflamatorios, en el estrés oxidativo y en la apoptosis celular (Andoh *et al.*, 1999; Hamer *et al.*, 2008). Por otro lado, en modelos animales *F. prausnitzii* ha mostrado propiedades antiinflamatorias en la enfermedad de colitis (Fujimoto *et al.*, 2013).

Para que *F. prausnitzii* colonice el tracto gastrointestinal se necesitan varios factores, los cuales comprenden la colonización de bacterias comensales, factores mediadores de reacciones de óxido-reducción, la concentración de oxígeno en el intestino, el grosor de la capa de moco, así como la concentración de sales biliares y el pH del intestino (Miquel *et al.*, 2015)

3.2.2. *Akkermansia muciniphila*

Este microorganismo es anaerobio estricto, Gram negativo, perteneciente al súper *phylum* Planctomycetes-Verrucomicrobia-Chlamydiae, utiliza las mucinas intestinales como única fuente de carbono y nitrógeno (Derrien *et al.*, 2004). Sus colonias son circulares de color transparentes a color blanco, se agrupa en forma de diplococos con un largo de 0.6 a 1.0 μm . Actualmente se sabe muy poco del papel que tiene esta bacteria en la salud del huésped. Sin embargo, se ha reportado que *A. muciniphila* ayuda al mantenimiento de la salud regulando los niveles de glucosa en la sangre del huésped (Joyce y Gahan, 2014; Swidsinski *et al.*, 2011; Png *et al.*, 2010). Por otro lado, Dao *et al.* (2016) ha demostrado que *A. muciniphila* disminuye el tejido graso en individuos obesos y que tiene una regulación de los niveles de glucosa en la sangre, debido a que al disminuir el tejido adiposo también disminuyen los procesos inflamatorios, ayuda a la homeostasis de los grupos bacterianos en el intestino. También, se ha demostrado la capacidad de *A. muciniphila* para estimular al sistema inmune y la producción de mucina por parte del huésped aumentando así el grosor de la mucosa intestinal y las células epiteliales quedan con una mayor protección ante las bacterias patógenas (Ouwerkerk *et al.*, 2016).

3.2.3. *Oxalobacter formigenes*

Este microorganismo, las colonias son redondas transparentes es una bacteria Gram negativa, anaerobia estricta, con forma de bacilo curvo, no móvil, no forma esporas con un largo de 0.4 y 0.6 μm , perteneciente al *phylum* Proteobacteria y a la clase β -Proteobacteria. Gram negativas, no móviles ni formadoras de esporas.

La existencia de esta bacteria se dio a conocer por su papel en la adaptación del ganado a dietas con alto contenido de oxalato y en la prevención de la toxicidad por el mismo (Allison y Cook, 1981; Allison *et al.*, 1977).

Esta bacteria se ha utilizado para contrarrestar los niveles altos de oxalato en el cuerpo ya que requiere oxalato como fuente de carbono (Knight *et al.*, 2013). Las investigaciones realizadas indican que una disminución en la concentración de esta bacteria es un factor de riesgo para la formación de cálculos renales de oxalato de calcio (Kaufman *et al.*, 2008) el cual incrementa con el consumo de ciertos alimentos, entre los que se encuentran principalmente el chocolate, las espinacas crudas y las nueces (Holmes y Assimós, 1998).

4. Planteamiento del problema

Actualmente se ha reportado la existencia de microorganismos con potencial probiótico, los cuales pueden tener mayores o diferentes efectos sobre la salud a los ya reportados en los probióticos tradicionales. Sin embargo, para que un microorganismo sea considerado probiótico, debe reunir características muy específicas, entre las que se encuentran su seguridad y que confiera beneficios a la salud del huésped. Por otro lado, hoy en día las fuentes de aislamiento de las bacterias con propiedades probióticas son los alimentos fermentados; sin embargo, el tracto gastrointestinal que por la diversidad y riqueza de las bacterias comensales que ahí habitan es una fuente prometedora para el aislamiento de microorganismos con efectos benéficos para la salud y que recientemente, debido al estudio del microbioma, ha aumentado la atención a la búsqueda de nuevos probióticos.

Por otro lado, las bacterias dependiendo del ambiente en que se encuentren van a sintetizar moléculas que le ayuden a desarrollarse. Por ello, la presente investigación tuvo como objetivo el aislamiento de las bacterias de tres grupos de personas con diferente condición de peso, ya que las personas delgadas tienen mecanismos metabólicos diferentes a las personas obesas y se ha reportado que los individuos delgados presentan diferencias en la microbiota intestinal con respecto a los individuos con sobrepeso y obesidad.

5. Hipótesis

F. prausnitzii, *O. formigenes* y *A. muciniphila* que se encuentran en el intestino humano son microorganismos que podrían tener propiedades probióticas. Además, la concentración en heces de *F. prausnitzii*, *O. formigenes* y *A. muciniphila* en personas delgadas y obesas es diferente.

6. Objetivos

6.1. General

Aislar, cuantificar y caracterizar *F. prausnitzii*, *O. formigenes* y *A. muciniphila*, presentes en la microbiota intestinal de individuos jóvenes delgados y obesos.

6.2. Específicos

- Cuantificar *F. prausnitzii*, *O. formigenes* y *A. muciniphila* en heces de jóvenes delgados y obesos.
- Aislar e identificar *F. prausnitzii*, *O. formigenes* y *A. muciniphila* de la microbiota intestinal humana de jóvenes delgados y obesos.
- Caracterizar molecularmente *F. prausnitzii*, *O. formigenes* y *A. muciniphila*.

7. Materiales y métodos

En la Figura 1 se muestra un resumen de la metodología utilizada en este trabajo.

7.1. Selección de sujetos

En la Figura 2 se muestra el proceso completo de la selección de los sujetos de estudio, que fueron alumnos del Tronco Divisional de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Los sujetos fueron invitados a participar en el proyecto mediante pláticas informativas para la donación de muestras. Después de la plática se les invito a llenar voluntariamente una encuesta de selección (Anexo 1). Un total de 378 sujetos hombres y mujeres accedieron. Posteriormente con los resultados de dicha encuesta se seleccionaron a 216 sujetos para la segunda etapa con un rango de edad que iba desde los 18 a los 25 años, en esta etapa solo 89 sujetos de los seleccionados se presentaron a realizar la bioimpedancia y el llenado del consentimiento informado (Anexo 2) y posteriormente un cuestionario de frecuencia de consumo (Anexo 3), que fue analizado por el Sistema de Nutrimientos (SNUT V 2.1, México; Hernández-Ávila *et al.*, 2000) a partir del cual se determinó la información nutricional de los participantes la cual se utilizó para ver la correlación entre el consumo de macronutrientes, la energía y la cantidad de bacterias. Finalmente 24 sujetos (9 delgados, 8 sobrepeso y 7 obesos) fueron seleccionados para la tercera etapa, los cuales proporcionaron una muestra de heces y se les realizó una segunda bioimpedancia. La manera en que se realizó

la división de los sujetos de estudio fue mediante su estado de nutrición, es por ello, que al final se obtuvieron los tres diferentes grupos. Para determinar dicho estado de nutrición se utilizaron los resultados de la bioimpedancia y los valores de referencia de la OMS, los cuales indican que una persona delgada tiene un IMC entre 18.5 y 24.9 kg/m², para una persona con sobrepeso el IMC está entre 25.0 y 29.9 kg/m², por último, para una persona obesa el IMC debe ser mayor a 30.0 kg/m² (WHO, 2017).

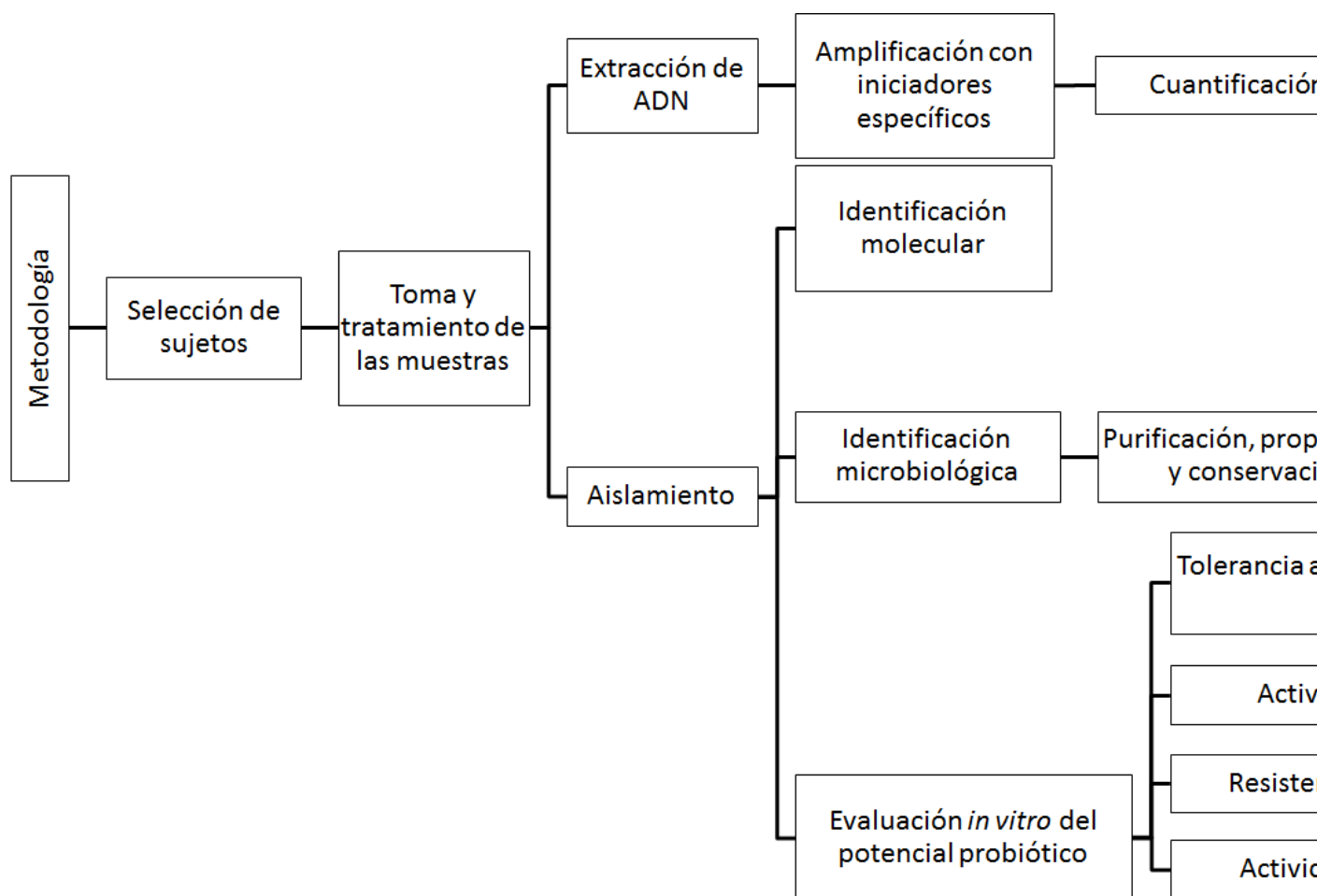


Figura 1. Diagrama metodológico utilizado en el presente trabajo.

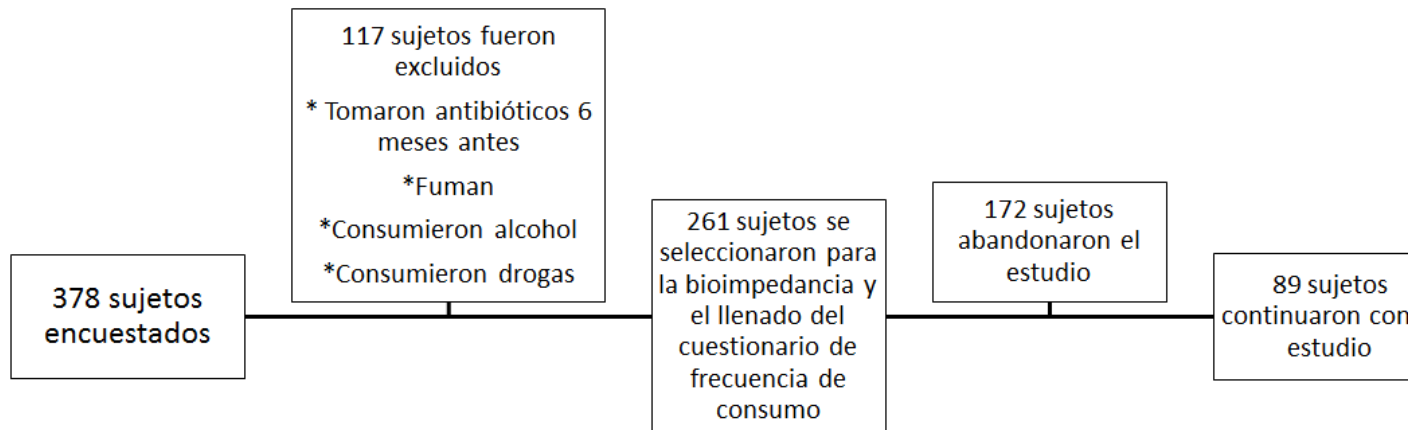


Figura 2. Proceso de obtención de las muestras de la población de estudio

7.2. Cuantificación *A. muciniphila*, *F. prausnitzii* y *O. formigenes* en heces

A los sujetos de estudio se les pidió la primera muestra fecal del día. Las muestras se introdujeron inmediatamente a una atmósfera anaerobia que contenía 85 % de nitrógeno, 10 % de CO₂ y 5 % de hidrógeno, las cuales se mantuvieron durante todo el tratamiento. Después, las muestras fecales fueron agrupadas de acuerdo con la condición de peso de los individuos: Delgado, sobrepeso y obeso.

Se obtuvieron 3 mezclas de cada grupo de estudio, de cada una de ellas se tomó 1 g de muestra y se le extrajo el ADN genómico utilizando el kit Qiagen QIAamp DNA stool Mini kit (Qiagen, Estados Unidos). El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN genómico de cada grupo se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

Posteriormente, el ADN genómico de cada grupo se le realizó un PCR punto final utilizando iniciadores específicos para cada bacteria propuesta (Tabla 1). Esto con el fin de obtener las condiciones de amplificación en PCR tiempo real.

Tabla 1. Iniciadores utilizados para identificar y cuantificar los microorganismos de interés.

Microorganismo	Forward 5' a 3'	Reverse 5' a 3'	Referencia
<i>F. prausnitzii</i>	GGAGGATTGA CCCCTTCAGT	CTGGTCCCGA AGAAACACAT	(Dethlefsen, <i>et al.</i> , 2008)
<i>O. formigenes</i>	AATGTAGAGT TGA CTGA	TTGATGCTGT TGATACG	(Kumar <i>et al.</i> , 2002)
<i>A. muciniphila</i>	CAGCACGTGA AGGTGGGGAC	CCTTGCGGTT GGCTTCAGAT	(Derrien <i>et al.</i> , 2011)
Iniciador universal para la subunidad ribosomal 16s	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	GTT TAC CTT GTT ACG ACT T	(Piterina <i>et al.</i> , 2010)

Los volúmenes utilizados en la reacción de PCR punto final para *A. muciniphila* fueron 25 µL de hot taq 2x (Quiagen), 1 µL de cada iniciador 10 µM (Tabla 1), ADN genómico 1 µL, agua 22 µL a un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación fueron: un primer ciclo de 95 °C 15 minutos, seguido de 40 ciclos que consistieron en 95 °C 15 segundos, 52° C 40 segundos y 72 °C 30 segundos, y un ciclo más de 72 °C 5 minutos (Derrien *et al.*, 2011).

Para *O. formigenes* los volúmenes utilizados en la reacción de PCR tiempo final fueron 25 µL de hot taq 2x (Quiagen), 1 µL de cada iniciador 10 µM (Tabla 1), ADN genómico 1 µL, agua 22 µL a un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación fueron; un primer ciclo de 95 °C 15 minutos, seguido de 10 ciclos que consistieron en 94 °C 1 minuto, 59 °C 1 minuto y 72 °C 1 minuto; seguido de 30 ciclos que consistieron en 94 °C 1 minutos, 55 °C 1 minuto y 72 °C 1 minuto, y un ciclo más de 72 °C 5 minutos (Kumar *et al.*, 2002).

Por último, para *F. prausnitzii* los volúmenes utilizados en la reacción de PCR punto final fueron: 25 µL hot taq 2x (Quiagen), 1 µL de cada iniciador 10 µM (Tabla 1), ADN genómico 1 µL, agua 22 µL a un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación fueron: un primer ciclo de 95 °C 15 minutos, seguido de 40 ciclos que consistieron en 95 °C 30 segundos, 52 °C 30 segundos y 72 °C 10 segundos, y un ciclo más de 72 °C 5 minutos (Dethlefsen *et al.*, 2008).

Para la cuantificación de los microorganismos de interés, primero se realizó una curva estándar de *E. coli*. El microorganismo se cultivó en caldo MRS a 37 °C por 24 horas en condiciones aerobias, posteriormente se realizaron las siguientes diluciones: 1×10^1 , 1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 y 1×10^9 UFC/mL, a las cuales se les extrajo el ADN genómico. Las diluciones fueron los puntos que conformaron la curva estándar para el qPCR. Para obtener las condiciones de amplificación del ADN genómico de *E. coli* se realizó PCR punto final utilizando los iniciadores universales para la subunidad ribosomal 16s, el 27f y 1491r (Piterina *et al.*, 2010), bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos que consistieron en 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 20 segundos y 72 °C 40 segundos y un ciclo más de 68 °C por 7 minutos. Una vez realizada la curva estándar se procedió a la cuantificación por PCR en tiempo real de cada microorganismo.

La cuantificación de *A. muciniphila* y *F. prausnitzii* se realizó en un PCR tiempo real Step One plus (Applied Biosystems™, EUA), utilizando los siguientes volúmenes de reacción para las 3 bacterias, SYBR® select master mix 2x 10 µL, iniciador forward 1 µL, iniciador reverse 1 µL, ADN 3 µL, agua 5 µL, a un volumen

final de 20 μ L utilizando las condiciones de amplificación mencionadas anteriormente para cada microorganismo.

7.3. Aislamiento de *A. muciniphila*, *F. prausnitzii* y *O. formigenes* a partir de las muestras de heces de cada condición de peso.

Para el aislamiento de *A. muciniphila* y *O. formigenes* una cantidad de 5 gramos de muestra de heces proporcionadas por los sujetos de estudios fueron tratadas con 20 mL de solución anaeróbica Ringer's (Miller, 2004) que contenía por litro: 0.05 g de NaHCO_3 , 0.12 g de CaCl_2 , 0.105 g de KCl y 2.25 g de NaCl. Dicha solución se utilizó para la homogeneización (mediante un vórtex) de toda la muestra. Una vez que todas las muestras se homogeneizaron, se tomó un mililitro de cada una y se llevaron a un tubo Falcón estéril de 50 mL, para tener una mezcla de cada condición de peso. Cada mezcla se homogeneizó y de ahí se tomaron 100 μ L que fueron llevados a un volumen final de 1 mL con solución de Ringer (dilución 1:10) a partir del cual se realizaron diluciones decimales consecutivas hasta $1:10^{-9}$. A partir de la primera dilución y hasta la última, se sembraron 100 μ L en el agar correspondiente para cada microorganismo. Para *A. muciniphila* se utilizó el medio descrito por Derrien et al., (2004). Cada litro de medio estaba compuesto por 0.4 g de KH_2PO_4 , 0.53 g de NaH_2PO_4 , 0.3 g de NH_4Cl 0.3 g de NaCl, 0.1 g de MgCl_2 ($6\text{H}_2\text{O}$), 0.11 g de CaCl_2 , 1 mL de solución de traza de metales alcalinos, 1 mL de solución de metales ácidos, 1 mL de solución de vitaminas: tiamina, riboflavina, piridoxina y cianocobalamina (Bedoyecta[®]), 0.5 mg de resarzurina, 15.0 g de agar bacteriológico 4.0 g de NaHCO_3 y 0.25 g de Na_2S ($9\text{H}_2\text{O}$). El medio fue enriquecido con líquido ruminal clarificado y mucina de puerco tipo II (Sigma), los cuales estuvieron en una concentración final de 0.7% y 0.25% respectivamente. La

solución de traza de metales ácidos estaba compuesta por 7.5 mM de FeCl_2 , 1mM de H_3BO_3 , 0.5 mM de ZnCl_2 , 0.1 mM CuCl_2 , 0.5 mM de MnCl_2 , 0.5 mM de CoCl_2 , 0.1 mM NiCl_2 y 50 mM de HCl. Mientras que la solución de metales básicos estaba compuesta por 0.1 mM de Na_2SeO_3 , 0.1 mM de Na_2WO_4 , 0.1 mM de Na_2MoO_4 y 10 mM de NaOH (Stams, *et al.*, 1993).

Para *O. formigenes* se utilizó el medio descrito por Daniel et al. (1987), el cual contenía por litro: 0.25 g de KH_2PO_4 , 0.25 g de K_2HPO_4 , 0.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.025 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mL de solución de traza de metales ácidos, 0.82 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, 2.7 g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 1.0 g de CaCl_2 , 1.0 g de extracto de levadura, 0.1 mg de resazurina (como indicador de anaerobiosis), 15.0 g de agar bacteriológico, 4.0 g de NaHCO_3 y 0.5 g de clorhidrato de cisteína monohidratado. El agar se enriqueció con 14 mM de cloruro de calcio, 20% de líquido ruminal clarificado y 30 mM de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, el pH final fue ajustado 6.8 con HCl 1N.

Las cajas Petri para la selección de cada microorganismo se incubaron por 48 horas a 37 °C en las condiciones anaerobias ya descritas previamente. Después del tiempo de incubación, se tomó la caja de la dilución donde se observaron colonias aisladas. Cada colonia seleccionada se le determinó su morfología microscópica a través de la tinción de Gram. Posteriormente, para el caso de las colonias en el medio de *A. muciniphila* mostraron morfología circular, las células eran Gram negativas y que se agrupaban en forma de diplococos. Estas fueron seleccionadas para continuar con su purificación (Derrien *et al.*, 2004). Para el caso de *O. formigenes* las colonias que mostraron una morfología redonda, plana y Gram

negativas y con forma de bacilos curvos. Fueron seleccionadas para continuar con su purificación, de acuerdo con Allison et al. (1985).

Para la purificación de las colonias seleccionadas, se realizaron cultivos sucesivos en cajas Petri que contenían agar fresco correspondiente a cada microorganismo de interés. Una vez que se corroboró que el microorganismo estaba puro se procedió a su propagación para tener suficiente muestra de trabajo. Dicha muestra fue conservada a -4 °C en el mismo medio con 20% de glicerol hasta su uso posterior.

Para el aislamiento de *F. prausnitzii*, se usó el medio M2GSC propuesto por López-Siles et al. (2012); las heces de cada condición de peso fueron homogeneizadas utilizando 10 mL de caldo extracto de levadura, hidrolizado de caseína y ácidos grasos (YCFA por su nombre en inglés). El cual contenía por cada 100 mL: 1.0 g de caseína, 0.25 g de extracto de levadura, 0.4 g de NaHCO₃, 0.2 g de celobiosa, 30% de líquido ruminal clarificado, 0.1 g de L-cisteína, 0.045 g de K₂HPO₄, 0.045 g de KH₂PO₄, 0.09 g de (NH₄)₂SO₄, 0.09 g NaCl, 0.009 g de MgSO₄·7H₂O, 0.009 g de CaCl₂, 0.1 mg de resazurina (indicador de anaerobiosis), 1 mg de hemina (la cual aporta selectividad al medio, pues algunas bacterias requieren de hemina como factor de crecimiento, ya que carecen de las enzimas para sintetizar este compuesto). El medio fue enriquecido con 1 µg de biotina, 1 µg de cobalamina, 3 µg de ácido p-aminibenzoico, 5 µg de ácido fólico y 15 µg de pirodoxamina.

Una vez homogeneizadas, se tomó 1 mL de cada muestra de heces y se llevó a un tubo Falcón estéril de 50 mL para tener una mezcla de heces de cada condición de peso. Cada mezcla se homogeneizó y se tomaron 100 μ L que fueron nuevamente suspendidos en 900 μ L de medio YCFA para obtener un volumen final de 1 mL (dilución 1:10). A partir de esta solución se realizaron diluciones consecutivas tomando 100 μ L de la dilución anterior y nuevamente se suspendieron en 900 μ L de medio YCFA, se realizaron diluciones seriales. Finalmente se sembraron 100 μ L de la quinta dilución hasta la última en cajas petri que contenían agar YCFA. Las cajas petri se incubaron por 48 horas a 37 °C en las condiciones anaerobias ya descritas previamente. Después del tiempo de incubación, se tomó la caja de la dilución donde se observaron colonias aisladas. Las colonias que fueron translúcidas y circulares fueron seleccionadas para realizarles la tinción de Gram y se observaron en el microscopio utilizando un aumento de 100x. Por lo que las colonias que fueron bacilos largos de 2 – 14 μ m, no móviles, no esporuladas, Gram negativo (Vos *et al.*, 2011) fueron seleccionadas para su purificación a través de pases sucesivos en agar fresco. Una vez que se corroboró que el microorganismo estaba puro se procedió a su propagación para tener suficiente muestra de trabajo. Dicha muestra fue conservada a -4°C en el mismo medio con 20% de glicerol para su uso posterior.

7.4. Pruebas bioquímicas

7.4.1. Prueba de catalasa

La prueba se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno por medio de la enzima catalasa dando como resultado agua y oxígeno, manifestándose

este último por la aparición de burbujas (Abriouel *et al.*, 2004). Previo a la determinación de la catalasa se sembró cada cepa en agar y se incubó a 37 °C por 24 horas en una atmósfera anaeróbica que estaba compuesta por 85 % de nitrógeno, 10 % de CO₂ y 5 % de hidrógeno. La presencia de la enzima catalasa se determinó añadiendo una gota de peróxido de hidrógeno a una alícuota del cultivo y después de tres segundos se observó la presencia o ausencia de burbujeo. Un resultado positivo fue aquel que presentó la formación de burbujas cuando el reactivo se puso en contacto con el cultivo, mientras que un resultado negativo fue aquel en donde no hubo reacción. Como control positivo se empleó un cultivo de *E. coli* y como control negativo se empleó un cultivo de *L. casei* sp.

7.4.2. Prueba de oxidasa

La prueba se basa en la determinación de la presencia del citocromo C, el citocromo C oxida al TMFD y como resultado de la oxidación da un color azul (Shields y Cathcart, 2013).

Previo a la determinación de la oxidasa se sembró cada cepa en agar y se incubó a 37 °C por 24 horas en una atmósfera anaeróbica que estaba compuesta por 85 % de nitrógeno, 10 % de CO₂ y 5 % de hidrógeno. La presencia de la enzima oxidasa se hizo añadiendo una gota de NNN'N', tetrametil, 1-4, fenilendiamina (TMFD) al 1% a una alícuota del cultivo dejando pasar 10 segundos después de este tiempo si no había cambio en la coloración del cultivo la prueba se toma como negativo, posterior a este tiempo el resultado es incorrecto. Como control positivo

se empleó un cultivo de *E. coli* y como control negativo se empleó un cultivo de *L. casei* sp.

7.4.3. Patrón de fermentación

Para el caso de los microorganismos aislados en el medio que contenía celobiosa como fuente de energía, se realizó un patrón de fermentación de carbohidratos para ver si dichas bacterias podían crecer en otros azúcares (simples y complejos). El medio de cultivo base que se usó para llevar a cabo este proceso fue el caldo YCFA y se modificó adicionando el carbohidrato a usar. Los carbohidratos que se evaluaron fueron: glucosa, almidón, inulina, galactosa, celobiosa, pectina, ramnosa y Maltosa (Lopez-Siles *et al.*, 2012).

Para la fermentación de carbohidratos se sembró cada cepa en agar y se incubó a 37 °C por 24 horas en una atmósfera anaeróbica que estaba compuesta por 85 % de nitrógeno, 10 % de CO₂ y 5 % de hidrógeno. Después de las 24 horas el cultivo se recolectó y se inocularon viales que contenían 10 mL de caldo con cada uno de los carbohidratos. La fermentación de carbohidratos se evaluó mediante el aumento de la biomasa determinada por cuenta en placa; a las 0, 8, 12 y 24 horas.

7.4.4. Determinación de la cuenta viable

Para la determinación de la cuenta viable se tomó 100 µL de la solución stock y se llevó a 1000 µL, posteriormente se tomaron 100 µL de la dilución anterior hasta llegar a una dilución de 1:10⁻⁹. Se tomó una alícuota de 5 µL de cada dilución y se agregó a medio de cultivo sólido de acuerdo con el microorganismo evaluado y se incubó 24 horas a 37 °C en una atmósfera anaerobia.

7.5. Identificación molecular de los microorganismos aislados

Las colonias seleccionadas se propagaron en su medio correspondiente y se incubaron por 12 horas en una atmósfera anaeróbica. Posteriormente toda la biomasa se colocó en solución amortiguadora de fosfatos (PBS 60 mM). La extracción del ADN se realizó usando el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Kit Protocol (Promega, EUA) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. El ADN resultante se almacenó a -20 °C para su uso posteriormente.

Para la identificación de las cepas se amplificó la secuencia de la subunidad 16 S del ADN con los iniciadores universales, 27f y 1491r bajo las condiciones antes descritas (Piterina, *et al.*, 2010). Los productos de PCR amplificados se purificaron con el kit de purificación QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, EUA). La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (en colaboración con el M. en C. Ricardo Canek Rivera Arroyo). Las comparaciones y alineaciones de cada secuencia se llevaron a cabo mediante el uso del software para análisis de secuencias de ADN BioEdit y la herramienta de alineamiento básica de la NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La construcción del árbol filogenético se realizó a partir del software Mega 5 (Hall, 2013).

7.6. Actividad hemolítica

Para determinar la actividad hemolítica de los microorganismos aislados, se empleó el método de detección de Ruiz-Moyano et al. (2009) el cual consistió en sembrar cada una de las cepas en el agar de la misma composición del medio donde

fueron aisladas y adicionando 5% de sangre, se incubaron 12 horas en una atmósfera anaeróbica. Se consideró presencia de hemólisis cuando el agar cambió de color rojo a verde o tenía halos de color blanco alrededor de la colonia.

7.7. Evaluación *in vitro* al estrés gastrointestinal de las cepas seleccionadas

Se utilizaron tres soluciones que simulaban el estrés gastrointestinal (solución de saliva, jugo gástrico y fluido intestinal). La condición de estrés de saliva contenía una solución amortiguadora de fosfato salino 60 mM a pH de 6.2 y lisozima al 0.01 %, las bacterias fueron sometidas a la solución por 5 minutos. La simulación del jugo gástrico contenía pepsina al 0.3% y NaCl al 0.5% a pH 2.0, las bacterias se sometieron por 90 minutos. La simulación de fluido intestinal consistió en una solución que contenía PBS 60 mM, 0.5% de oxgal y 1 g/L de pancreatina, el pH final de la solución fue de 6.8, los microorganismos se expusieron a esta condición por 150 minutos (González-Vázquez *et al.*, 2015). La tolerancia de cada cepa se determinó antes y después de ser sometida a cada condición de estrés por cuenta en placa. Se usó una alícuota inicial de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL y al finalizar se determinó las UFC que sobrevivieron al final del estrés.

7.8. Actividad antimicrobiana

Para ver la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas se usó la técnica de Presti *et al.* (2015) modificada, 1 mL de una suspensión de 1×10^8 UFC/mL de cada cepa, se inoculó en cajas Petri con agar específico para cada cultivo. Se inocularon cuatro cajas por cada cepa y se incubaron a 37 °C por 24 horas en una atmósfera anaeróbica. Posteriormente, a cada caja Petri se le agregó 15 mL de agar

MRS. Cada caja se inoculó con bacterias patógenas: *E. coli* O157 o *Salmonella typhi* ATCC 14028 en dos concentraciones, a 1×10^7 UFC/mL y 1×10^6 UFC/mL realizándose duplicados por cada una. Se incubaron por segunda vez a 37 °C por 24 horas en una atmósfera anaeróbica. Si las cepas presentaban actividad antimicrobiana las bacterias patógenas no crecían después de la segunda incubación.

7.9. Resistencia a antibióticos

Para ver la resistencia a antibióticos de cada cepa aislada, se tomó una alícuota de 1×10^8 UFC/mL de cada cepa y se inoculó en cajas petri que contenía agar para cada cultivo. Se inocularon dos cajas por cada cepa, posteriormente se le agregó un sensidisco a cada caja, el cual contenía: amikacina 30 µg, ampicilina 10 µg, carbenicilina 100 µg, cefalotina 30 µg, cefotaxima 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, cloranfenicol 30 µg, gentamicina 10 µg, netilmicina 30 µg, nitrofurantoína 300 µg, norfloxacina 10 µg, trimetropin-sulfametoxazol 25 µg; y se incubaron a 37 °C por 24 horas en una atmósfera anaeróbica. Para observar la resistencia de los microorganismos a los antibióticos se midió el halo de inhibición del crecimiento que el antibiótico produjo en el agar. Se consideró que los microorganismos fueron susceptibles a los antibióticos cuando el halo de inhibición que se formó fuera mayor a 25 mm, poco susceptibles cuando el halo de inhibición estuviera entre el rango de 14-17 mm y se consideró a los microorganismos resistentes cuando el halo de inhibición que mostraron fue menor a 14 mm (Torres-Maravilla *et al.*, 2016; González-Vázquez *et al.*, 2015).

7.10. Análisis estadístico

Para determinar si hay diferencias entre la cuantificación de las bacterias y en el patrón de fermentación de carbohidratos se realizó un análisis estadístico utilizando el software prisma GraphPad Prism 5, utilizando un análisis de varianza (ANOVA) y un test de comparación de múltiples variables de Tukey considerando una $p \leq 0.05$ como significancia estadística y un intervalo de confianza del 95%.

8. Resultados

8.1. Selección de sujetos

La muestra de estudio estuvo conformada por tres grupos, en la Tabla 2 se muestran la edad promedio de cada grupo, así como el IMC que tuvieron. Por otro lado, los grupos estuvieron conformados mayormente por hombres. Además, como se muestra en la Figura 2, el grupo obeso fue el que menos integrantes tuvo, esto debido a que la población estudiada del tronco divisional de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, tiende a tener peso normal y sobrepeso, y por tanto hay una menor incidencia de obesidad, ya que del total de 24 sujetos solo 7 pertenecen al grupo obeso.

Tabla 2. Características de los grupos de estudio.

Grupo (n)	Conformación del grupo	Edad (años)	IMC (kg/m ²)
Delgado (9)	33% mujeres 67% hombres	19.78 ± 1.30	21.31 ± 1.87
Con sobrepeso (8)	43% mujeres 57% hombres	21.22 ± 1.85	28.42 ± 0.99
Con obesidad (7)	38% mujeres 62% hombres	20.29 ± 1.98	35.94 ± 4.22

IMC entre 18.5 y 24.9 kg/m² delgado, IMC está entre 25.0 y 29.9 kg/m² sobrepeso y IMC mayor a 30.0 kg/m² obeso (WHO, 2017).

La encuesta de frecuencia de consumo (ver anexo 3) mostró que no hubo diferencia significativa en el tipo de dieta, dado que los tres grupos consumen la misma cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas (Tabla 3), lo que puede deberse al estilo de vida que lleva un estudiante, pues el estrés y la estancia prolongada en las instituciones provoca un desequilibrio en los hábitos alimenticios de los mismos (Castillo *et al.*, 2016). Por otro lado, hay existe un gran porcentaje de estudiantes que se mudan a otro estado para poder tener acceso a estudios superiores lo que desencadena a un desorden alimenticio, pues se ven obligados cambiar su estilo de vida (Unikel *et al.*, 2016).

Tabla 3. Consumo de macronutrientes de grupo de estudio.

Grupo	Ingesta total Kcal	Carbohidratos Kcal	Proteínas g	Lípidos g
Delgado	1808 ± 91.2	2232 ± 123.9	66.6 ± 33	71.9 ± 3.85
Con sobrepeso	1412 ± 91.9	1734 ± 123.7	47.2 ± 2.26	57.4 ± 3.67
Con obesidad	1688 ± 49.3	2000 ± 67.1	60.47 ± 1.33	68.8 ± 2.66

8.2. Cuantificación de *A. muciniphila* y *F. prausnitzii* en heces

La cuantificación se realizó PCR cuantitativo, en la Figura 3A se muestra la curva estándar. En la figura 3B y 3C se puede observar que el grupo obeso tiende a tener mayor cantidad de *A. muciniphila* y *F. prausnitzii*. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mayorga-Reyes *et al.*, (2016), donde reportaron una mayor cantidad de *F. prausnitzii* en heces de personas obesas. En contraste, Feng *et al.*, (2014) no reportaron diferencia en la concentración de *F. prausnitzii* entre las heces de los grupos delgados y obesos. Estos resultados probablemente

se deben a que el sobrepeso y la obesidad son estados de inflamación crónica y esta bacteria tiene propiedades antiinflamatorias; sin embargo, debido a las propiedades antiinflamatorias este tipo de bacterias es mayor en las personas obesas (Andoh *et al.*, 2016).

La cantidad de microorganismos también puede deberse al IMC de cada grupo de estudio, pues se ha reportado que hay un aumento en la concentración de *A. muciniphila* en población con obesidad; contribuyendo al mejoramiento del metabolismo, esto podría deberse a que esta bacteria actúa sobre los procesos antiinflamatorios y como la obesidad es considerada como un estado de inflamación crónica (Shin *et al.*, 2013), de ahí la hipótesis de que *A. muciniphila* se encuentre mayormente en las personas obesas. Por otro lado, el grupo delgado tiende a consumir mayormente grasa (Tabla 3) y la concentración de *F. prausnitzii* tiende a ser menor (Figura 4c). Se ha reportado que las concentraciones de *F. prausnitzii* decrecen cuando el consumo de grasas es mayor al control (Brahe *et al.*, 2016).

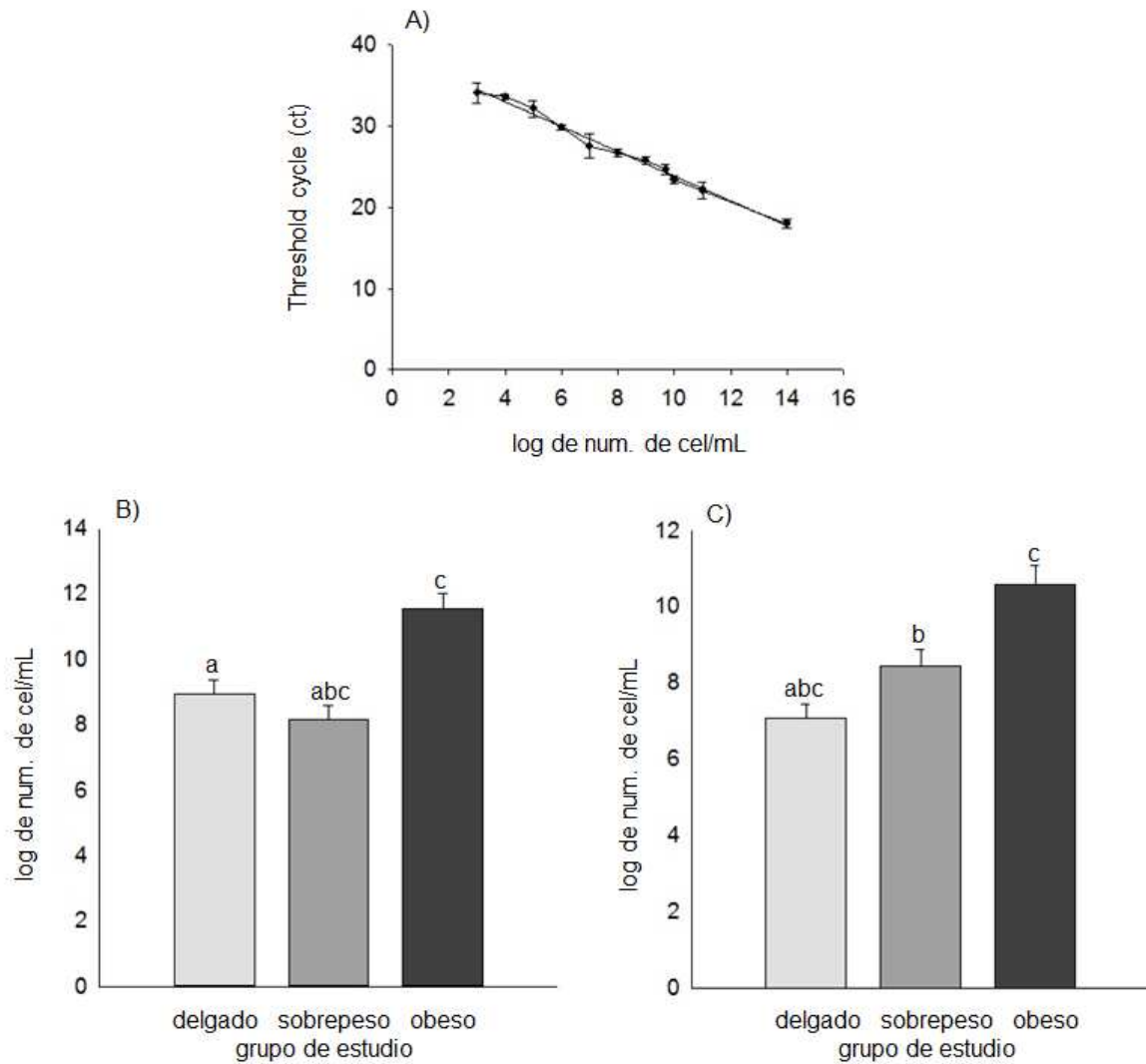


Figura 3. Cuantificación de las bacterias presentes en las heces de los diferentes grupos de estudio cuantificadas por qPCR; A) curva estándar, B) *A. muciniphila*, C) *F. prausnitzii*. (Letras diferentes indican diferencia significativa)

Por otra parte, la cuantificación de *O. formigenes* no dio ningún resultado, lo anterior puede deberse a los iniciadores, así como a las condiciones de amplificación; ya que al hacer un análisis de los iniciadores estos tuvieron una t_m por debajo de 50 °C, lo cual nos indica poca especificidad de los iniciadores al

momento de que estos se unen a la cadena molde para iniciar la amplificación. Por lo que para futuras investigaciones se recomienda diseñar iniciadores más específicos a partir de las secuencias que se encuentran en las bases de datos.

8.3. Aislamiento

En el medio de cultivo con oxalato, se obtuvieron células Gram negativas, no móviles ni formadoras de esporas. Su tamaño fue de 0.4 y 0.6 μm , las colonias fueron redondas transparentes; estas características son semejantes a las reportadas en la literatura (Allison *et al.*, 1985).

En el medio de cultivo con mucina tipo II, se obtuvieron colonias color blanco, ovaladas, no móviles, Gram negativo; con un largo de 0.6 a 1.0 μm que se presentaron en parejas o solas; estas características son semejantes a las reportadas en la literatura (Derrien *et al.*, 2004).

Por otro lado, en el medio con celobiosa, las colonias que se obtuvieron fueron translúcidas, incoloras y circulares, mientras que las células fueron Gram negativas, bacilos largos que van desde 2 μm hasta 14 μm , no móviles ni formadoras de esporas; estas características son semejantes a las reportadas en la literatura (Vos *et al.*, 2011).

8.3.1. Identificación molecular de las cepas aisladas

En la Figura 4 se puede observar los productos de PCR tiempo final de las cepas que se lograron aislar y purificar, por otro lado, en la Figura 5 se puede ver la purificación de dichos productos. El análisis bioinformático de las secuenciaciones permitió identificar molecularmente los aislados (Tabla 4).

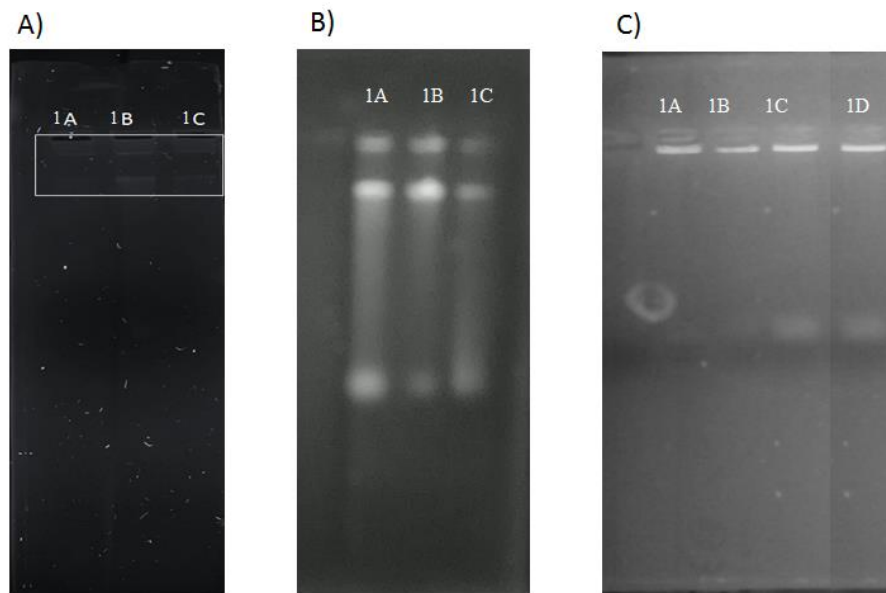


Figura 4. Productos de PCR obtenidos de la amplificación de las cepas aisladas; A) cepas aisladas del medio que contenía mucina donde 1A) cepa aislada del grupo delgado, 1B) cepa aislada del grupo con sobrepeso, 1C) cepa aislada del grupo con obesidad; B) cepas aisladas del medio que contenía oxalato donde 1A) cepa aislada del grupo delgado, 1B) cepa aislada del grupo con sobrepeso, C) cepa aislada del grupo con obesidad; C) cepas aisladas del medio que contenía celobiosa donde 1A) y 1B) cepa aislada del grupo delgado, 1C) y 1D) cepa aislada del grupo con obesidad.

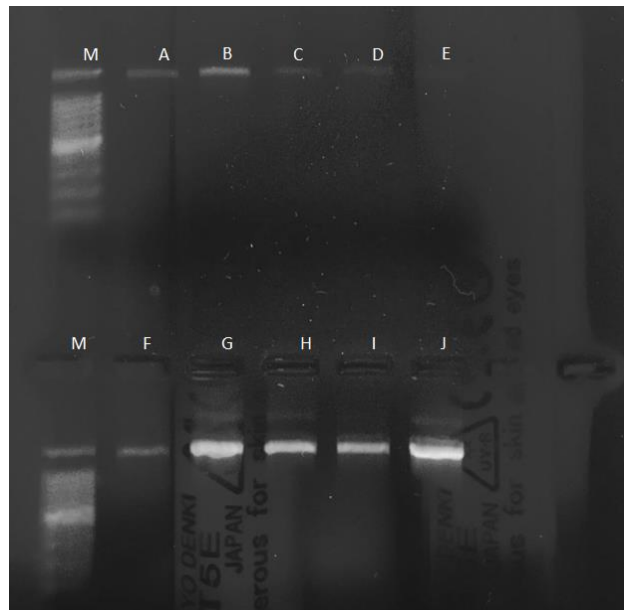


Figura 5. Purificación de los productos de PCR obtenidos de las cepas aisladas en el presente trabajo; donde M es el marcador, A-C son las cepas aisladas en el medio que contenía mucina, D-F son las cepas aisladas en el medio que contenía oxalato y G-J son las cepas aisladas en el medio que contenía celobiosa.

Tabla 4. Identificación molecular de las cepas aisladas de muestras de heces aisladas en diferentes medios de cultivo.

Medio de aislamiento	Grupo de estudio	Cepa aislada	Bacteria	% de identidad (NCBI)
Mucina	Delgado	1	<i>Escherichia coli</i> cepa MMCD1	100
	Sobrepeso	2	<i>Escherichia coli</i> cepa MMCS2	100
	Obesidad	3	<i>Enterobacter sp</i> cepa MMCO3	100
Oxalato	Obesidad	4	<i>Cronobacter sakazakii</i> cepa MOXO3	99
	Sobrepeso	5	<i>Escherichia coli</i> cepa MOXS2	100
	Delgado	6	<i>Erwinia persicina</i> cepa MOXD1	99
Celobiosa	Delgado	7	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLD1	100
	Delgado	8	<i>Bacillus oleronius</i> cepa MCLD2	100
	Obesidad	9	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO1	100
	Obesidad	10	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO2	100

Estos resultados muestran que no fue posible el aislamiento de *A. muciniphila*, *F. prausnitzii* y *O. formigenes*. Probablemente debido a las condiciones de aislamiento y a la del líquido ruminal usado. Es importante señalar que el líquido ruminal utilizado provenía de animales recién sacrificados y que durante los últimos meses de engorda, para producir más masa muscular, fueron alimentados con maíz que aporta gran cantidad de almidón y de azúcares lo que cambia la fuente de carbono proporcionada por este líquido y entonces, puede probablemente ser la razón por la que se aislaron otros microorganismos. En el aislamiento de las colonias en medios como el que se usó en este trabajo, en la literatura no se reporta

el tipo ni el origen del líquido ruminal. Sin embargo, en el presente trabajo el primer intento se realizó con líquido ruminal de vacas alimentadas con forraje. El tratamiento del líquido fue más fácil y al final se obtuvo un líquido claro. Pero fue imposible volver a obtener líquido ruminal de estas vacas por lo que se tuvo que conseguir en el rastro.

Al utilizar mucina en el medio diseñado para aislar *A. muciniphila* se aislaron *E. coli* y *Enterobacter* sp., distintas a las bacterias esperadas. *E. coli* puede degradar las cadenas laterales de la mucina y de esta manera es como puede crecer con esta fuente de carbono (Luo *et al.*, 2014). Además, se ha reportado en *E. coli*, una metaloproteasa altamente conservada la cual ayuda a la colonización del intestino debido a que degrada las principales mucinas del intestino humano (mucina tipo II y III). Además, los genes que codifican para esta proteína también se encuentran en otras enterobacterias, lo que podría justificar que en el medio de mucina también se aislará una cepa de *Enterobacter* sp del grupo obeso. La metaloproteasa ya mencionada también favorece la unión de esta bacteria al epitelio (Hews *et al.*, 2017).

En el medio que contiene oxalato se aislaron e identificaron 3 cepas correspondientes a *E. coli*, *Cronobacter sakazakii* y *Erwinia persicina*. Se ha reportado el aislamiento y la purificación de una formil-CoA transferasa en *E. coli* que es funcional y estructuralmente homóloga a la que necesita *O. formigenes* para la degradación del oxalato y así usarlo como fuente de carbono (Abratt y Reid, 2010). En un estudio realizado por Gruez *et al.* (2003) demostraron que *E. coli* tiene los genes que codifican para una enzima formil-CoA-transferasa (*frc*) y un oxalato

descarboxilasa (*oxc*), dichas proteínas aisladas de *E. coli* tienen una identidad del 60% respecto a las aisladas en *O. formigenes*. Para las otras dos cepas identificadas como *Cronobacter sakazakii* y *Erwinia persicina* respectivamente no se ha reportado la capacidad para utilizar al oxalato como fuente de carbono. Sin embargo, al ser aisladas en un medio que contenía oxalato estas bacterias podrían también degradar dicho compuesto y utilizarlo como fuente de carbono. Por lo que se debe de buscar los genes que codifiquen para las proteínas formil-CoA-transferasa y oxalato descarboxilasa, las cuales se necesitan para la degradación del oxalato.

Por último, en el medio de celobiosa se identificaron 4 cepas, una cepa de *Bacillus sp* y 3 cepas *Lysinibacillus fusiformis*, dichas bacterias no han sido reportadas en la literatura que hayan sido aisladas en un medio que contenga como fuente de carbono a la celobiosa y que puedan usar dicho azúcar como fuente de carbono. La fuente de carbono que se ha reportado que es de fácil asimilación para estas cepas es la glucosa (Mahendran *et al.*, 2013). Por otra parte, los microorganismos aislados en el medio que contenía celobiosa pueden ser utilizados en la industria como productores de metabolitos de interés para la salud.

De acuerdo con uno de los objetivos del presente trabajo, el cual era el aislamiento de *A. muciniphila*, *F. prausnitzii* y *O. formigenes*, mediante medios de cultivos específicos para estas especies bacterianas y su cuantificación por técnicas moleculares; el primer objetivo no se cumplió. Esto puede deberse a múltiples factores, los cuales no estuvieron contemplados en un inicio, uno de ellos es el líquido ruminal y se debe de tener en cuenta para futuras investigaciones, pues es

un componente del medio de cultivo que aporta los AGCC que son indispensables para el crecimiento de los microorganismos, ya que el usado venia de animales alimentados con maíz el cual aporta grandes cantidades de almidón, carbohidrato utilizado como fuente de energía por las bacterias identificadas en el presente trabajo. Pues se ha tenido reportes que indican que de acuerdo con el tipo de alimentación de los animales es la calidad que se obtiene del líquido ruminal (Mould *et al.*, 1983).

La morfología observada fue similar a la que se reporta en la literatura, aunque esto no confirmó que estos microorganismos fueran los esperados ya que esto se confirmó con la identificación molecular que dio resultados diferentes. Por lo que se procedió a realizar el crecimiento de una cepa de *E. coli* O157 en los diferentes medios, lo que resalta en este procedimiento fue que *E. coli* creció en los medios que contenía oxalato y mucina y al realizar un Gram a las colonias que crecieron en cada medio se pudo observar que las células de esta cepa cambiaban su morfología dependiendo el tipo de medio en el que se encuentren; en el medio que contenía celobiosa las células fueron Gram negativas, bacilos largos de 2 μm hasta 14 μm , no móviles ni formadoras de esporas, por otro lado, en el medio que contenía oxalato las células fueron Gram negativas y con forma de bacilos curvos, por último, en el medio que contenía mucina las células fueron Gram negativas y se agrupaban en forma de diplococos. Debido a esto, se realizó un estudio del crecimiento en distintos medios de cultivo (Tabla 5) en donde la principal modificación consistió en los nutrientes utilizados.

La cepa control creció en todos los medios tanto no modificados como modificados. En la Tabla 5 también se puede observar que en los medios donde únicamente había mucina y oxalato crecieron de igual manera que en el medio no modificado de cada fuente de carbono respectiva. Por otro lado, se puede observar que las bacterias aisladas en el medio oxalato y celobiosa efectivamente pueden utilizar estas fuentes de carbono para su crecimiento, ya que no crecen en los demás medios modificados.

Tabla 5. Crecimiento de las cepas aisladas en diferentes medios de cultivo.

Bacteria	MOS	MON	MOE	MOR	MCS	MCN	MCE	MCR	MCV	MMN	MMS	MMR
<i>C. E. coli</i> O157	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> cepa MMCD1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> cepa MMCS2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter sp</i> cepa MMCO3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cronobacter sakazakii</i> cepa MOXO3	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>Escherichia coli</i> cepa MOXS2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Erwinia persicina</i> cepa MOXD1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLD1				+	+	+						
<i>Bacillus oleronius</i> cepa MCLD2		+	+	+	+	+	+	+	+			
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO1			+	+	+	+	+	+	+			
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO2			+	+	+	+	+	+	+			

MOS: Medio oxalato solo, **MON:** Medio oxalato normal, **MOE:** Medio oxalato + extracto de levadura, **MOR:** Medio oxalato + rumen, **MCS:** Medio celobiosa solo, **MCN:** Medio celobiosa normal, **MCE:** Medio celobiosa + extracto de levadura, **MCR:** Medio celobiosa + rumen, **MCV:** Medio celobiosa + vitaminas, **MMN:** Medio mucina normal, **MMS:** Medio mucina solo, **MMR:** Medio mucina + rumen (+ creció)

8.4. Patrón de fermentación de carbohidratos

Debido a que se observó que las cepas aisladas, en el medio que contenía celobiosa no crecieron en los medios de mucina y oxalato, se decidió hacer una fermentación con diferentes azúcares para ver la capacidad de las cepas de utilizar dichos carbohidratos. Los azúcares que se utilizaron fueron glucosa, almidón, inulina, galactosa, celobiosa, pectina, ramnosa y maltosa. En la Figura 6 se muestra la fermentación de los azúcares. Como se puede observar la cepa *Lysinibacillus fusiformis* (cepa MCLD1) y la cepa *Bacillus oleronius* (cepa MCLD2) aumenta su población de manera similar en los azúcares inulina, galactosa, pectina y celobiosa; y no necesitan tiempo de adaptación mientras que los demás si lo requiere. Por otro lado, *Lysinibacillus fusiformis* cepa MCLO1 y *Lysinibacillus fusiformis* cepa MCLO2 no requieren de adaptación al inicio de la fermentación de los azúcares pues podrían estar adaptados para utilizar de manera indiscriminada los carbohidratos utilizados. También se puede observar que a las 12 horas de la fermentación las cuatro cepas llegan a la fase estacionaria, debido a que entre las cepas no se encontraron diferencias significativas en el uso de carbohidratos a pesar de que en ciertos carbohidratos tuvieron que adaptarse para iniciar el crecimiento exponencial.

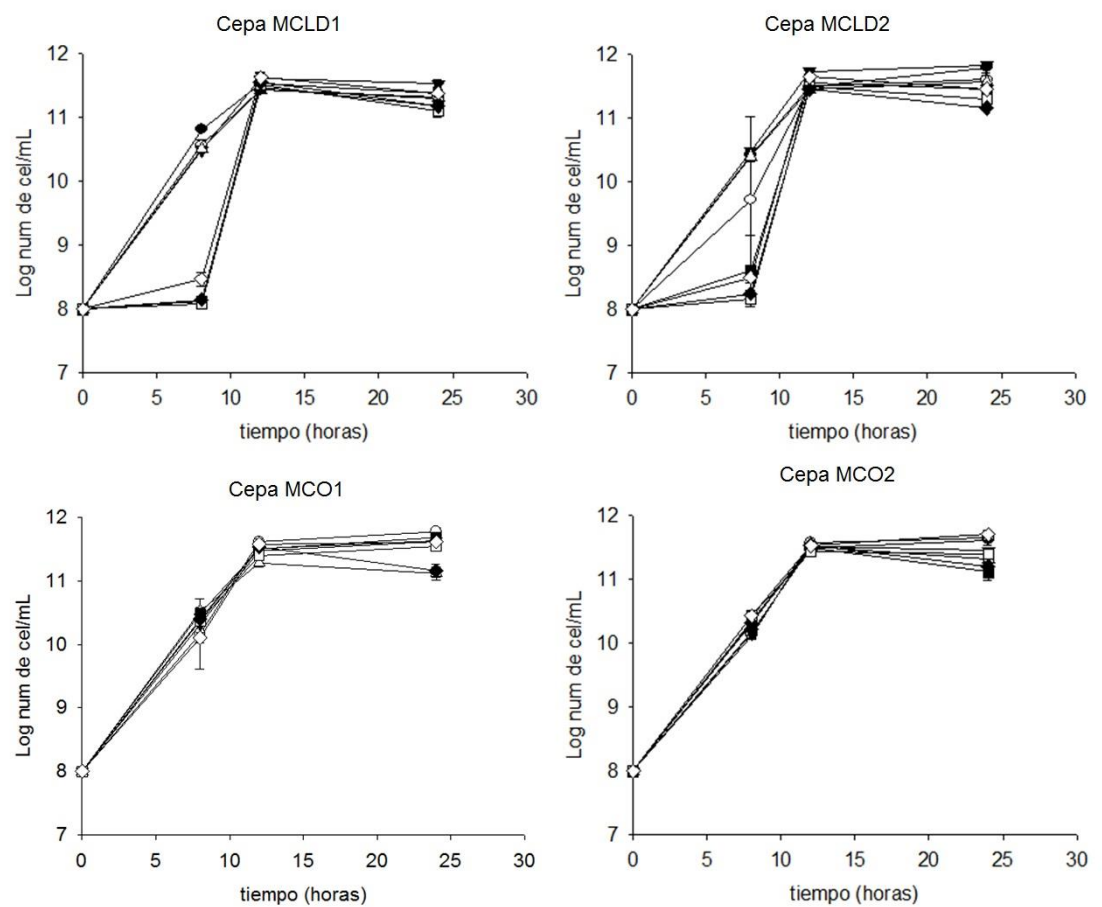


Figura 6. Crecimiento en los diferentes carbohidratos; A) *Lysinibacillus fusiformis* cepa MCLD1, B) *Lysinibacillus fusiformis* cepa MCLD2, C) *Lysinibacillus fusiformis* cepa MCO1 y D) *Lysinibacillus fusiformis* cepa MCO2. Legend: galactosa, ∇ celobiosa, $\triangle$ pectina, $\blacksquare$ ramnosa, $\square$ maltosa, $\blacklozenge$ glucosa y $\diamond$ almidón.

En cuanto a las diferencias en el uso de los diversos carbohidratos evaluados en una misma cepa, la Figura 7 muestra que para la cepa *B. oleronius* (cepa MCLD1) no hay diferencias significativas en cuanto al consumo de glucosa, pero si en inulina ($P < 0.0001$) con respecto a los demás azúcares, esto puede deberse a que la glucosa es el azúcar más simple que existe, mientras que la inulina es un azúcar complejo. Por otro lado, en el consumo de carbohidratos por parte de *L. fusiformis* (cepa MCLD2) se muestra que si hay diferencias entre el consumo de la mayoría de los carbohidratos ($P = 0.0003$); sin embargo, vemos que el crecimiento no es significativo en pectina y almidón (Figura 8). Por el contrario, *L. fusiformis* cepa MCLO1 no mostró diferencia significativa en cuanto al consumo de los diferentes carbohidratos (Figura 9), pero si se ve una diferencia mínima en el consumo de glucosa con respecto a ramnosa y maltosa ($P = 0.0303$). Por último, *L. fusiformis* cepa MCLO2 una diferencia significativa ($P < 0.0001$) en el consumo de inulina con respecto a los demás carbohidratos a excepción de glucosa y también galactosa (Figura 10). Como se pudo observar las tres cepas de *L. fusiformis* son capaces de degradar los carbohidratos utilizados, a diferencia de lo que se encuentra reportado en la literatura que sugiere el uso de carbohidratos como la glucosa, pero no de celobiosa (Wang *et al.*, 2010). Por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo son de relevancia, pues se identificaron tres cepas capaces de la degradación de dichos carbohidratos mismos que se encuentran ampliamente en la fibra dietética no digerible y que proviene de los alimentos (Álvarez y Sánchez, 2006). Por otro lado, se tienen registro del uso de esta bacteria como herramienta de biocontrol en el crecimiento de algunas plantas (Lyngwi y Joshi, 2014).

Como se puede ver a pesar de que se aislaron 3 cepas de la misma especie en un mismo carbohidrato (celobiosa) con este proceso de fermentación se pudo observar que se tratan de 3 cepas que se comportan de manera diferente, ya que todas las cepas consumen los diferentes carbohidratos evaluados, pero no lo hacen de la misma manera. Por otro lado, se puede ver que hay cepas que hace una diferencia en el consumo de carbohidratos complejos como inulina y pectina, los cuales son carbohidratos que el humano no puede digerir, pero las bacterias aisladas si, y de esta forma el huésped puede obtener metabolitos secundarios que podría utilizar.

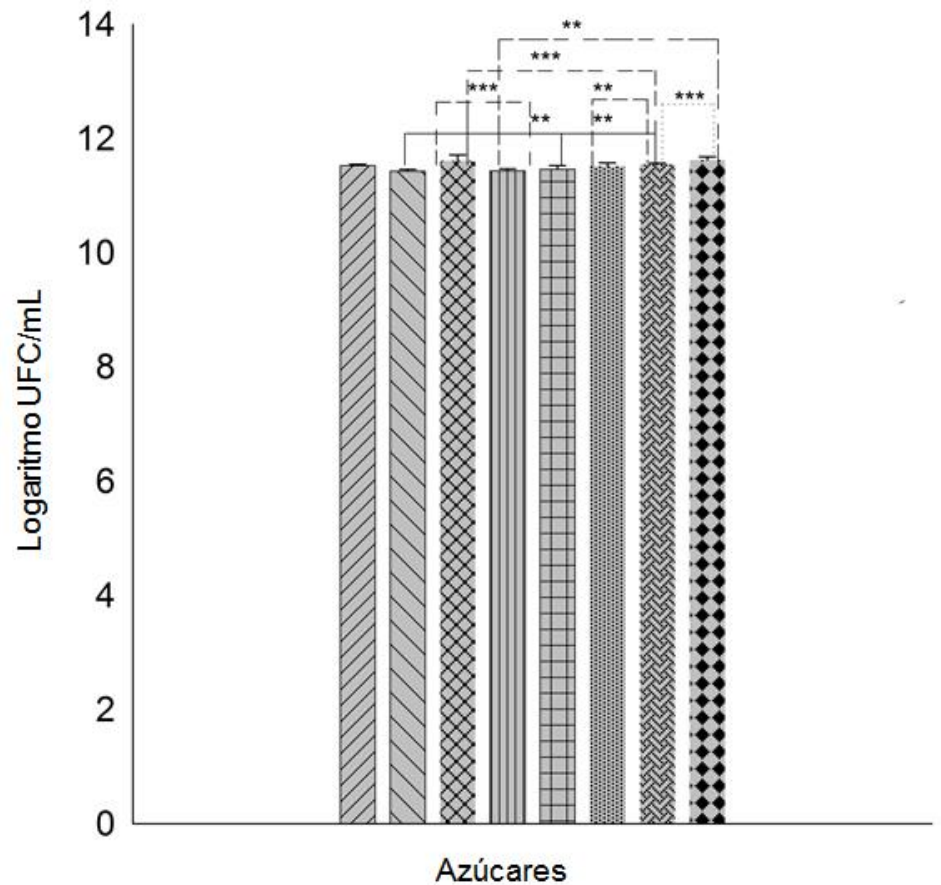


Figura 7. Crecimiento a las 12 horas de *Bacillus oleronius* MCLD1. Donde  glucosa,  galactosa,  pectina,  ramnosa,  maltosa,  inulina y almidón (un asterisco representa $p \leq 0.05$, el doble asterisco representa $p \leq 0.01$ y el triple asterisco representa $p \leq 0.001$).

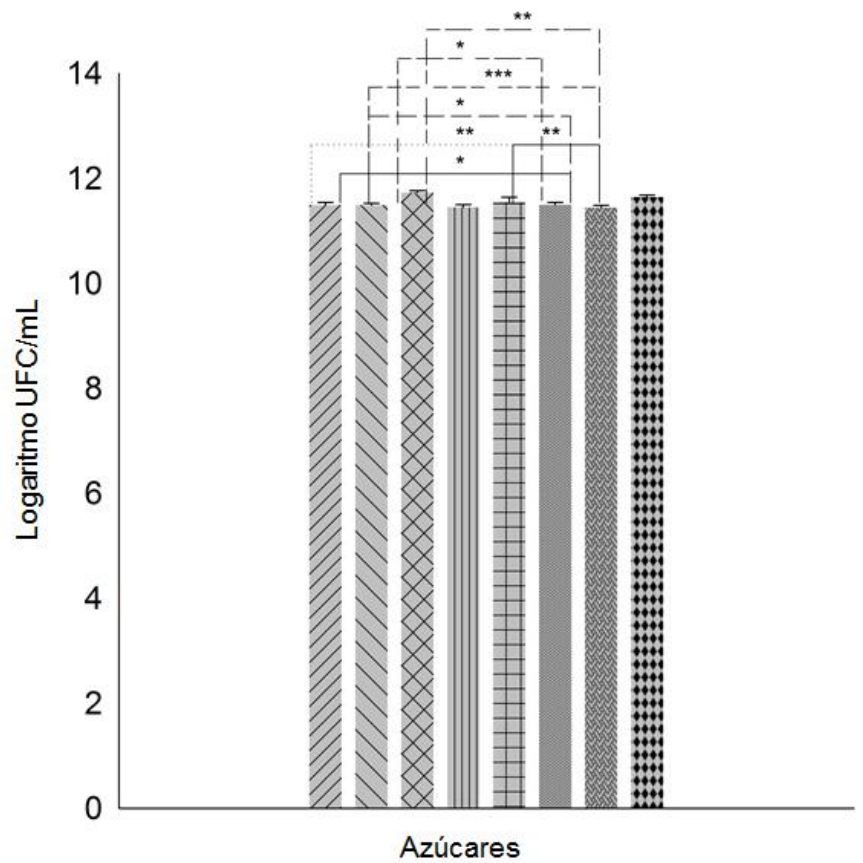


Figura 8. Crecimiento a las 12 horas de *Lysinibacillus fusiformis* MCLD2. Donde  glucosa,  celobiosa,  pectina,  ramnosa,  maltosa,  inulina y almidón (un asterisco representa $p \leq 0.01$ y el triple asterisco representa $p \leq 0.001$).

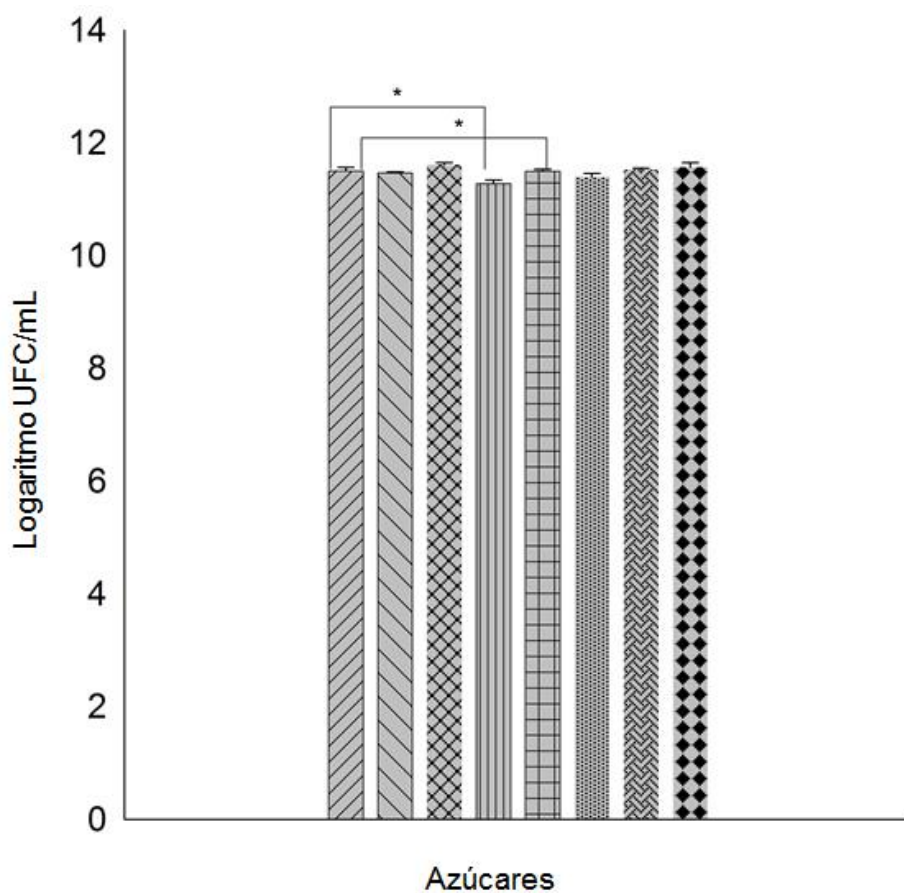


Figura 9. Crecimiento a las 12 horas de *Lysinibacillus fusiformis* MCLO1. Donde  glucosa,  celobiosa,  pectina,  ramnosa,  maltosa,  inulina y almidón (un asterisco representa p ≤ 0.01 y el triple asterisco representa p ≤ 0.001).

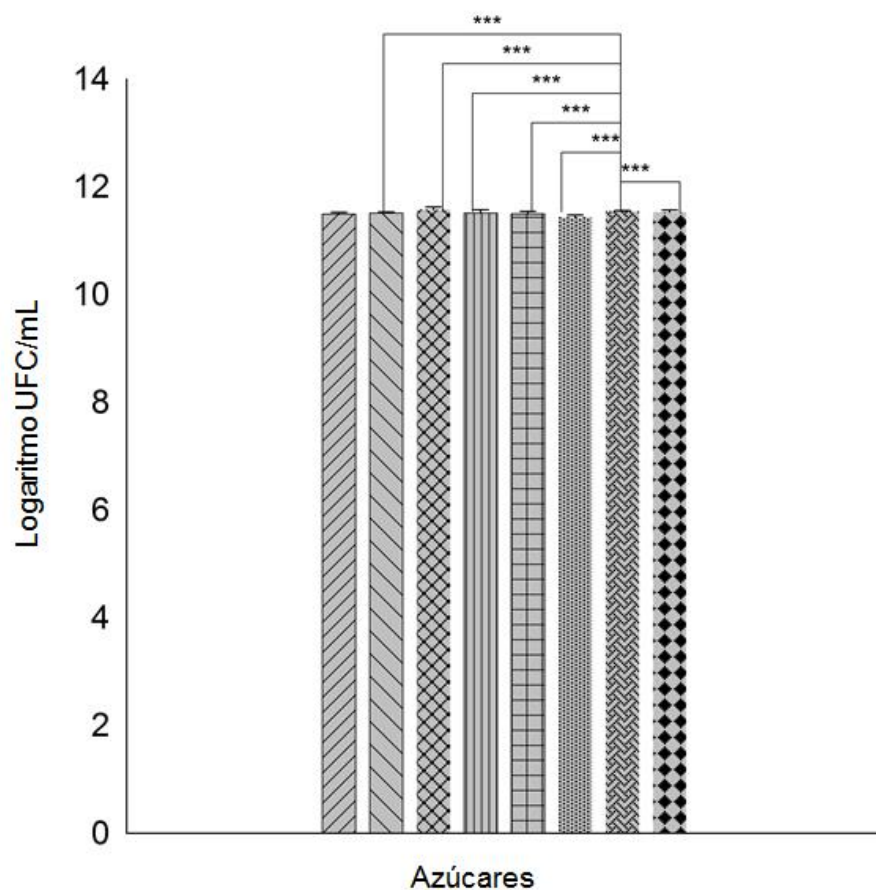


Figura 10. Crecimiento a las 12 horas de *Lysinibacillus fusiformis* MCLO2. Donde  glucosa,  celobiosa,  pectina,  ramnosa,  maltosa,  inulina y  almidón (un asterisco representa $p \leq 0.01$ y el triple asterisco representa $p \leq 0.001$).

8.5. Actividad hemolítica

Se evaluó la actividad hemolítica de las cepas aisladas en los diferentes medios de cultivo. En la Tabla 6 se muestra que las 10 cepas aisladas en el presente trabajo no presentaron actividad hemolítica. La ausencia de actividad hemolítica es una forma de demostrar que las cepas no son tóxicas. El que los microorganismos con potencial probiótico presenten nula actividad hemolítica es particularmente importante, ya que se ha demostrado que está asociada a bacterias patógenas principalmente, y que a través de esta actividad se favorecen los mecanismos de virulencia y toxicidad. Lo cual depende de factores como el estado de salud del individuo y por tanto de su sistema inmune (González Vázquez, 2014). Si bien estos resultados nos indican que de manera *in vitro* las cepas no son hemolíticas esta característica se debe consolidar con estudios *in vivo* y estudios moleculares que descarten la presencia de genes que produzcan toxicidad.

Tabla 6. Actividad hemolítica de las cepas identificadas.

Bacteria	Resultado
Control <i>Escherichia coli</i>	+
Control <i>Salmonella thypi</i>	+
<i>Escherichia coli</i> cepa MMCD1	-
<i>Escherichia coli</i> cepa MMCS2	-
<i>Enterobacter sp</i> cepa MMCO3	-
<i>Cronobacter sakazakii</i> cepa MOXO3	-
<i>Escherichia coli</i> cepa MOXS2	-
<i>Erwinia persicina</i> cepa MOXD1	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLD1	-
<i>Bacillus oleronius</i> cepa MCLD2	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO1	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO2	-

Donde + indica actividad hemolítica positiva y – actividad hemolítica negativa.

8.6. Actividad antimicrobiana

Las cepas aisladas en los diferentes medios de cultivo no muestran actividad antimicrobiana sobre los microorganismos patógenos evaluados; sin embargo, podrían tener actividad sobre otros microorganismos. *E. persicina* han demostrado tener actividad antifúngica (Goryluk-Salmonowicz, *et al.*, 2016), *L. fusiformis* tiene actividad antifúngica (Sgroy *et al.*, 2009) por ello para futuras investigaciones se deberán hacer evaluaciones antimicrobianas de las cepas utilizando otros patógenos además de evaluar la actividad contra hongos y levaduras para tener una mayor evidencia de la actividad antimicrobiana, ya que se ha reportado que. Sin embargo, en el presente trabajo no se realizó la actividad antifúngica.

8.7. Resistencia a antibióticos

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la evaluación de la resistencia a antibióticos, usando como control una cepa de *E. coli* O157. Se observa que las cepas aisladas son susceptibles a la mayoría de los antibióticos utilizados, ya que una cepa de *E. coli* solo es resistente a cloranfenicol, mientras que otra cepa de *E. coli* mostró resistencia a amikacina y carbenicilina, antibióticos de la familia de aminoglucósidos y penicilinas sintéticas respectivamente, al igual que la cepa de *E. persicina*. Por otro lado, la cepa de *C. sakazakii* es susceptible a todos los antibióticos utilizados; sin embargo, se deben realizar más estudios que verifiquen los resultados obtenidos, ya que se han reportado cepas de *C. sakazakii* patógenas y resistentes a antibióticos (Healy *et al.*, 2010; Iversen y Forsythe, 2003), para así comprobar la seguridad de *C. sakazakii*. Por último, las cepas de *L. fusiformis* y *Bacillus sp* son susceptibles a todos los antibióticos utilizados.

Tabla 7. Evaluación de la resistencia a antibióticos.

Bacteria	AK	AM	CB	CF	CFX	CPF	CL	GE	NET	NF	NOF	STX
Control <i>E. coli</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i> cepa MMCD1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> cepa MMCS2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp cepa MMCO3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cronobacter sakazakii</i> cepa MOXO3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> cepa MOXS2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia persicina</i> cepa MOXD1	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLD1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus oleronius</i> cepa MCLD2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

AK: amikacina **AM:** ampicilina, **CB:** carbenicilina, **CF:** cefalotina, **CFX:** cefotaxima,

CPF: coprofloxacin, **CL:** cloranfenicol, **GE:** gentamicina, **NET:** netilmicina, **NF:**

nitrofurantoína, **NOF:** norfloxacin, **SXT:** trimetropin-sulfametoxazol (+ resistencia

total; - inhibición de crecimiento)

8.8. Evaluación *in vitro* de la tolerancia al estrés gastrointestinal

Uno de los puntos que se necesita demostrar en las bacterias que pudieran tener propiedades probióticas es la tolerancia al estrés gastrointestinal. Las bacterias probióticas necesitan llegar al colon viables para poder realizar el efecto benéfico. Por ello se realizó la evaluación *in vitro* de la tolerancia al estrés gastrointestinal.

Las condiciones que se evaluaron para simular el estrés gastrointestinal fueron saliva, jugo gástrico y fluido intestinal que contenía sales biliares. Se inició con un inóculo de 1×10^8 UFC/mL. El tiempo total al que estuvieron expuestas las bacterias fue de 245 minutos que representa el tiempo aproximado en el que se lleva a cabo el proceso digestivo en el ser humano (Minekus *et al.*, 2014).

Para las cepas aisladas en el medio de celobiosa, se observa (Figura 11A), que la cepa *Lysinibacillus fusiformis* MCLD2 después de los 245 minutos presenta un porcentaje de sobrevivencia relativa arriba del 90%, el cual es similar al porcentaje de la cepa *L. casei* utilizada como control, mientras que *Lysinibacillus fusiformis* cepa MCLO1 termina el estrés con un porcentaje de sobrevivencia por arriba de 70%. En cambio, la cepa *Lysinibacillus fusiformis* MCLO2 al finalizar el proceso de estrés no sobrevive. Como se mencionó, se aislaron tres cepas del mismo género; sin embargo, se puede ver mediante la evaluación al estrés gastrointestinal que pueden ser diferentes entre sí, ya que todas se comportan de manera diferente cuando se someten al estrés en sales biliares; la cepa MCLO2 es sensible a las sales biliares mientras que la cepa MCLD2 es resistente. En cuanto a la cepa

Bacillus oleronius MCLD1, esta muestra una sobrevivencia relativa del 90% al finalizar el proceso de estrés (Figura 11B).

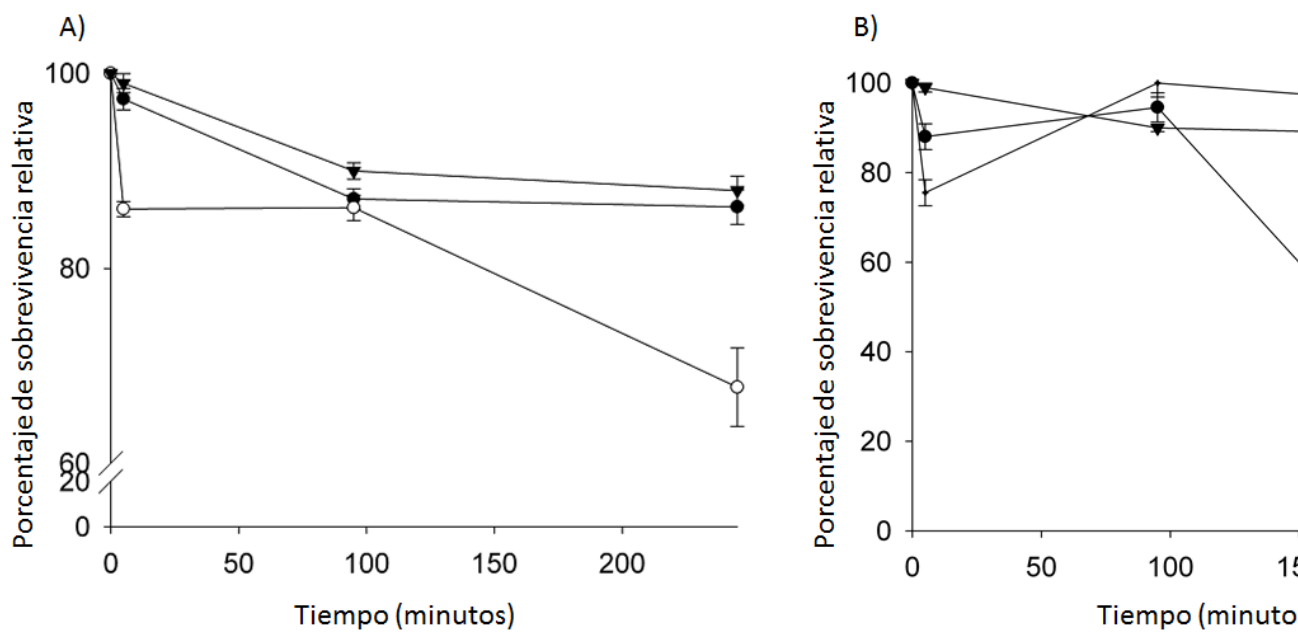


Figura 11. Sobrevivencia al estrés gastrointestinal de las cepas aisladas a partir del medio que co
fuente de carbono. Donde A) ▼ control (*L. casei* sp), ● *L. fusiformis* cepa MCLD2, y ○
MCLD1, B) ▼ control (*L. casei* sp), ● *B. oleronius* cepa MCLD1, y ○ *L. fusiformis*

Por otro lado, en la Figura 12A se muestran la sobrevivencia relativa de las cepas aisladas en el medio de mucina. Las 3 cepas aisladas en dicho medio mostraron un porcentaje de sobrevivencia relativa por arriba del 80 %. Inclusive 2 cepas sobreviven en un porcentaje mayor que el control a pesar de que ambas fueron identificadas como *E. coli*, sin embargo, la cepa MMCD1 mostró el 100% de sobrevivencia lo que podría indicar que, esta podría llegar viable al colon. En cuanto a la cepa *Enterobacter sp* MMCO3, esta mostró un porcentaje de sobrevivencia relativa por debajo del control. Como se observa, las tres cepas se comportan de manera diferente a lo largo de la evaluación. En la Figura 12B se muestra las cepas aisladas en el medio de oxalato, las cuales presentan un porcentaje de sobrevivencia relativa mayor al 90%. Con respecto al control, se observa que las cepas *Cronobacter sakazakii* MOXO3 y *E. coli* MOXS2 toleran mejor el estrés a las sales biliares presentando un porcentaje de sobrevivencia de 97%, a diferencia de la cepa *Erwinia persicina* cepa MOXD1, la cual tiene mayor sensibilidad a las sales biliares.

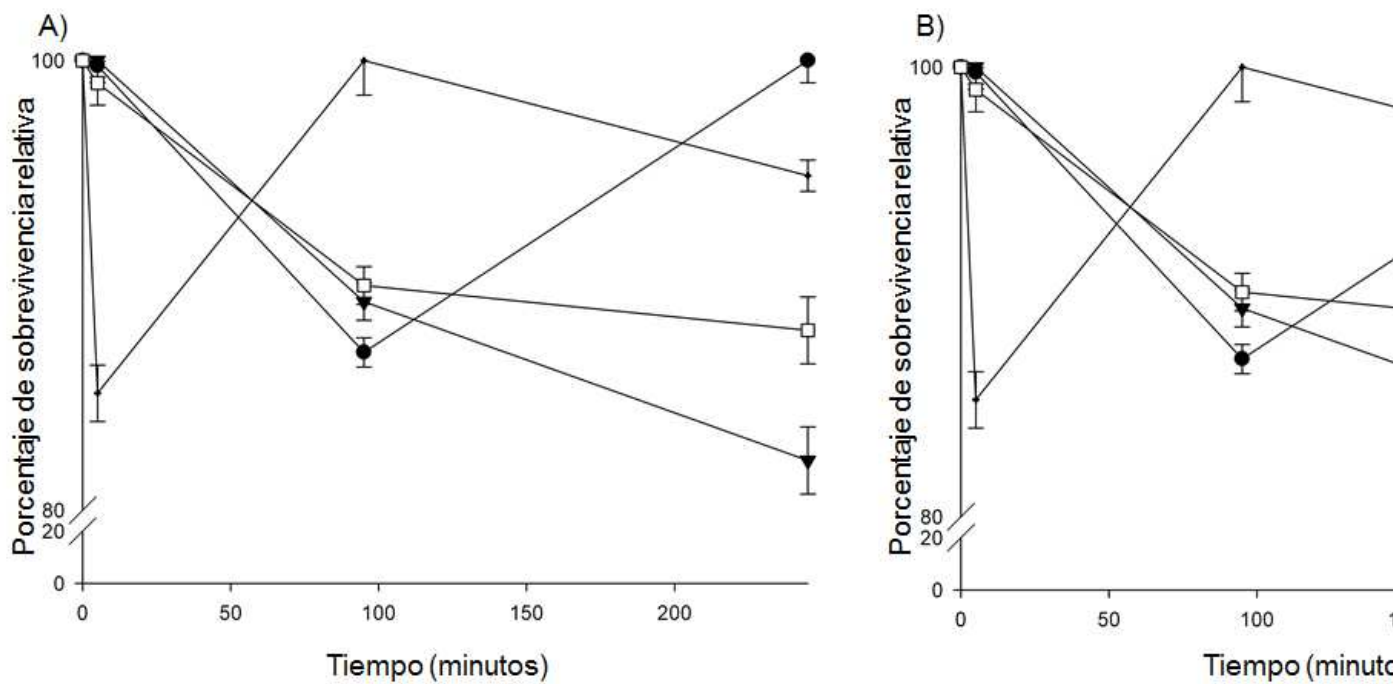


Figura 12. Supervivencia ante el estrés gastrointestinal simulado A) cepas aisladas del medio que contenía fuente de carbono. Donde —□— control (*L. casei* sp), —●— *E. coli* cepa MMCD1, —○— *E. coli* cepa MMCO3, B) cepas aisladas del medio que contenía oxalato como fuente de carbono —□— control (*L. casei* sp), —●— *C. sakazakii* cepa MOXO3, —○— *E. coli* cepa MOXS2, —▼— *E. persicina* cepa MOXP1.

Hasta el momento no se ha reportado información previa sobre la caracterización de las cepas aisladas en el presente trabajo. Sin embargo, se obtuvieron 10 cepas de las cuales nueve resisten el estrés a las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, seguramente debido a que este es el medio de aislamiento.

8.9. Catalasa y oxidasa

Para las pruebas de catalasa y oxidasa se utilizaron como controles una cepa de *E. coli* y *L. casei* sp, las cuales son oxidasa y catalasa negativa respectivamente. Las cepas aisladas del medio de mucina dieron como resultado catalasa y oxidasa negativa, al igual que las cepas aisladas del medio de oxalato. Mientras que las cepas aisladas del medio de celobiosa dieron como resultados catalasa negativa y oxidasa positiva, como se muestra en la Tabla 8. También, se puede observar que la cepa de *E. coli* identificada es catalasa negativa a diferencia del control. Se han reportado cepas de *E. coli* catalasa negativa aisladas de muestras biológicas (Funada *et al.*, 1978). Por otro lado, *L. fusiformis* aislada es oxidasa positiva, lo que concuerda con lo reportado en la literatura (Ahmed *et al.*, 2007).

Tabla 8. Prueba de catalasa y oxidasa.

Bacteria	catalasa	Oxidasa
Control <i>Escherichia coli</i>	+	-
Control <i>Lactobacillus casei</i> sp	-	-
<i>Escherichia coli</i> cepa MMCD1	-	-
<i>Escherichia coli</i> cepa MMCS2	-	-
<i>Enterobacter</i> sp cepa MMCO3	-	-
<i>Cronobacter sakazakii</i> cepa MOXO3	-	-
<i>Escherichia coli</i> cepa MOXS2	-	-
<i>Erwinia persicina</i> cepa MOXD1	-	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLD1	-	+
<i>Bacillus oleronius</i> cepa MCLD2	-	+
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO1	-	+
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> cepa MCLO2	-	+

Donde + resultado positivo y – resultado negativo.

9. Conclusiones

En el presente trabajo se logró la cuantificación molecular de las bacterias seleccionadas como posibles probióticos y se observó que en la concentración existen diferencias entre cada una de estas bacterias con la ingesta de alimentos y el IMC. Lo anterior puede deberse a la condición de peso de cada grupo de estudio, pues la concentración de *A. muciniphila* es alta en población con obesidad. Por otro lado, el grupo delgado tiende a consumir mayormente grasa y la concentración de *F. prausnitzii* tiende a ser menor, por lo que en investigaciones posteriores se debe realizar un análisis para ver si existe una correlación de estas bacterias con algún lípido específico. Por otra parte, para *Oxalobacter* no se encontraron resultados en su cuantificación, esto puede deberse a que las condiciones que se utilizaron no fueron las correctas o que en la población de estudio esta bacteria se encuentre en mínimas concentraciones o que no se encuentre dentro de la microbiota intestinal de la población.

Además, se aislaron 10 cepas entre las que se encontraron subespecies de *Escherichia coli*, *Cronobacter sakazakii*, *Erwinia persicina*, *Lysinibacillus fusiformis* y *Bacillus oleronius*, mismas que fueron aisladas utilizando tres medios diferentes, que contenían mucina, celobiosa u oxalato. Nueve de las cepas aisladas son capaces de resistir el estrés simulado que se encuentra en el intestino delgado el cual es el sitio de acción de algunos probióticos.

Las cepas aisladas del medio de mucina y de oxalato, podrían ser consideradas en el futuro como bacterias a estudiar con potencial probiótico y

demostrar que tienen un efecto benéfico a la salud, pues dieron como resultado *in vitro* que no presentan toxicidad y que resisten el estrés del tracto gastrointestinal y por otra parte pueden utilizar fibras complejas similares a las que se encuentran en la fibra dietética y que otros microorganismos probióticos utilizan para la producción de AGCC. Sin embargo, se debe realizar más pruebas *in vitro* que ayuden a la confirmación de la seguridad de estas cepas. Por otra parte, no se lograron aislar los microorganismos que se tenían como objetivo principal; esto podría deberse al tipo de población, o al tipo de líquido ruminal que se utilizó como fuente de AGCC o a las condiciones ambientales, o una atmosfera anaeróbica inadecuada.

10. Perspectivas

En el presente trabajo se lograron aislar bacterias, las cuales no tienen reporte del aislamiento en los medios de cultivo utilizados. Por otro lado, se obtuvieron cepas de *E. coli*, las cuales no mostraron actividad hemolítica. A partir de estos resultados se necesita realizar estudios *in vivo* para demostrar la seguridad de las cepas aisladas y sobre todo ver el beneficio que estos microorganismos tengan en la salud. Además, a la par de dichos estudios se deben de realizar investigaciones para descartar genes de toxicidad y virulencia.

11. Referencias

- Abratt, V. R., Reid, S. J. (2010). Oxalate-degrading bacteria of the human gut as probiotics in the management of kidney stone disease. *Advances in Applied Microbiology*, 72, 63-87.
- Abriouel, H., Herrmann, A., Stärke, J., Yousif, N. M. K., Wijaya, A., Tauscher, B., Franz, C. M. A. P. (2004). Cloning and heterologous expression of hematin-dependent catalase produced by *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1228. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 603-606. <http://10.1128/AEM.70.1.603-606.2004>.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., & Fujiwara, T. (2007). Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), 1117-1125.
- Allison, M. J., Cook, H. M. (1981). Oxalate degradation by microbes of the large bowel of herbivores: the effect of dietary oxalate. *Science*, 212(4495), 675-676. <http://10.1126/science.7221555>.
- Allison, M. J., Dawson, K. A., Mayberry, W. R., Foss, J. G. (1985). *Oxalobacter formigenes* gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. *Archives of Microbiology*, 141(1), 1-7. <http://10.1007/BF00446731>.

- Allison, M. J., Littledike, E. T., James, L. F. (1977). Changes in ruminal oxalate degradation rates associated with adaptation to oxalate ingestion. *Journal of Animal Science*, 45(5), 1173-1179. <http://10.2527/jas1977.4551173x>.
- Álvarez, E. E, Sánchez, P. G. La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, 2006, vol. 21.
- Andoh, A., Fujiyama, Y., Hata, K., Araki, Y., Takaya, H., Shimada, M., Bamba, T. (1999). Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 118(1), 23-29. <http://10.1046/j.1365-2249.1999.01038.x>.
- Andoh, A., Nishida, A., Takahashi, K., Inatomi, O., Imaeda, H., Bamba, S., Kobayashi, T. (2016). Comparison of the gut microbial community between obese and lean peoples using 16S gene sequencing in a Japanese population. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 59(1), 65-70. <http://doi:10.3164/jcbrn.15-152>.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Honda, K. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature*, 500(7461), 232-236. <http://doi:10.1038/nature12331>.
- Bisgaard, H., Li, N., Bonnelykke, K., Chawes, B. L., Skov, T., Paludan-Müller, G., Krogfelt, K. A. (2011). Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, 128(3), 646-652
<http://doi:10.1016/j.jaci.2011.04.060>.

Brahe, L. K., Astrup, A., Larsen, L. H. (2016). Can we prevent obesity-related metabolic diseases by dietary modulation of the gut microbiota?. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 7(1), 90-101.

Candela, M., Rampelli, S., Turrone, S., Severgnini, M., Consolandi, C., De Bellis, G., Brigidi, P. (2012). Unbalance of intestinal microbiota in atopic children. *BMC Microbiology*, 12(1), 95. <http://doi:10.1186/1471-2180-12-95>.

Castillo, I., Solano, S., Sepúlveda, A.R. (2016). Programa de prevención de alteraciones alimentarias y obesidad en estudiantes universitarios mexicanos. *Psicología Conductual*, 24(1), 5.

Catuogno, M., Montenegro, M., Ramírez, G., Sánchez Negrette, M. (2013). Efectos del ácido butírico sobre la carcinogénesis experimental de colon inducida por 1, 2-dimetilhidrazina en ratas. *Revista Veterinaria*, 24(1), 32-38.

Daniel, S. L., Hartman, P. A., Allison, M. J. (1987). Microbial degradation of oxalate in the gastrointestinal tracts of rats. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(8), 1793-1797. http://thekeep.eiu.edu/bio_fac/136.

Dao, M. C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E. O., Clement, K. (2016). *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut

- microbiome richness and ecology. *Gut*, 65(3), 426-436.
<http://doi:10.1136/gutjnl-2014-308778>.
- Derrien, M., Belzer, C., de Vos, W. M. (2016). *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microbial Pathogenesis*. 106, 171-181.
<http://doi:10.1016/j.micpath.2016.02.005>.
- Derrien, M., Van Baarlen, P., Hooiveld, G., Norin, E., Muller, M., de Vos, W. M. (2011). Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, 2, 166. <http://doi:10.3389/fmicb.2011.00166>.
- Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., de Vos, W. M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 5), 1469-1476. <http://doi:10.1099/ijs.0.02873-0>.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L., Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6(11), e280.
<http://doi:10.1371/journal.pbio.0060280>.
- Di Cerbo, A., Palmieri, B. (2015). Review: The market of probiotics. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(6), 2199-2206.
- Didari, T., Mozaffari, S., Nikfar, S., Abdollahi, M. (2015). Effectiveness of probiotics in irritable bowel syndrome: Updated systematic review with meta-analysis.

World Journal of Gastroenterology, 21(10), 3072-3084.
<http://doi:10.3748/wjg.v21.i10.3072>.

Duncan, S. H., Hold, G. L., Harmsen, H. J., Stewart, C. S., Flint, H. J. (2002). Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52(Pt 6), 2141-2146. <http://doi:10.1099/00207713-52-6-2141>.

Ellis, M.L., Dowell, A.E., Li, X., Knight, J. (2016). Probiotic properties of *Oxalobacter formigenes*: an in vitro examination. Archives of Microbiology, 198(10), 1019-1026. <http://doi:10.1007/s00203-016-1272-y>.

Ellis, M. E., Mobley, J.A., Holmes, R.P., Knight, J. (2016). Proteome dynamics of the specialist oxalate degrader *oxalobacter formigenes*. Journal of Proteomics amp; Bioinformatics, 9(1), 19-24. <http://doi:10.4172/jpb.1000384>.

Espitia, P. J. P., Batista, R. A., Azeredo, H. M. C., Otoni, C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. Food Research International, 90, 42-52.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.026>.

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(22), 9066-9071.
<http://doi:10.1073/pnas.1219451110>.

- FAO/OMS, C. d. E. (2001). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Consultado en <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>.
- Feng, J., Tang, H., Li, M., Pang, X., Wang, L., Zhang, M., Shen, J. (2014). The abundance of fecal *Faecalibacterium prausnitzii* in relation to obesity and gender in Chinese adults. *Archives of Microbiology*, 196(1), 73-77. <http://10.1007/s00203-013-0942-2>.
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., Louis, P. (2015). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society* 74: pp. 13-22. England.
- Foditsch, C., Santos, T. M. A., Teixeira, A. G. V., Pereira, R. V. V., Dias, J. M., Gaeta, N., Bicalho, R. C. (2015). Isolation and characterization of *Faecalibacterium prausnitzii* from calves and piglets. *PLoS One*, 9(12), e116465. <http://doi:10.1371/journal.pone.0116465>.
- Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109 Suppl 2, S35-50. <http://doi:10.1017/s0007114512004011>.
- Fooks, L. J., Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88 Suppl 1, S39-49. <http://doi:10.1079/bjn2002628>.

- Fujimoto, T., Imaeda, H., Takahashi, K., Kasumi, E., Bamba, S., Fujiyama, Y., Andoh, A. (2013). Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28(4), 613-619. <http://doi:10.1111/jgh.12073>.
- Funada, H. I. S. A. S. H. I., Hattori, K. I., & Kosakai, N. O. Z. O. M. U. (1978). Catalase-negative *Escherichia coli* isolated from blood. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(5), 474-478.
- Fung, T. C., Olson, C. A., Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*. 20(2), 145-155. . <http://doi:10.1038/nn.4476>.
- Galan, M., Razzauti, M., Bard, E., Bernard, M., Brouat, C., Charbonnel, N., Tamisier, L. (2016). 16S rRNA amplicon sequencing for epidemiological surveys of bacteria in wildlife: the importance of cleaning post-sequencing data before estimating positivity, prevalence and co-infection. *BioRxiv*, 1 (4), e00032-16. <http://10.1128/mSystems.00032-16>.
- Ganguly, N. K., Bhattacharya, S. K., Sesikera, B., Nair, G. B., Ramakrishna, B. S., Sachdev, H. P. S., Hemalatha, R. (2011). ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. *The Indian Journal of Medical Research*, 134(1), 22-25.
- Gauffin Cano, P., Santacruz, A., Moya, A., Sanz, Y. (2012). *Bacteroides uniformis* CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity. *PLoS One*, 7(7), e41079. . <http://doi:10.1371/journal.pone.0041079>

- Gebhart, D., Lok, S., Clare, S., Tomas, M., Stares, M., Scholl, D., Govoni, G. R. (2015). A modified r-type bacteriocin specifically targeting *Clostridium difficile* prevents colonization of mice without affecting gut microbiota diversity. *mBio*, 6(2) . <http://doi:10.1128/mBio.02368-14>.
- Gibson, G. R., Fuller, R. (2000). Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition*, 130(2): 391S-395S.
- González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L., Reyes-Nava, L. A., Shah, N. P., Rivera-Espinoza, Y. (2015). Isolation, identification and partial characterization of a *Lactobacillus casei* strain with bile salt hydrolase activity from pulque. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(4), 242-248. <http://doi:10.1007/s12602-015-9202-x>.
- González-Vázquez, R. (2014). Estudio de la actividad sal biliar hidrolasa presente en bacterias ácido lácticas. (Tesis doctoral). ENCB- Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Goryluk-Salmonowicz, A., Piorek, M., Rekosz-Burlaga, H., Studnicki, M., Błaszczuk, M. (2016). Endophytic detection in selected european herbal plants. *Polish Journal of Microbiology*, 65(3), 369-375. <http://10.5604/17331331.1215617>.
- Graessler, J., Qin, Y., Zhong, H., Zhang, J., Licinio, J., Wong, M. L., Bornstein, S. R. (2013). Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with

inflammatory and metabolic parameters. The Pharmacogenomics Journal, 13(6):514-22. [http://doi: 10.1038/tpj.2012.43](http://doi:10.1038/tpj.2012.43).

Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Valencia, C., Campanacci, V., Cambillau, C. (2003). The crystal structure of the *Escherichia coli* YfdW gene product reveals a new fold of two interlaced rings identifying a wide family of CoA transferases. The Journal of Biological Chemistry, 278(36), 34582-34586. <http://doi:10.1074/jbc.C300282200>.

Gu, Q., Li, P. (2016). Biosynthesis of Vitamins by Probiotic Bacteria, Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health, Dr. Venketeshwer Rao (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/63117. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/probiotics-and-prebiotics-in-human-nutrition-and-health/biosynthesis-of-vitamins-by-probiotic-bacteria>.

Guarino, A., Ashkenazi, S., Gendrel, D., Lo Vecchio, A., Shamir, R., Szajewska, H. (2014). European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition/european society for pediatric infectious diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in europe: update 2014. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 59(1), 132-152. <http://doi:10.1097/mpg.0000000000000375>.

Guarner, F., Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. Lancet, 361(9356), 512-519. [http://doi:10.1016/s0140-6736\(03\)12489-0](http://doi:10.1016/s0140-6736(03)12489-0).

- Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. (2007). Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 92(1), 64-66. <http://doi:10.1159/000100088>.
- Gueimonde, M., Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38 Suppl 2, S242-247. [http://doi:10.1016/s1590-8658\(07\)60003-6](http://doi:10.1016/s1590-8658(07)60003-6).
- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., Van Immerseel, F. (2010). From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 366-384. <http://doi:10.1017/s0954422410000247>.
- Guinane, C. M., Cotter, P. D. (2013). Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(4), 295-308. <http://doi:10.1177/1756283x13482996>.
- Guslandi, M. (2015). Role of probiotics in crohn's disease and in pouchitis. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 49 Suppl 1, S46-49. <http://doi:10.1097/mcg.0000000000000351>.
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1229-1235. <http://doi:10.1093/molbev/mst012>.

- Hamer, H. M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F. J., Brummer, R. J. (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 27(2), 104-119. <http://doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x>.
- Hansen, R., Russell, R. K., Reiff, C., Louis, P., McIntosh, F., Berry, S. H., Hold, G. L. (2012). Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased *Faecalibacterium prausnitzii* and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 107(12), 1913-1922. <http://doi:10.1038/ajg.2012.335>.
- Healy, B., Cooney, S., O'Brien, S., Iversen, C., Whyte, P., Nally, J., Canallan J., Fanning, S. (2010). *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): an opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(4), 339-350. <https://doi.org/10.1089/fpd.200>
- Hernández-Avila, M., Resoles, M., Parra, S., Romieu, I. (2000). Sistema de evaluación de hábitos nutricionales y consumo de nutrimentos (SNUT). México: INSP9.0379.
- Hews, C. L., Tran, S. L., Wegmann, U., Brett, B., Walsham, A. D., Kavanaugh, D., Schüller, S. (2017). The StcE metalloprotease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* reduces the inner mucus layer and promotes adherence to human colonic epithelium ex vivo. *Cellular Microbiology*. 19 :e12717. <http://10.1111/cmi.12717>.

- Holmes, R. P., Assimós, D. G. (1998). Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *The Journal of Urology*, 160(5), 1617-1624. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)62363-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(01)62363-2).
- Holzapfel, W. H., Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35(2–3), 109-116. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00171-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00171-5).
- Ishibashi, N., Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 465s-470s.
- Iversen, C., Forsythe, S. (2003). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, 14(11), 443-454. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(03\)00155-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(03)00155-9).
- Joyce, S. A., Gahan, C. G. (2014). The gut microbiota and the metabolic health of the host. *Current Opinion in Gastroenterology*, 30(2), 120-127. <http://doi:10.1097/mog.0000000000000039>.
- Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., Tsuchida, T. (2010). Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(6), 636-643. <http://doi:10.1038/ejcn.2010.19>.

- Kadooka, Y., Sato, M., Ogawa, A., Miyoshi, M., Uenishi, H., Ogawa, H., Tsuchida, T. (2013). Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 110(9), 1696-1703. <http://doi:10.1017/s0007114513001037>.
- Kailasapathy, K., Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78(1), 80-88. <http://doi:10.1046/j.1440-1711.2000.00886.x>.
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., Núñez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*, 14(7), 685-690. <http://doi:10.1038/ni.2608>.
- Kaufman, D. W., Kelly, J. P., Curhan, G. C., Anderson, T. E., Dretler, S. P., Preminger, G. M., Cave, D. R. (2008). *Oxalobacter formigenes* may reduce the risk of calcium oxalate kidney stones. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 19(6), 1197-1203. <http://doi:10.1681/ASN.2007101058>.
- Kaur, I. P., Chopra, K., Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmacology*, 15(1), 1-9.
- Knight, J., Deora, R., Assimos, D. G., Holmes, R. P. (2013). The genetic composition of *Oxalobacter formigenes* and its relationship to colonization and calcium oxalate stone disease. *Urolithiasis*, 41(3), 187-196. <http://doi:10.1007/s00240-013-0566-7>.

- Kumar, R., Mukherjee, M., Bhandari, M., Kumar, A., Sidhu, H., Mittal, R. D. (2002). Role of *Oxalobacter formigenes* in calcium oxalate stone disease: a study from north India. *European Urology*, 41(3), 318-322. [http://dx.doi.org/10.1016/S0302-2838\(02\)00040-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0302-2838(02)00040-4).
- Lauzon, H. L., Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Ringø, E., Davies, S. J. (2014). Probiotics and prebiotics—concepts, definitions and history. In *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics* (pp. 169-184). <http://10.1002/9781118897263.ch7>.
- Leffler, D. A., Lamont, J. T. (2015). *Clostridium difficile* infection. *New England Journal of Medicine*, 372(16), 1539-1548. <http://10.1056/NEJMra1403772>.
- Leuschner, R. G. K., Robinson, T. P., Hugas, M., Cocconcelli, P. S., Richard-Forget, F., Klein, G., von Wright, A. (2010). Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science Technology*, 21(9), 425-435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.003>.
- Liong, M.T. (2011). *Probiotics: biology, genetics and health aspects* (Vol. 21): Springer Science y Business Media. <http://10.1007/978-3-642-20838-6>.
- Lopez-Siles, M., Khan, T. M., Duncan, S. H., Harmsen, H. J., Garcia-Gil, L. J., Flint, H. J. (2012). Cultured representatives of two major phylogroups of human colonic *Faecalibacterium prausnitzii* can utilize pectin, uronic acids, and host-derived substrates for growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(2), 420-428. <http://doi:10.1128/aem.06858-11>.

- Luo, Q., Kumar, P., Vickers, T. J., Sheikh, A., Lewis, W. G., Rasko, D. A., Fleckenstein, J. M. (2014). Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes a highly conserved mucin-degrading metalloprotease to effectively engage intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 82(2), 509-521. <http://doi:10.1128/IAI.01106-13>.
- Lyngwi, N. A., Joshi, R. (2014). Biology of useful plants and microbes, chapter: economically important *Bacillus* and related genera: a mini review, Publisher: Narosa publishing house, New Delhi, India, Editors: A. Sen, pp.33-43.
- Mahendran, S., Vijayabaskar, P., Saravanan, S., An, K., Shankar, T. (2013). Structural characterization and biological activity of exopolysaccharide from *Lysinibacillus fusiformis*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(38), 4666-4676. <http://10.5897/AJMR2013.5639>.
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D., Hirschfield, G. M., Hold, G., Tuohy, K. M. (2016). The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330-339. <http://10.1136/gutjnl-2015-309990>.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiminez, E., Marin, M. L., Xaus, J., Rodriguez, J. M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, 143(6), 754-758. <http://doi:10.1016/j.jpeds.2003.09.028>.
- Martínez, I., Wallace, G., Zhang, C., Legge, R., Benson, A. K., Carr, T. P., Walter, J. (2009). Diet-induced metabolic improvements in a hamster model of hypercholesterolemia are strongly linked to alterations of the gut microbiota.

Applied and Environmental Microbiology, 75(12), 4175-4184.
<http://doi:10.1128/aem.00380-09>.

Mayorga Reyes, L., González Vázquez, R., Cruz Arroyo, S. M., Melendez Avalos, A., Reyes Castillo, P. A., Chavaro Pérez, D. A., Langella, P. (2016). Correlation between diet and gut bacteria in a population of young adults. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 67(4), 470-478.
<http://10.3109/09637486.2016.1162770>.

Miller, D. J. (2004). Sydney ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart. The journal of Physiology, 555(Pt 3), 585-587.
<http://doi:10.1113/jphysiol.2004.060731>.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. Food and Function, 5(6), 1113-1124.
<http://doi:10.1039/c3fo60702j>.

Miquel, S., Leclerc, M., Martin, R., Chain, F., Lenoir, M., Raguideau, S., Langella, P. (2015). Identification of metabolic signatures linked to anti-inflammatory effects of *Faecalibacterium prausnitzii*. mBio, 6(2).
<http://doi:10.1128/mBio.00300-15>.

Mould, F. L., Ørskov, E. R., Mann, S. O. (1983). Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages.

Animal Feed Science and Technology, 10(1), 15-30.

[https://doi.org/10.1016/0377-8401\(83\)90003-2](https://doi.org/10.1016/0377-8401(83)90003-2)

Neef, A., Sanz, Y. (2013). Future for probiotic science in functional food and dietary supplement development. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 16(6), 679-687. <http://doi:10.1097/MCO.0b013e328365c258>.

Ogawa, A., Kadooka, Y., Kato, K., Shirouchi, B., Sato, M. (2014). *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces postprandial and fasting serum non-esterified fatty acid levels in Japanese hypertriacylglycerolemic subjects. *Lipids in Health and Disease*, 13, 36. <http://doi:10.1186/1476-511x-13-36>.

O'Hara, A. M., Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688-693. <http://doi:10.1038/sj.embor.7400731>.

Ouwerkerk, J. P., van der Ark, K. C. H., Davids, M., Claassens, N. J., Robert Finestra, T., de Vos, W. M., Belzer, C. (2016). Adaptation of *Akkermansia muciniphila* to the oxic-anoxic interface of the mucus layer. *Applied and Environmental Microbiology*. <http://doi:10.1128/AEM.01641-16>.

Patel, R., DuPont, H. L. (2015). New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60 Suppl 2, S108-121. <http://doi:10.1093/cid/civ177>.

Perez-Cano, F. J., Dong, H., Yaqoob, P. (2010). In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius*

- CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*, 215(12), 996-1004. <http://doi:10.1016/j.imbio.2010.01.004>.
- Piterina, A. V., Bartlett, J., Pembroke, J. T. (2010). Molecular analysis of bacterial community DNA in sludge undergoing autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD): Pitfalls and improved methodology to enhance diversity recovery. *Diversity*, 2(4), 505-526. <http://10.3390/d2040505>.
- Png, C. W., Lindén, S. K., Gilshenan, K. S., Zoetendal, E. G., McSweeney, C. S., Sly, L. I., Florin, T. H. (2010). Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *The American Journal of Gastroenterology*, 105(11), 2420-8. <http://doi:10.1038/ajg.2010.281>.
- Presti, I., D'Orazio, G., Labra, M., La Ferla, B., Mezzasalma, V., Bizzaro, G., Di Gennaro, P. (2015). Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(13), 5613-5626. <http://doi:10.1007/s00253-015-6482-8>.
- Pryde, S. E., Duncan, S. H., Hold, G. L., Stewart, C. S., Flint, H. J. (2002). The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, 217(2), 133-139. <http://10.1111/j.1574-6968.2002.tb11467.x>.
- Qiu, X., Zhang, M., Yang, X., Hong, N., Yu, C. (2013). *Faecalibacterium prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating

- TNBS-induced colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7(11), e558-568.
<http://doi:10.1016/j.crohns.2013.04.002>.
- Quigley, E. M. (2011). Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 11(6), 593-603.
<http://doi:10.1016/j.coph.2011.09.010>.
- Quinn, K. P., Lightner, A. L., Pendegraft, R. S., Enders, F. T., Boardman, L. A., Raffals, L. E. (2016). Pouchitis is a common complication in patients with familial adenomatous polyposis following ileal pouch–anal anastomosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(9), 1296-1301.
- Rajilic-Stojanovic, M., Biagi, E., Heilig, H. G., Kajander, K., Kekkonen, R. A., Tims, S., de Vos, W. M. (2011). Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 141(5), 1792-1801.
<http://doi:10.1053/j.gastro.2011.07.043>.
- Ramakrishna, B. S. (2007). The normal bacterial flora of the human intestine and its regulation. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 41, S2-S6.
<http://doi:10.1097/MCG.0b013e31802fba68>.
- Roberts, L. M., McCahon, D., Holder, R., Wilson, S., Hobbs, F. R. (2013). A randomised controlled trial of a probiotic 'functional food' in the management of irritable bowel syndrome. *BioMed Central Gastroenterology*, 13(1), 45.
<http://10.1186/1471-230X-13-45>.

- Rowland, I., Capurso, L., Collins, K., Cummings, J., Delzenne, N., Goulet, O., Meier, R. (2010). Current level of consensus on probiotic science--report of an expert meeting--London, 23 November 2009. *Gut Microbes*, 1(6), 436-439. <http://doi:10.4161/gmic.1.6.13610>.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M. J., Casquete, R., Serradilla, M. J., Córdoba, M. d. G. (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, 83(3), 460-467. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.027>.
- Ryan, K. A., Jayaraman, T., Daly, P., Canchaya, C., Curran, S., Fang, F., O'Toole, P. W. (2008). Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), 269-274. <http://10.1111/j.1472-765X.2008.02416.x>.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197-215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8).
- Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., Gil, A. (2015). The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *BioMed Research International*, 2015, 2015:505878. <http://doi:10.1155/2015/505878>.

- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Birkeland, S. E. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106
- Sanders, M. E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P. R., Quigley, E. M., Sartor, R. B., Mayer, E. A. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62(5), 787-796. <http://doi:10.1136/gutjnl-2012-302504>.
- Schneeberger, M., Everard, A., Gómez-Valadés, A. G., Matamoros, S., Ramírez, S., Delzenne, N. M., Cani, P. D. (2015). *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports*, 5, 16643. <http://doi:10.1038/srep16643>.
- Schubert, A. M., Sinani, H., Schloss, P. D. (2015). Antibiotic-induced alterations of the murine gut microbiota and subsequent effects on colonization resistance against *Clostridium difficile*. *mBio*, 6(4). <http://doi:10.1128/mBio.00974-15>.
- Servin, A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4), 405-440. <http://doi:10.1016/j.femsre.2004.01.003>.
- Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Del Papa, M. F., Lagares, A., Luna, V. (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the

- halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 371-381. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2116-3>.
- Shields, P., Cathcart, L. (2013). *Oxidase Test Protocol*. ASM peer-Reviewed, 1-10.
- Shin, N. R., Lee, J. C., Lee, H. Y., Kim, M. S., Whon, T. W., Lee, M. S., Bae, J. W. (2013). An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, gutjnl-2012. <http://doi:10.1136/gutjnl-2012-303839>.
- Singh, A., Kumar, M., Ghosh, M., Ganguli, A. (2014). Traditional foods and beverages as delivery vehicles for probiotics. *Biotechnology. Novel Drug Delivery*, Studium Press LLC, 8, 413-439.
- Solis, G., de Los Reyes-Gavilan, C. G., Fernandez, N., Margolles, A., Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*, 16(3), 307-310. <http://10.1016/j.anaerobe.2010.02.004>.
- Song, D., Ibrahim, S., Hayek, S. (2012). Recent application of probiotics in food and agricultural science. In *Probiotics: InTech*. <http://10.5772/50121>.
- Stams, A. J., Van Dijk, J. B., Dijkema, C., Plugge, C. M. (1993). Growth of syntrophic propionate-oxidizing bacteria with fumarate in the absence of methanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1114-1119. [http://0099-2240/93/041114-06\\$02.00/0](http://0099-2240/93/041114-06$02.00/0).

- Swidsinski, A., Dorffel, Y., Loening-Baucke, V., Theissig, F., Ruckert, J. C., Ismail, M., Dorffel, W. V. (2011). Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. Gut, 60(1), 34-40. <http://doi:10.1136/gut.2009.191320>.
- Teotia, U., Kumar, R., Mishra, A. K., Verma, D. (2014). Role of probiotics and probiotic beverages on human health. Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences, 2(3), 78-84.
- Thomas, C. M., Versalovic, J. (2010). Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. Gut Microbes, 1(3), 148-163. <http://doi:10.4161/gmic.1.3.11712>.
- Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Bermudez-Humaran, L. G. (2016). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(1), 385-396. <http://doi:10.1007/s00253-015-7049-4>.
- Tsai, C.-C., Leu, S.-F., Huang, Q.-R., Chou, L.-C., Huang, C.-C. (2014). Safety evaluation of multiple strains of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* in wistar rats based on the ames test and a 28-day feeding study. The Scientific World Journal, 2014, 2014:928652. <http://doi:10.1155/2014/928652>.
- Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., Young, W., McNabb, W. C., van Baarlen, P., Moughan, P. J., Roy, N. C. (2015). Live *Faecalibacterium prausnitzii* in an

- apical anaerobic model of the intestinal epithelial barrier. *Cellular Microbiology*, 17(2), 226-240. <http://doi:10.1111/cmi.12360>.
- Unikel Santoncini, C., Díaz de León Vázquez, C., Rivera Márquez, J.A. (2016). Conductas alimentarias de riesgo y correlatos psicosociales en estudiantes universitarios de primer ingreso con sobrepeso y obesidad. *Salud Mental*, 39(3), 141-148 <http://doi:10.17711/SM.0185-3325.2016.012>
- Valcheva, R., Dieleman, L. A. (2016). Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 27-37. <http://doi:10.1016/j.bpg.2016.02.008>.
- Vandenplas, Y. (2016). Probiotics and prebiotics in infectious gastroenteritis. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 49-53. <http://doi:10.1016/j.bpg.2015.12.002>.
- Varela, E., Manichanh, C., Gallart, M., Torrejon, A., Borrueal, N., Casellas, F., Antolin, M. (2013). Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 38(2), 151-161. <http://doi:10.1111/apt.12365>.
- Varma, P., Dinesh, K. R., Menon, K. K., Biswas, R. (2010). *Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 75(9), M546-551. <http://doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01818.x>.

- Venugopalan, V., Shriner, K. A., Wong-Beringer, A. (2010). Regulatory oversight and safety of probiotic use. *Emerging Infectious Diseases*, 16(11), 1661-1665. <http://doi:10.3201/eid1611.100574>.
- Villanueva-Millan, M. J., Perez-Matute, P., Oteo, J. A. (2015). Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 71(3), 509-525. <http://doi:10.1007/s13105-015-0390-3>.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Whitman, W. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3): Springer Science and Business Media*. <http://10.1007/978-0-387-68489-5>.
- Wang, J., Fan, Y., Yao, Z. (2010). Isolation of a *Lysinibacillus fusiformis* strain with tetrodotoxin-producing ability from puffer fish *Fugu obscurus* and the characterization of this strain. *Toxicon*, 56(4), 640-643. <http://doi:10.1016/j.toxicon.2010.05.011>.
- Wilson, I., Nicholson, J. (2009). The role of gut microbiota in drug response. *Current Pharmaceutical Design*, 15(13), 1519-1523. <http://10.2174/138161209788168173>.
- Wong, J. M., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., Jenkins, D. J. (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 40(3), 235-243.

Wong, V. W., Tse, C. H., Lam, T. T., Wong, G. L., Chim, A. M., Chu, W. C., Chan, H. L. (2013). Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis a longitudinal study. PLoS One, 8(4), e62885. <http://doi:10.1371/journal.pone.0062885>.

Woodard, G. A., Encarnacion, B., Downey, J. R., Peraza, J., Chong, K., Hernandez-Boussard, T., Morton, J. M. (2009). Probiotics improve outcomes after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a prospective randomized trial. Journal of Gastrointestinal Surgery, 13(7), 1198-1204. <http://doi:10.1007/s11605-009-0891-x>.

Wu, N., Yang, X., Zhang, R., Li, J., Xiao, X., Hu, Y., Zhu, B. (2013). Dysbiosis signature of fecal microbiota in colorectal cancer patients. Microbial Ecology, 66(2), 462-470. <http://doi:10.1007/s00248-013-0245-9>.

Documentos en línea

Sociedad Española de probióticos y prebióticos Consenso sobre probioticos. (2009). Disponible en <http://www.sepyp.es/pdf/Documento-de-Consenso-sobre-Probioticos.pdf>.

Pagina web

World Health Organization. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> World Health Organization ight. Consultado el día 15 de Enero 2017.

12. Anexos

12.1. Anexo 1. Cuestionario de selección

Microbiota Intestinal en jóvenes I

TC_____

Nombre_____ Edad_____ Sexo_____

Carrera_____ Trimestre_____

Email_____ Teléfono_____

1. ¿Haz consumido antibióticos en un lapso menor a 6 meses?

Sí_____ No_____

2. ¿Eres Fumador o bebedor?

Sí_____ No_____

3. ¿Consume drogas?

Sí_____ No_____

4. ¿Consume algún suplemento?

Sí_____ No_____ ¿Cuál?_____

5. En caso de ser mujer ¿Estas embarazada o Lactando?

Sí_____ No_____

12.2. Anexo 2. Consentimiento informado



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDA XOCHIMILCO**

Casa abierta al tiempo

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Consentimiento para participar en la investigación **“Relación de parámetros antropométricos con la frecuencia de consumo de alimentos de individuos jóvenes que inician su periodo universitario en la UAM-Xochimilco”**

Hago constar que he sido informado que en el Departamento de Sistemas Biológicos de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana, se está realizando el proyecto “Relación de parámetros antropométricos con la frecuencia de consumo de alimentos de individuos jóvenes que inician su periodo universitario en la UAM-Xochimilco” y he entendido los siguientes aspectos:

- 1.- Para poder participar en el estudio debo ser de cualquier condición de peso.
- 2.- Contestaré con datos verídicos un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos el cual será utilizado para determinar mi ingesta diaria habitual.
- 3.- Se me determinará el peso, estatura y circunferencia de cintura a través de una báscula. Entiendo que para la determinación de la circunferencia de cintura deberé descubrir de ropa mi cintura. Estas se tomarán en el evento de introducción a la universidad para alumnos de nuevo ingreso, realizado los días 26, 27 y 28 de Abril de 2016 por el Departamento de atención a la salud.
- 4.- He sido informado (a) que toda la información obtenida será confidencial y estará solo disponible para los investigadores. Mi muestra será codificada con una clave para proteger mi identidad.
- 5.- He sido informado (a) de la garantía que tengo de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a las dudas que surjan respecto a los asuntos relacionados con el proyecto y mi participación en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología que se encuentra en el edificio N-104 con el Dr. Alejandro Azaola, Dr. Lino Mayorga y Dra. Raquel González Vázquez.

Manifiesto haber leído el consentimiento informado y doy sin obligación y por decisión propia consentimiento para la toma de muestras y el tratamiento al que mis muestras serán sometidas.

Datos del participante

Nombre: _____

Edad: _____ Género (H) (M) Estado Civil _____

Correo electrónico: _____

Lugar de nacimiento: _____

Firma del participante: _____

Lugar, fecha y hora: _____

Testigo 1: Nombre y Firma _____

Testigo 2: Nombre y Firma _____

Nombre del (la) investigador (a) que obtuvo el consentimiento _____

Firma _____



12.3. Anexo 3 Cuestionario de frecuencia de consumo



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDA XOCHIMILCO**

“Estudio de la microbiota intestinal para la prevención y tratamiento de la obesidad en jóvenes”

“FRECUENCIA DE CONSUMO 2016”

Nombre: _____ **ID:** _____

Fecha: _____

Durante el año previo a este día ¿Con qué frecuencia consumió usted estos productos?

Productos Lácteos											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes (1)	Vece s al mes 1-3 (2)	Veces a la semana			Veces al día			
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
1.- Un vaso de leche entera											
2.- Una rebanada de queso fresco o 1/2 taza de queso cottage											
3.- Una rebanada de queso oaxaca											
4.- Una rebanada de queso manchego o chihuahua											
5.- Una cucharada de queso crema											
6.- Una taza de yogurth o bulgaros											
7.- Un barquillo con helado de leche											

Frutas											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
8.- Un plátano											
9.- Una naranja											
10.- Un vaso con jugo de naranja o toronja											
11.- Una rebanada de melón											
12.- Una manzana fresca											
13.-Una rebanada de sandia											
14.- Una rebanada de piña											
15.- Una rebanada de papaya											
16.- Una pera											
18.- Una mandarina											
19.- Una porción de fresas (± 10)											
20.- Un durazno chabacano o nectarina											
21.- Una tuna											
23.- Una porcion de ciruelas (± 6)											
24.- Una rebanada de mamey											
25.- Un zapote											
25.1.- Frutas secas											

Huevo, carnes o embutidos											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes (1)	Vece s al mes 1-3 (2)	Veces a la semana			Veces al día			
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
26.- Huevo de gallina											
27.- Una pieza de pollo											
28.- Una rebanada de jamón											
29.- Un plato de carne de res											
30.- Un plato de carne de cerdo											
31.- Una porción de atún											
32.- Un pedazo de chicarrón											
33.-Una salchicha											
34.- Una rebanada de tocino											
35.- Un bistec de hígado o higaditos de pollo											
36.- Un trozo de chorizo o longaniza											
37.- Un plato de pescado fresco (mojarra etc)											
38.- Un plato de sardinas en jitomate											
39.- Media taza de mariscos											
40.- Un plato de carnitas											
41.- Un plato de barbacoa											

Verduras											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
42.-Un jitomate en salsa o guisado											
43.- Un jitomate crudo o en ensalada											
44.- Una papa o camote											
45.- Media taza de zanahorias											
46.- Una hoja de lechuga											
47.- Media taza de espinacas u otra verdura de hoja verde											
47.1.- Media taza de col											
47.2.- Media taza de brócoli											
47.3.-Media taza de pepino											
48.- Media taza de calabacitas o chayotes											
49.- Media taza de nopalitos											
50.- Un plato de sopa crema de verduras											
51.- Medio aguacate											
52.- Media taza de flor de calabaza											
53.- Media taja de coliflor											
54.- Media taza de ejotes											

Verduras											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
55.- Una cucharadita de salsa picante o chiles con sus alimentos											
56.- Chiles de lata											
57.- Un platillo con chile seco											
58.- Un elote											

Leguminosas											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
59.- Un plato de frijoles											
60.- Media taza de chicharos											
61.- Un plato de habas verdes											
62.- Un plato de habas secas											
63.- Un plato de lentejas o garbanzos											

Cereales											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes (1)	Vece s al mes 1-3 (2)	Veces a la semana			Veces al día			
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
64.- Una tortilla de maíz											
65.- Tortilla de trigo (harina)											
66.- Una rebanada de pan de caja tipo Bimbo											
67.- Una rebanada de pan de caja integral											
68.- Un bolillo o telera											
69.- Una pieza de pan dulce											
70.- Un plato de arroz											
70.1.-Un plato de arroz integral											
71.- Un plato de sopa de pasta											
71.1 Un plato de sopa de pasta integral											
72.- Un plato de avena											
73.- Un tazón de cereal de caja tipo hojuelas de maíz ¿Cuál? _____											
74.- Cereal alto en fibra ¿Cuál? _____											

Golosinas o postres											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
75.- Una rebanada de pastel											
76.- Una cucharadita de ate, miel , mermelada, cajeta o leche condensada											
77.- Una cucharadita de chocolate en polvo											
78.- Una tablilla de chocolate											
79.- Una bolsa de frituras											

Bebidas											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
80.- Un refresco de cola mediano											
81.- Un refresco gaseoso de sabor											
82.- Un refresco dietético											
83.- Un vaso con agua de sabor azucarada											
84.- Una taza de café sin azúcar											

Bebidas											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
85.- Una taza de atole sin leche											
86.- Una taza de atole con leche											
87.- Una cerveza											
88.- Una copa de vino de mesa											
89.- Una bebida con ron, brandy o tequila											

Antojitos mexicanos											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
101.- Un taco al pastor											
102.- Un sope o quesadilla											
103. Un plato de pozole											
104.- Un tamal											

Grasas ¿Qué tipo de aceite utiliza para cocinar?											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes (1)	Vece s al mes 1-3 (2)	Veces a la semana			Veces al día			
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
90.- Aceite de maíz											
91.- Aceite de soya											
92.- Aceite de girasol											
93.- Aceite de cártamo											
94.- Aceite de oliva											
95.- Una cucharadita de margarina											
96.- Una cucharadita de mantequilla											
97.- Una cucharadita de crema											
98.- Una cucharadita de mayonesa											
99.- Una cucharadita de manteca vegetal											
100.- Una cucharadita de manteca animal											

Antojitos mexicanos											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
101.- Un taco al pastor											
102.- Un sope o quesadilla											
103. Un plato de pozole											
104.- Un tamal											

Otros											
Tipos de alimentos	Por cio nes	Nu nca (0)	Menos de una vez al mes	Vece s al mes 1-3	Veces a la semana			Veces al día			
			(1)	(2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
105.- Charales secos											
106. Aceite de hígado de bacalao											
107.- Salmón fresco											
108.- Salmón enlatado											
109.- Sardina en aceite											
109.1.- Linaza											
109.2.- Chía											
109.3.-Soya o alimentos a base de soya											

Contesta las siguientes preguntas							
1.- ¿Cuántas cucharaditas de azúcar agregas a tus alimentos a lo largo del día? Toma en cuenta lo que pones al café, té, licuado etc.	0	1 a 2	3 a 4	5 a 6	7 a 8	9 a 10	11 o más
2.- ¿Le agregas sal a tus alimentos antes de probarlos?	Sí _____	No _____					
3.- ¿Te comes el pellejo del pollo?	Sí _____	No _____					
4.- ¿Te comes el gordito de la carne?	Sí _____	No _____					
5.- ¿Cuántos meses del año pasado consumiste vitaminas?	0	1 a 2	3 a 4	5 a 6	7 a 8	9 a 10	11 o más
6.- ¿Cuáles? _____							
7.- ¿Cuántos meses del año pasado consumiste suplementos de calcio?	0	1 a 2	3 a 4	5 a 6	7 a 8	9 a 10	11 o más
8.- ¿Cuáles? _____							
9.- ¿Consideras que tu alimentación ha cambiado durante el último año?	Sí _____	No _____					