

Nombre del proyecto específico:

Cuantificación de lactobacilos y aerobios totales en heces de ratones BALB/c con colitis ulcerativa sometidos a estrés

Proyecto genérico:

Evaluación de productos relacionados con la salud

Etapas:

Evaluación fármaco toxicológica de compuestos activos



PRESENTA:

García Peña María de los Ángeles

MATRICULA:

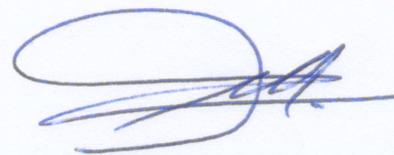
206346731

ASESORES:

Maria Elisa Drago S.

Dra. Maria Elisa Drago-Serrano

No. Económico: 17243



Dra. Fabiola Guzmán-Mejía

Investigadora postdoctoral CONAHCyT

Resumen

Introducción. Normalmente la abundancia de la microbiota esta balanceada, sin embargo, algunas condiciones como la colitis ulcerosa y el estrés pueden causar disbiosis, en la cual ocurre una alteración del crecimiento de las poblaciones microbianas, como lactobacilos y aerobios totales.

Justificación. La cuenta fecal de lactobacilos y aerobios en ratones sometidos a estrés ha sido poco estudiada, no obstante, su importancia radica en que su estudio podría tener un impacto en el desarrollo de estrategias basadas en agentes inmunomoduladores para el control de colitis y el estrés.

Materiales y métodos. Se realizó un ensayo por duplicado en ratones BALB/c machos de ocho semanas de edad, divididos en un grupo de seis ratones tratado con (1) dextran sulfato de sodio (DSS) al 3% y un (2) grupo control tratado con agua, ambos sin estrés. Un último ensayo consistió en ratones tratados con (3) DSS al 3% y (4) grupo control, ambos sometidos a estrés por restricción de movimiento. En los tres ensayos se recolectaron en caldo tioglicolato heces a los 7 y 14 días después del tratamiento, se maceraron para preparar diluciones seriadas a 1:25, 1:250 y 1:2500 en el mismo caldo. Las suspensiones se cultivaron a 37°C, en agar TSA durante 24 horas en condiciones de aerobiosis para el cultivo de aerobios totales y en agar MRS durante 48 horas en anaerobiosis para cultivar lactobacilos. Las colonias bacterianas se contaron y los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias sobre gramo (UFC/g). Los datos que siguieron la normalidad se compararon con la prueba paramétrica ANOVA y la prueba post-hoc Tukey para evaluar diferencias significativas entre grupos; los datos que no siguieron la normalidad se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc Dunn, las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

Resultados. La cuenta de aerobios no presentó diferencias significativas en ninguno de los ensayos. Los datos de un solo ensayo del grupo tratado con DSS al 3% sin estrés, mostraron que la cuenta de lactobacilos en las heces colectadas al día 14 fue mayor significativamente en comparación con el día 7 (** $p=0.0049$) y con su respectivo grupo control (** $p=0.0084$) en la dilución 1:250; y fue menor significativamente en comparación con el día 7 ($p=0.0115$) para la dilución 1:25. En el duplicado y en la unión de los datos de los dos ensayos de DSS al 3% sin estrés, la cuenta de lactobacilos en el grupo tratado con DSS al 3% al día 14 fue menor significativamente con respecto al día 7 en la dilución 1:25 ($p=0.0492$ del duplicado, $p=0.0128$ en la unión de los dos ensayos sin estrés).

Conclusiones. De acuerdo a los datos, el DSS no afecto la cuenta de aerobios pero, aparentemente, si redujo la cuenta de lactobacilos, al menos, en la dilución 1:25. Al parecer, el efecto del DSS sobre la cuenta de aerobios y lactobacilos no fue influida por el estrés.

Palabras clave: DSS, estrés, lactobacilos, aerobios, microbiota intestinal, disbiosis, colitis.

Abstract

Introduction. Normally the abundance of the microbiota is balanced, however, some conditions such as ulcerative colitis and stress can cause dysbiosis, in which a disruption of the growth of microbial populations, such as *lactobacilli* and total aerobes occurs. **Justification.** The fecal count of *lactobacilli* and aerobes in mice under stress has been little studied, however its importance lies in that its study could have an impact on the development of strategies based on immunomodulating agents for the control of colitis and stress. **Materials and methods.** A duplicate test was performed on eight-week old male BALB/c mice, divided into one group of six mice treated with (1) 3% sodium dextran sulphate (DSS) and one (2) water-treated control group, both stress free. A final trial consisted of mice treated with (3) 3% DSS and (4) control group, both subjected to restrain stress. In all three trials, stools were collected in thioglycolate broth at 7 and 14 days after treatment, macerated to prepare serial dilutions at 1:25, 1:250 and 1:2500 in the same broth. Suspensions were grown at 37°C, in TSA agar for 24 hours under aerobic conditions for total aerobe culture and in MRS agar for 48 hours under anaerobiosis to cultivate *lactobacilli*. Bacterial colonies were counted and results expressed in colony-forming units per gram (CFU/g). Data that followed normal distribution was compared with the parametric ANOVA test and the post-hoc Tukey's test to assess significant differences between groups; data that did not follow normal distribution were analyzed with the non-parametric Kruskal-Wallis test and the post-hoc Dunn's test, the significant differences were regarded at $p < 0.05$. **Results.** The aerobe count did not show significant differences in any of the tests. Data from a single trial of the 3% stress-free DSS group showed that the *lactobacilli* count in feces collected at day 14 was significantly higher compared to day 7 (** $p=0.0049$) and with its respective control group (** $p=0.0084$) at 1:250 dilution; and was significantly lower compared to day 7 (* $p=0.0115$) at 1:25 dilution. In the duplicate and on the joined data from the two 3% stress-free DSS trials, the *lactobacilli* count in the group treated with 3% DSS at day 14 was significantly lower than at day 7 at 1:25 dilution (* $p=0.0492$ of the duplicate, * $p=0.0128$ at the joined data of the two stress-free trials). **Conclusions.** According to the data, the DSS did not affect the aerobe count but apparently it did reduce the *lactobacilli* count at least at 1:25 dilution and it appears that the effect of the DSS on the aerobe and *lactobacilli* count was not influenced by stress.

Keywords: DSS, stress, lactobacilli, aerobic, intestinal microbiota, dysbiosis.

INDICE

1. Introducción

2. Antecedentes

2.1. Microbiota intestinal

2.2. Colitis

2.3. Estrés

3. Justificación

4. Objetivo

5. Materiales y métodos

5.1. Ratones

5.2. Diseño experimental

5.3. Recolección y procesamiento de muestras

5.4. Estadística

6. Resultados y análisis de resultados

6.1. Cuenta de aerobios totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el primer ensayo

6.2. Cuenta de aerobios totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el segundo ensayo

6.3. Cuenta de aerobios totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el tercer ensayo

6.4. Cuenta de aerobios totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en los ensayos sin estrés

6.5. Cuenta de lactobacilos totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el primer ensayo

6.6. Cuenta de lactobacilos totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el segundo ensayo

6.7. Cuenta de lactobacilos totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el tercer ensayo

6.8. Cuenta de lactobacilos totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en los ensayos sin estrés

7. Conclusión

8. Bibliografía

9. Anexos

9.1. Tabla de pesos de heces

9.2. Preparación de medios de cultivo

9.2.1. Caldo tioglicolato

9.2.2. Agar soya triptocaseina (TSA)

9.2.3. Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS)

9.3. Materiales

1. INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal constituye uno de los más grandes reservorios de la microbioma humana, en el que se incluyen diversos componentes como lactobacilos y anaerobios facultativos que pueden crecer en condiciones de aerobiosis. Es un ecosistema abundante y estable debido a su biodiversidad, complejidad, redundancia e interacciones con el huésped. La integridad de la barrera intestinal depende de su interacción con la microbiota (Salvo-Romero, E. 2015). En condiciones normales la microbiota excluye ciertos componentes dañinos, que dan lugar al desarrollo de una respuesta inmunitaria exagerada, exacerbando la disfunción de la barrera intestinal (Salvo-Romero, E. 2015). La microbiota tiene un papel importante en el antagonismo microbiano, el cual se refiere a la inhibición del crecimiento de un microorganismo por otro (Feichtmayer, J. 2017).

La microbiota puede ser alterada por ciertas condiciones como la colitis ulcerosa, la cual es un desorden inflamatorio del tracto gastrointestinal que afecta el área colon-rectal. La colitis ulcerosa es de importancia epidemiológica en México ya que se presenta en la población adulta joven y de edad media. La colitis ulcerosa conlleva una reducción de la calidad de vida y puede derivar a colitis ulcerosa aguda, colectomía o, en algunos casos, cáncer colón-rectal (Yamamoto-Furusho J.K., 2020).

De igual manera, diversos estudios demuestran que la microbiota intestinal puede ser alterada en situaciones de estrés (Machorro-Rojas N., et. al. 2019). El estrés se define como un conjunto de eventos, que consiste en un factor estresante que estimula una respuesta en el cerebro, activando una respuesta de lucha o huida en el cuerpo (Dhabhar F.S., 2009).

Este proyecto de servicio social se enfocó a estimar la cantidad de lactobacilos y aerobios totales en heces de ratones tratados con dextran sulfato de sodio (DSS) sometidos a estrés por restricción de movimiento. Este tipo de estudios puede ser relevante para el desarrollo de estrategias basadas en agentes inmunomoduladores y farmacológicos para el control de la colitis y el estrés.

2. ANTECEDENTES

2.1. Microbiota intestinal

La microbiota intestinal constituye uno de los más grandes reservorios de microorganismos del cuerpo humano. Es un ecosistema abundante y estable debido a su biodiversidad, complejidad, redundancia e interacciones con el huésped. La microbiota está considerada como una barrera microbiológica que participa en el mantenimiento de la función de barrera intestinal. La microbiota tiene un papel importante en el antagonismo microbiano, el cual se refiere a la inhibición del crecimiento de un microorganismo por otro (Feichtmayer, J. 2017).

La microbiota está compuesta de bacterias simbióticas que participan en los procesos digestivos e influyen en el desarrollo y función del sistema inmunitario intestinal (Salvo-Romero E. 2015). Entre los componentes que se encuentran en la microbiota están los lactobacilos y anaerobios facultativos que pueden crecer en condiciones de aerobiosis.

Dependiendo de su papel en el anfitrión, la microbiota puede dividirse en tres categorías. La primera categoría contiene las bacterias que hacen simbiosis con el organismo. En su mayoría, son anaerobias. Su principal función es la regulación inmune y nutricional. La segunda categoría contiene los patógenos condicionales que habitan en el anfitrión. En su mayoría son aerobios

facultativos y bacterias intestinales no dominantes. Estos organismos son inocuos cuando se mantiene la homeostasis intestinal y podrían ser oportunistas. La tercera categoría contiene principalmente patógenos (Shen Z.H. 2019).

La eubiosis se define como el equilibrio en la composición de la microbiota intestinal y cuya correcta ejecución es indispensable; cuando el equilibrio se rompe se produce el estado de disbiosis (Bustos-Fernández, L.M. 2022).

En condiciones de disbiosis se favorece el paso de bacterias al medio interno; lo anterior, puede dar lugar al desarrollo de una respuesta inmunitaria exagerada que amplifica la disfunción de la barrera y perpetúan el proceso inflamatorio. La alteración de la barrera intestinal se ha asociado al desarrollo de enfermedades inflamatorias en el tracto digestivo (Salvo-Romero E. 2015), por ejemplo la Colitis Ulcerativa

2.2. Colitis

La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria que afecta, principalmente, el colon y recto. Es causada por un desequilibrio entre la microbiota intestinal y la inmunidad de la mucosa, resultando en una excesiva inflamación intestinal (Shen Z.H. 2019).

En los pacientes con colitis ulcerosa se presenta disbiosis, lo que reduce ciertas poblaciones bacterianas y aumenta otras (Shen, Z.H. 2019), dañando la integridad de la inmunidad y perpetrando procesos inflamatorios.

En México entre el 15% al 40% de la población padece colitis, de acuerdo a la Organización Mundial de Gastroenterología del Hospital Juárez de México (Ciapponi, A. 2020). La colitis puede presentarse entre los 15 a 65 años de edad, pero quienes más padecen este síndrome están entre 30 a 45 años. Aunque la colitis se presenta en cualquier población, ha aumentado en los países en desarrollo (Ciapponi, A. 2020).

La característica principal de la colitis ulcerativa es la presencia de moco y sangre en las evacuaciones, acompañada por dolor abdominal. La localización del dolor depende de la extensión de la enfermedad (Yamamoto-Furusho, J.K. 2018). Puede presentarse de forma crónica, con recurrentes recidivas y largos episodios de remisión (Ciapponi, A. 2020).

Para estudiar los mecanismos implicados en la patogénesis de la colitis ulcerativa se dispone de modelos experimentales de colitis inducida con DSS (Panduragan, A.K. 2015).

El DSS es un polisacárido sulfatado cargado negativamente, soluble en agua de masa molecular de 5 a 1400kDa (Chassaing, B. 2014). El DSS puede causar una pérdida completa de las células epiteliales a través de la destrucción de la barrera epitelial, causando que la lámina propia y la submucosa estén expuestas a antígenos y la microbiota en el lumen, lo que induce la inflamación (Hue, Y. 2021).

Durante el tratamiento de DSS el ratón muestra pérdida de peso, endurecimiento y presencia de sangre en heces, diarrea, etc. (Hue, Y. 2021). El DSS causa colitis en ratones con características similares a la presentada en humanos. (Chassaing, B. 2014).

Se sabe que la colitis ulcerativa puede ser agravada por diversos factores ambientales, entre ellos la

exposición prolongada a estímulos estresantes que ocasionan disbiosis.

2.3. Estrés

El estrés consiste en un conjunto de eventos que estimulan una respuesta en el cerebro que activa la respuesta de lucha o huida en el cuerpo (Dhabhar, F.S. 2009). El estrés induce la activación del hipotálamo y la subsecuente liberación de vasopresina arginina (AVP) y la hormona liberadora de la corticotropina conocida popularmente por sus siglas en inglés como CRH (*corticotropin releasing hormone*). Esta última causa la activación de la pituitaria la cual secreta la hormona adrenocorticotrópica conocida por sus siglas en inglés como ACTH (*adrenocorticotropic hormone*). La ACTH se libera en la sangre y activa las neuronas de noradrenérgicas de la región medular de las glándulas adrenales las cuales liberan catecolaminas como epinefrina y norepinefrina. Así mismo la ACTH induce la activación de corteza de las glándulas adrenales para liberan hormonas corticosteroides como cortisol y corticosterona. La epinefrina y la norepinefrina son las causantes de la respuesta de lucha o huida (Guillians, T.G. 2010).

El cortisol se secreta para desviar los procesos celulares lejos de los procesos metabólicos a largo plazo hacia aquellos que funcionan principalmente en la supervivencia inmediata. La retroalimentación negativa del cortisol sobre su propia secreción está diseñada para limitar la exposición a largo plazo de los tejidos a estas acciones catabólicas e inmunosupresoras. El estrés crónico y constante causa la desregulación del eje hipotálamo- pituitaria- adrenal (HPA) afectando la función del organismo (Guillians, T.G. 2010).

Una característica distinguible del estrés es su duración e intensidad. El estrés agudo se define como un estrés que dura de minutos a horas y el estrés crónico persiste por varias horas al día por semanas o meses (Dhabhar, F.S. 2009).

Se ha observado que el estrés crónico puede reducir el grosor del moco intestinal, lo que favorece el contacto de la microbiota con la superficie del epitelio intestinal. Esto permite la activación de las vías de señalización que causan el aumento de la permeabilidad y, eventualmente, la infiltración de neutrófilos (Machorro-Rojas, N. 2019), que es característico del proceso inflamatorio.

En la investigación básica se utiliza el modelo de estrés restricción de movimiento para evaluar los cambios conductuales, bioquímicos y fisiológicos relacionados con el estrés en animales de laboratorio. El modelo de restricción de movimiento consiste en colocar al ratón en un tubo cilíndrico o semicilíndrico con orificios de ventilación durante tiempos variables que van desde 15 minutos hasta 8 horas (Campos, C.A. 2013).

3. JUSTIFICACION

Hasta el momento se desconocen los efectos que el estrés crónico puede causar sobre la cantidad de lactobacilos y aerobios en heces ratones. El estudio de este fenómeno podría tener un impacto en el desarrollo de estrategias basadas en agentes inmunomoduladores y farmacológicas para el control de colitis y el estrés.

El presente proyecto puede ser un referente experimental para evaluar los efectos del estrés crónico sobre la proliferación de bacterias intestinales en un modelo murino de colitis con alta similitud a la enfermedad que padece el ser humano.

4. OBJETIVO

Cuantificar el número total de colonias de aerobios y lactobacilos totales en heces de ratones BALB/c con colitis ulcerativa sometidos a estrés.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Ratones

Se utilizaron ratones macho BALB/c de 8 semanas de edad, proporcionados por la Unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio de la UAM Xochimilco (UPEAL, número de protocolo 229 y 231). Se dejaron aclimatar a temperatura de 20°C con humedad relativa de 55% y ciclo de luz-oscuridad 12/12h con la luz encendida a las 7:00 am y apagadas a las 7:00 pm.

Los ratones fueron provistos con alimento comercial (Laboratory rodent diet 5001, LabDiet Saint Louis, MO, USA) y agua del bioterio a libre demanda durante el periodo de adaptación a las condiciones de ambiente antes de proceder con las intervenciones experimentales.

El manejo de los ratones se hizo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

5.2. Diseño experimental

En el primer ensayo se trabajó con un grupo control tratado con agua (n=6) y el grupo tratado con DSS al 3% (n=6) administrado durante un periodo de 7 días. Tras 7 y 14 días de iniciado el tratamiento con DSS se recolectaron las muestras de heces. El segundo ensayo consistió en un duplicado de los grupos control y DSS 3% pero el número de ratones aumento a 8 sujetos para cada grupo.

Tabla 1. Ensayo de restricción de movimiento en ratones

Días	Grupo		Hora (hrs)	Tiempo (min)
	Agua	DSS 3%		
1	X	x	12:00	60
2	X	x	10:00	30
3	X	x	11:00	120
4	X	x	12:00	60
5	X	x	08:00	90
6	X	x	10:00	30
7	X	x	11:00	120

En el tercer ensayo se trabajó con un grupo control tratado con agua (n=7) y el grupo tratado con DSS al 3% (n=8) administrado durante un periodo de 7 días, paralelamente ambos grupos fueron sometidos a estrés por restricción de movimiento por siete días, el tiempo de manejo de los ratones varia y se muestra en la Tabla 1.

heces.

Tras 7 y 14 días de iniciado el tratamiento con DSS se recolectaron las muestras de

5.3. Recolección y procesamiento de muestras

Se recolectaron 2 pellets grandes o 3 pequeños de heces en tubos de 2.0mL estériles con 0.5mL de caldo tioglicolato a los 7 y 14 días después de iniciado el tratamiento con DSS al 3%. Posteriormente se registró el peso de las muestras (anexo 9.1) y congelaron.

Se maceraron las muestras en condiciones de esterilidad, hasta obtener una mezcla homogénea de la cual se tomó una alícuota de 0.04mL para mezclar con 0.96mL de caldo tioglicolato estéril hasta un volumen final del 1mL, obteniendo así la primera dilución (1:25).

Para la segunda dilución se tomaron 0.1mL de la dilución 1:25 y se mezclaron con 0.9mL de caldo tioglicolato para preparar una dilución de 1:250. Y posteriormente tomar 0.1mL de la dilución 1:250 para mezclar con 0.9mL de caldo tioglicolato obteniendo así la tercera, y última, dilución 1:2500.

El cultivo de bacterias se llevo a cabo en condiciones de esterilidad, tomando una alícuota de 0.01mL de cada dilución (1:25, 1:250 y 1:2500) de las muestras para sembrarse en placas de Petri con agar TSA (soya tripticaseina) para aerobios y agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) para lactobacilos. La incubación de las muestras se llevo a cabo a una temperatura de 37°C en diferentes condiciones: Las placas de agar TSA se incubaron por 24 horas en condiciones aerobias mientras que las placas de agar MRS se incubaron durante 48 horas en condiciones anaerobias, utilizando envases con sobres BD GasPak™ EZ anaerobic container system sachets (260678) para producir una atmosfera anaerobia y tiras indicadoras BD BBL™ dry anaerobic indicator strips.

Se realizó el conteo de colonias en cada medio y los datos reportados se expresaron en unidades formadora de colonias sobre gramo de muestra (UFC/g).

5.4. Estadística

Los datos fueron expresados en UFC/g y se compararon con la prueba paramétrica ANOVA cuando los datos siguieron la normalidad, o bien con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis cuando los datos no siguieron la normalidad. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$. Los datos serán analizados con software GraphPad Prism v8.0 (San Diego, CA. USA).

6. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

6.1. Cuenta de aerobios totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el primer ensayo

Del primer ensayo, los resultados de la cuenta de aerobios en heces de ratones a los 7 y 14 días del tratamiento con DSS se muestran en la Tabla 2. Los datos mostrados son del grupo control (Ctl), tratado con Agua, y el grupo tratado con DSS al 3%.

Tabla 2. Cuenta Aerobios (UFC/g) del primer ensayo					
Dilución 1:25		Dilución 1:250		Dilución 1:2500	
Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%
7 días					
53424.66	14108.35	205479.45	16930.02	753424.66	28216.70
353.61	74263.04	3536.07	90702.95	0.00	56689.34
1266.46	19815.06	0.00	13210.04	0.00	0.00
14357.05	90551.18	62421.97	85301.84	156054.93	131233.60
481.23	1595744.68	0.00	6755319.15	24061.60	64361702.13
3058.10	31323.88	2548.42	35460.99	0.00	59101.65
14 días					
122749.59	74331.02	298690.67	495540.14	286415.71	1189296.33
3980.89	170068.03	3980.89	1133786.85	0.00	1133786.85
99734.04	99075.30	199468.09	188243.06	398936.17	66050.20
100401.61	77962.58	160642.57	241683.99	167336.01	389812.89
101214.57	0.00	320512.82	0.00	371120.11	0.00
107449.86	105189.34	78796.56	399719.50	1253581.66	420757.36

Datos en UFC/g de bacterias aerobias sembradas en medio TSA

Los datos correspondientes de la cuenta bacteriana de aerobios mostrados en la Tabla 1 se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis, en el formato de caja y bigotes, observado en la Figura 1.

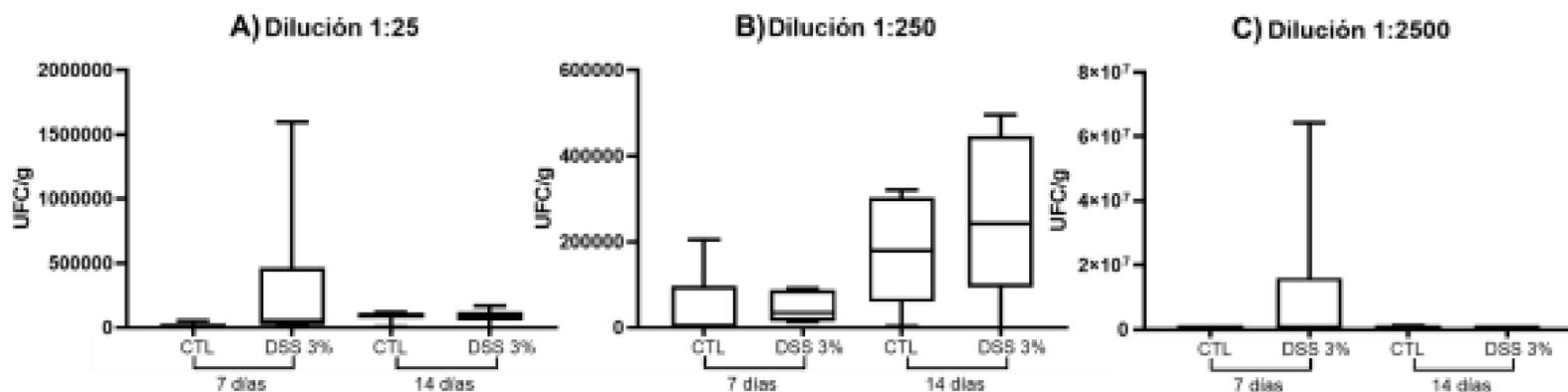


Figura 1. Cuenta de aerobios (UFC/g) del primer ensayo. Los datos muestran el límite inferior del bote, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y límite superior. Así como los valores más bajos y altos

En el primer ensayo no se observan diferencias significativas en ninguna dilución. Esto puede deberse a la gran dispersión de los datos.

6.2. Cuenta de aerobios totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el segundo ensayo

El segundo ensayo se obtienen los siguientes resultados, observados en la Tabla 3, de la cuenta bacteriana de aerobios de las muestras de heces recolectadas a 7 y 14 días para los grupos tratados con agua (control=ctl) y DSS al 3%.

Tabla 3. Cuenta Aerobios (UFC/g) del segundo ensayo					
Dilución 1:25		Dilución 1:250		Dilución 1:2500	
Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%
7 días					
164113.79	97911.23	421225.38	349216.71	711159.74	1697127.94
123558.48	98240.47	440691.93	80645.16	1112026.36	0.00
87924.97	8760.11	70339.98	286388.14	1406799.53	0.00
93517.14	127118.64	286885.25	1228813.56	149031.30	847457.63
112443.78	117889.91	712143.93	256880.73	787106.45	0.00
85130.53	98756.91	445516.46	580110.50	908059.02	0.00
109970.6745	183783.7838	549853.3724	1648648.649	1722873.9	1081081.081
0	31556.80224	0	182328.1907	26260.5042	0
14 días					
127986.3481	115384.6154	447952.2184	665384.62	383959.0444	615384.6154
169683.2579	85518.81414	588235.2941	855188.14	339366.5158	2309007.982
15031.64557	120385.2327	35601.26582	1003210.27	0	1926163.724
30303.0303	68106.31229	60606.06061	87209.30	37878.78788	166112.9568
84937.71234	32901.83387	164212.9105	51240.56	169875.4247	134843.5814
84459.45946	25886.03197	287162.1622	17373.18	225225.2252	34746.35163
30582.52427	31337.53501	92233.00971	71778.71	169902.9126	70028.0112
54755.04323	69333.33333	93659.94236	153333.33	0	33333.33333

Datos en UFC/g de bacterias aerobias sembradas en medio TSA

Los datos correspondientes a los resultados del conteo de aerobios en la Tabla 2 se analizaron por prueba de ANOVA y pueden observarse por la gráfica de dispersión de puntos en la Figura 2.

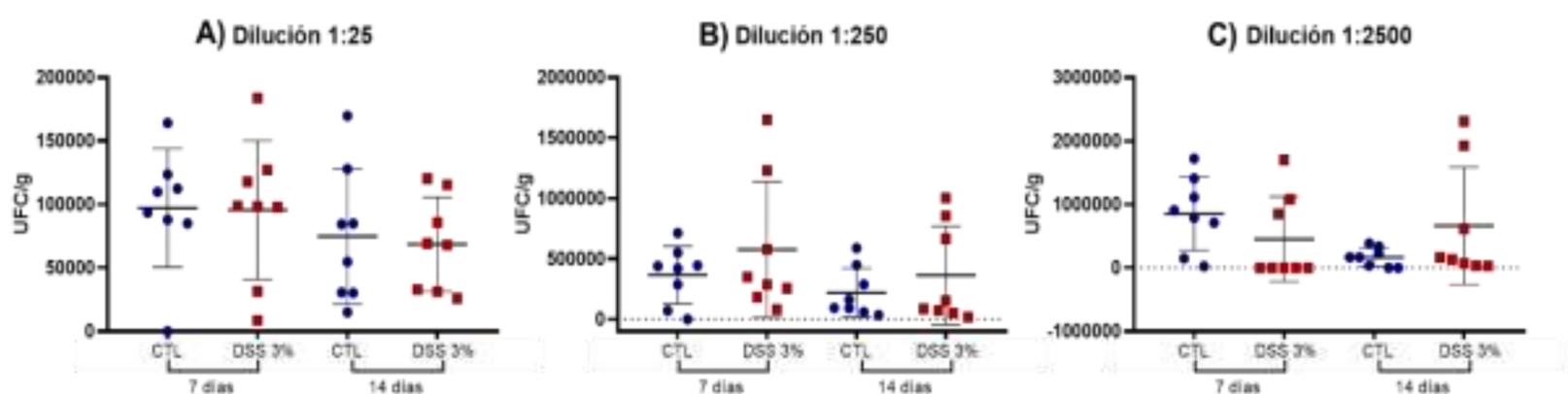


Figura 2. Cuenta de aerobios (UFC/g) del segundo ensayo. Los datos muestran la media y desviación estándar (DV) de cada grupo.

En el segundo ensayo no se observan diferencias significativas en ninguna dilución. Esto puede deberse a la gran dispersión de los datos.

6.3. Cuenta de aerobios totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el tercer ensayo

Los datos obtenidos de la cuenta bacteriana de aerobios totales del tercer ensayo, a los 7 y 14 días después de la administración del DSS, en los grupos estresados tratados con agua (Ctl) y DSS 3%; se pueden observar en la Tabla 4.

Tabla 4. Cuenta aerobios (UFC/g) del tercer ensayo					
Dilución 1:25		Dilución 1:250		Dilución 1:2500	
Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%
7 días					
105042.02	91463.41	773809.52	914634.15	945378.15	1310975.61
128865.98	108695.65	1125429.55	1068840.58	2104811.00	1123188.41
129087.78	65559.44	1290877.80	655594.41	1032702.24	3365384.62
180722.89	70888.47	1036144.58	708884.69	1746987.95	1937618.15
123558.48	72254.34	741350.91	149325.63	1606260.30	457610.79
112275.449	145348.84	778443.114	1453488.37	860778.443	436046.51
79664.5702	80385.8521	220125.786	803858.521	52410.9015	3269024.652
	104311.544		1043115.44		4728789.986
14 días					
202156.334	64766.8394	370619.946	66925.734	269541.779	172711.5717
77239.9588	218899.522	46343.9753	107655.502	77239.9588	837320.5742
140186.916	102599.179	565420.561	321477.428	467289.72	205198.3584
88339.2226	186104.218	500588.928	564516.129	117785.63	248138.9578
94936.7089	101488.498	250000	1014884.98	569620.253	1184032.476
139405.204	115207.373	580855.019	184331.797	1068773.23	76804.91551
71360.6089	92024.5399	366317.793	245398.773	285442.436	122699.3865
	1293103.45		9612068.97		7758620.69

Datos en UFC/g de la cuenta bacteriana de aerobios sembrado en medio TSA.

Los datos del conteo bacteriano de aerobios registrados en la Tabla 3 fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis representados con la gráfica de caja y bigote observados en la Figura 3.

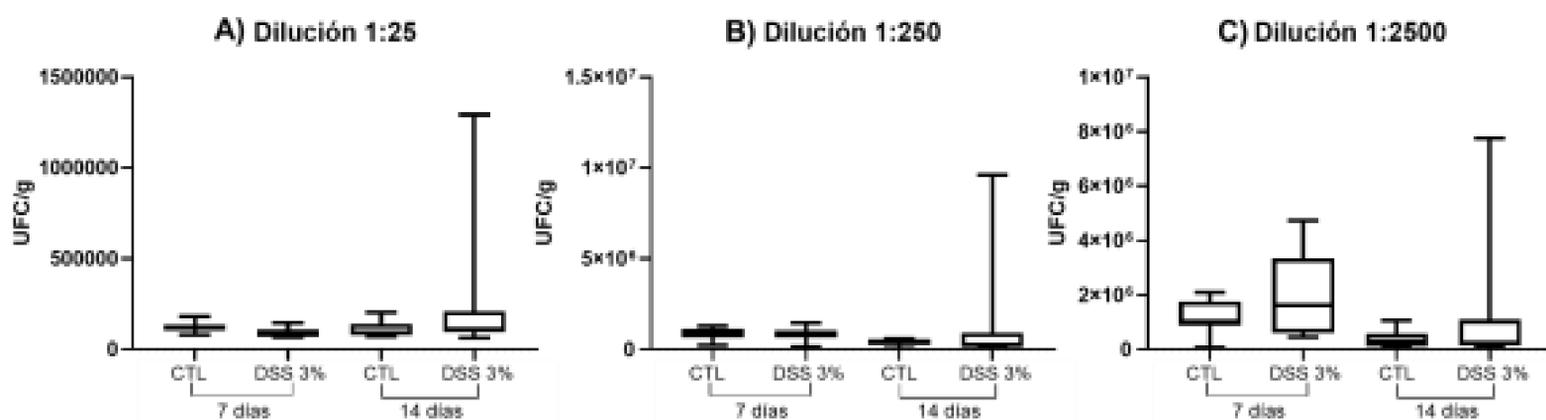


Figura 3. Cuenta de aerobios (UFC/g) del tercer ensayo (ratones sometidos a estrés). Los datos muestran el límite inferior del bote, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y límite superior. Así como los valores más bajos y altos

Similar a los anteriores ensayos, tampoco se observan diferencias significativas en el tercer ensayo. Si bien hay una gran dispersión, se debe ampliar la n con un duplicado para confirmar estos datos.

6.4. Cuenta de aerobios totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en los ensayos sin estrés

Los datos del conteo de aerobios presentados en la Tabla 1 y Tabla 2 (primero y segundo ensayo), se encuentran graficados en la figura 4. Se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, representado mediante la gráfica de caja y bigotes.

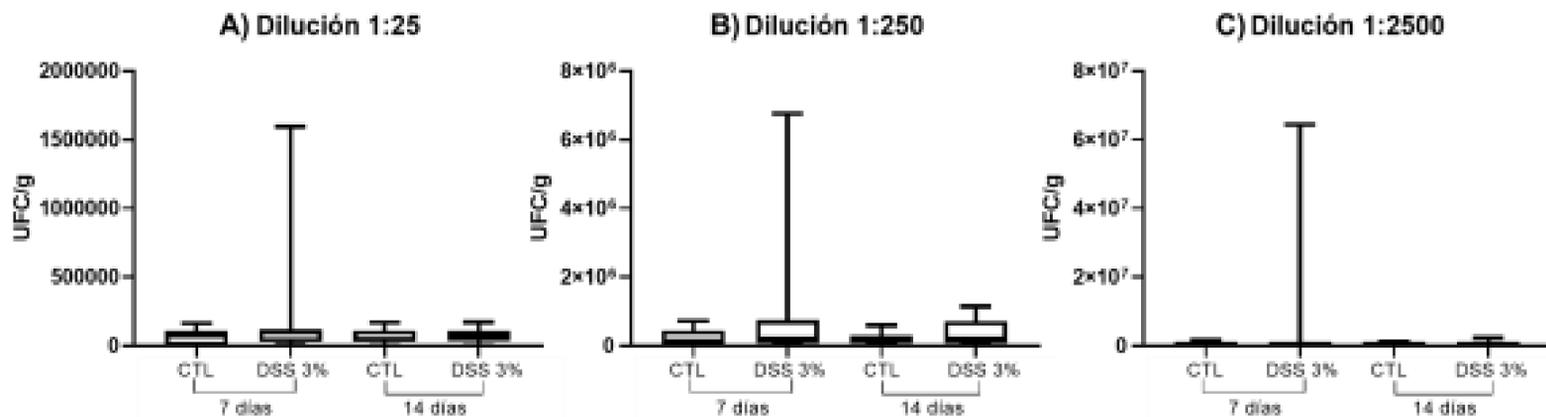


Figura 4. Cuenta de aerobios (UFC/g) de las muestras de ratones no sometidos a estrés. Los datos muestran el límite inferior del bote, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y límite superior. Así como los valores más bajos y altos

De acuerdo a lo observado en el primero y segundo ensayo, al juntar los datos no hay diferencias significativas.

6.5. Cuenta de lactobacilos totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el primer ensayo

En la tabla 5, se observan los datos del primer ensayo de la cuenta bacteriana de lactobacilos a los 7 y 14 días después del tratamiento con agua (Control) y DSS al 3% (DSS 3%).

Tabla 5. Cuenta lactobacilos (UFC/g) del primer ensayo					
Dilución 1:25		Dilución 1:250		Dilución 1:2500	
Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%
7 días					
102739.73	81264.11	445205.48	208803.61	479452.05	112866.82
66124.47	170068.03	77793.49	226757.37	106082.04	566893.42
3546.10	38969.62	2532.93	46235.14	25329.28	0.00
93632.96	98425.20	230961.30	157480.31	405742.82	131233.60
6256.02	1595744.68	7218.48	15957446.81	0.00	159574468.09
17329.26	53782.51	20387.36	41371.16	0.00	118203.31
14 días					
5319.15	3221.01	523731.59	743310.21	41227.50	25282.46
2659.24	7369.61	87579.62	1077097.51	39840.76	57278.91
4321.81	4293.26	369015.96	452443.86	33324.47	33104.36
334.67	3378.38	0.00	231288.98	33467.20	26195.43
337.38	-16.36	0.00	0.00	33738.19	-1636.13
4656.16	4558.20	193409.74	1051893.41	35916.91	35918.65

Datos en UFC/g de la cuenta bacteriana de lactobacilos sembrada en medio MRS

La representación gráfica de los datos observados en la Tabla 4 se observan en la Figura 5. Donde de acuerdo al resultado de la prueba de normalidad se analizó por prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis.

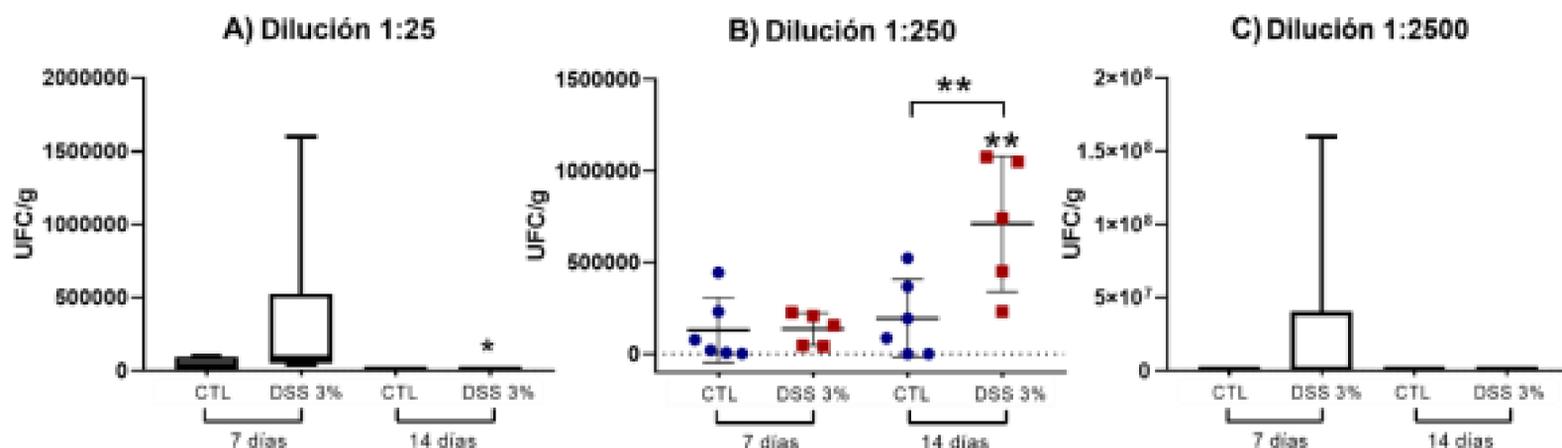


Figura 5. Cuenta de lactobacilos (UFC/g) del primer ensayo. *p=0.0115 (figura 5A) y **p=0.0049 (Figura 5B) versus DSS 7 días. **p=0.0084 (Figura 5B) sobre línea DSS 3% 14 días versus control (CTL) 14 días. La figura 6A y 6C se observa Los datos muestran el límite inferior del bote, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y límite superior. Así como los valores más bajos y altos. Mientras que la figura 6B se observa media y desviación estándar

En el primer ensayo, de la cuenta de lactobacilos, se observó un aumento significativo en el grupo tratado con DSS a los 14 días en comparación con el grupo tratado a 7 días (Figura 5B). El aumento de lactobacilos en el tracto digestivo puede presentarse como un mecanismo de recuperación del mismo organismo ante el daño causado por el tratamiento. Esta diferencia en el aumento puede confirmarse al observar la cuenta de lactobacilos con el tratamiento de DSS al 3% a los 14 días con su respectivo control a 14 días.

De igual manera tenemos una diferencia en la disminución de la presencia de lactobacilos en el grupo tratado con DSS al 3% a los 14 días (Figura 5A), sin embargo, esta dilución puede dar errores por su concentración muy alta, por lo que no se toma en cuenta.

6.6. Cuenta de lactobacilos totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el segundo ensayo

La Tabla 6 contiene los datos del segundo ensayo, obtenidos a través de la cuenta bacteriana de lactobacilos a los 7 y 14 días después del tratamiento con agua (control) y DSS al 3%.

Tabla 6. Cuenta lactobacilos (UFC/g) del segundo ensayo					
Dilución 1:25		Dilución 1:250		Dilución 1:2500	
Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%
7 días					
164113.79	97911.23	1542669.58	979112.27	2735229.76	848563.97
123558.48	219941.35	1235584.84	469208.21	4242174.63	806451.61
87924.97	101078.17	879249.71	822102.43	4513481.83	909703.50
111773.47	127118.64	886736.21	355932.20	2533532.04	1144067.80
112443.78	137614.68	1124437.78	311926.61	2511244.38	183486.24
85130.53	207182.32	851305.33	690607.73	2099886.49	483425.41
109970.674	135135.135	766129.032	337837.838	2309384.16	2297297.297
78781.5126	105189.341	420168.067	333099.579	315126.05	666199.1585
14 días					
127986.348	115384.615	1279863.48	1153846.15	3242320.82	5884615.385
169683.258	85518.8141	1080316.74	855188.141	1187782.81	6128848.347
20965.1899	120385.233	31645.5696	1203852.33	39556.962	12038523.27
106818.182	115448.505	200757.576	361295.681	227272.727	332225.9136
84937.7123	80906.1489	246319.366	172599.784	141562.854	215749.7303
84459.4595	52119.5274	844594.595	90340.5142	1323198.2	69492.70327
72815.534	52521.0084	203883.495	94537.8151	339805.825	87535.01401
98342.9395	100000	154899.135	273333.333	0	333333.3333

Datos en UFC/g de la cuenta de lactobacilos sembrados en medio MRS.

Los datos obtenidos en la tabla 5 de muestran graficados en la Figura 6. De acuerdo a lo obtenido en la prueba de normalidad se analizó por prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis.

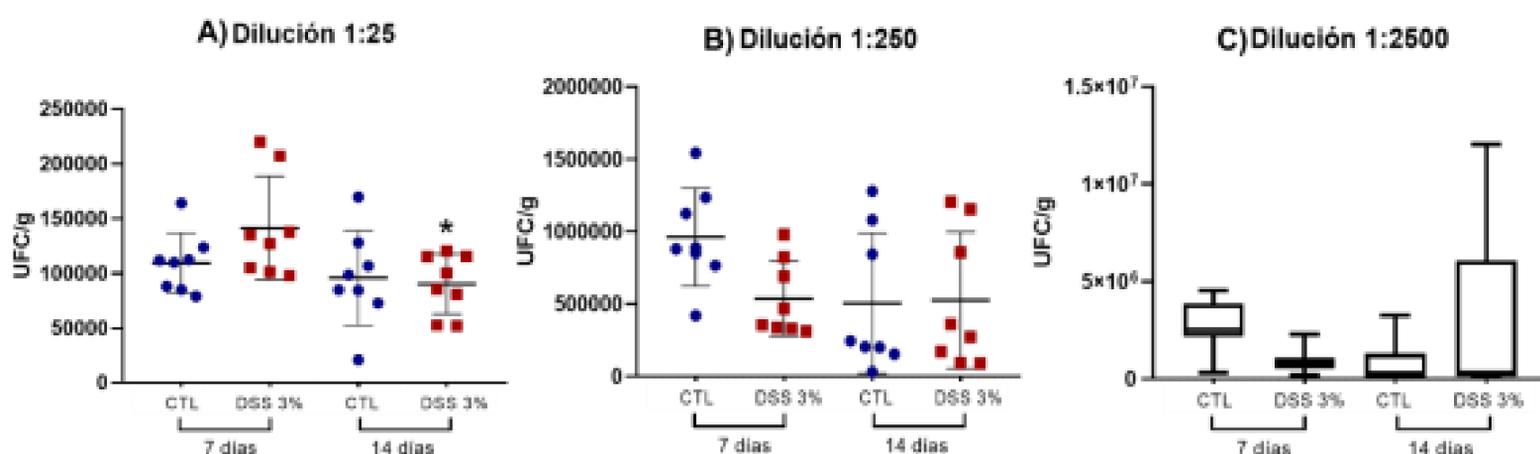


Figura 6. Cuenta de lactobacilos (UFC/g) del segundo ensayo. * $p=0.0492$ (Figura 6A) versus DSS a 7 días. Figura 6A y 6B se muestra media y desviación estándar, mientras que la figura 6C presenta límite inferior del bote, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y límite superior. Así como los valores más bajos y altos.

Para el segundo ensayo solo la dilución 1:25 (Figura 6A) presenta una reducción significativa, sin embargo debido a la concentración no se toma en cuenta por el error que puede presentar.

6.7. Cuenta de lactobacilos totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en el tercer ensayo

Los datos obtenidos de la cuenta bacteriana de lactobacilos totales del tercer ensayo a los 7 y 14 días después de la administración del DSS, en los grupos estresados tratados con agua (Ctl) y DSS 3%, se observan en la Tabla 7.

Tabla 7. Cuenta lactobacilos (UFC/g) del tercer ensayo					
Dilución 1:25		Dilución 1:250		Dilución 1:2500	
Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%	Ctl	DSS 3%
7 días					
105042.02	91463.41	1050420.17	914634.15	2591036.41	1219512.20
128865.98	108695.65	1288659.79	1086956.52	4810996.56	2717391.30
129087.78	65559.44	1290877.80	655594.41	4001721.17	5878496.50
180722.89	70888.47	1807228.92	708884.69	4698795.18	2221172.02
123558.48	72254.34	1235584.84	722543.35	1935749.59	6117533.72
112275.449	145348.84	1122754.49	755813.95	2956586.83	1114341.09
93815.5136	80385.8521	246331.237	803858.521	262054.507	5064308.682
	104311.544		1043115.44		6189151.599
14 días					
202156.334	64766.8394	795148.248	336787.565	1752021.56	820379.9655
77239.9588	358851.675	772399.588	179425.837	720906.282	358851.6746
140186.916	102599.179	439252.336	1025991.79	560747.664	2701778.386
88339.2226	186104.218	397526.502	1401985.11	206124.853	1178660.05
94936.7089	101488.498	268987.342	761163.735	696202.532	981055.4804
139405.204	115207.373	1189591.08	487711.214	3531598.51	268817.2043
71360.6089	92024.5399	713606.089	530674.847	927687.916	92024.53988
	1293103.45		12370689.7		10344827.59

Datos en UFC/g de la cuenta de lactobacilos sembrados en medio MRS.

Los datos obtenidos en la Tabla 6 fueron analizados por prueba de Kruskal-Wallis y representados en la gráfica de caja y bigotes observadas en la Figura 7.

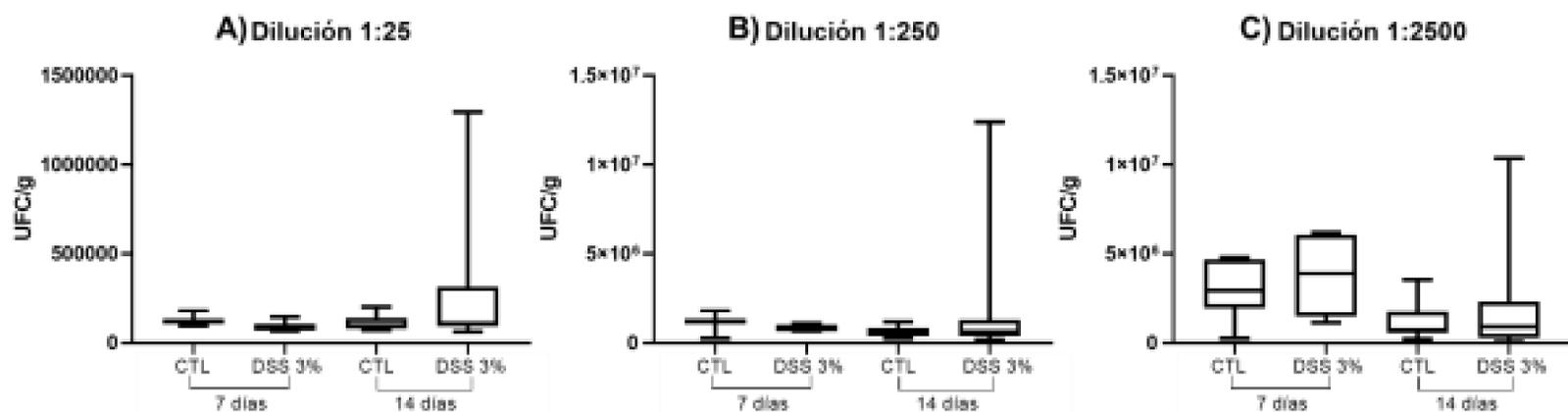


Figura 7. Cuenta lactobacilos (UFC/g) del tercer ensayo (ratones sometidos a estrés). Los datos muestran el límite inferior del bote, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y límite superior. Así como los valores más bajos y altos.

La cuenta de para el tercer ensayo no presentaron diferencias significativas. Si bien los resultados a 14 días de todas las diluciones presentan una gran dispersión creemos que se debería ampliar la n con un duplicado del ensayo.

6.8. Cuenta de lactobacilos totales de ratones tratados con agua y DSS 3% en los ensayos sin estrés

Los datos del conteo de aerobios presentados en la Tabla 4 y Tabla 5 (primero y segundo ensayo), se encuentran graficados en la figura 8, que de acuerdo al resultado de normalidad los datos fueron analizados por prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis.

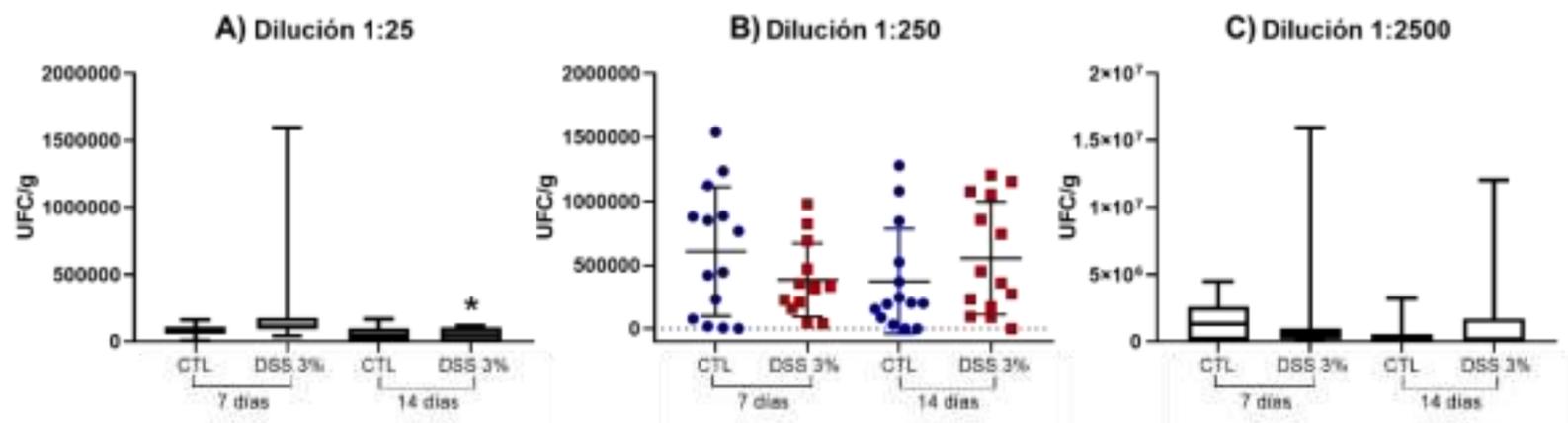


Figura 8. Cuenta de lactobacilos (UFC/g) de las muestras de ratones no sometidos a estrés. * $p=0.0128$ versus DSS 7 días. En las figuras 6A y 6C los datos muestran el límite inferior del bote, primer cuartil, mediana, tercer cuartil y límite superior. Así como los valores más bajos y altos. Mientras que la figura 6B se observa media y desviación estándar.

Al unir los datos de la cuenta de lactobacilos del primer y segundo ensayo (ensayos sin estrés) se pierde el aumento significativo en la dilución 1:250 y, en cambio, se observan una disminución significativa en la dilución 1:25, pero debido a la concentración y la gran dispersión observada puede haber error.

7. CONCLUSION

De acuerdo a los datos, el tratamiento con DSS al 3% no afectó la cuenta de aerobios pero, aparentemente, sí redujo la cuenta de lactobacilos, al menos, en la dilución 1:25. Al parecer, el efecto del DSS sobre la cuenta de aerobios y lactobacilos no fue influido por el estrés. Análisis futuros podrían corroborar estos datos.

8. BIBLIOGRAFIA

- Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 2014 Feb 4;104:15.25.1-15.25.14. doi: 10.1002/0471142735.im1525s104. PMID: 24510619; PMCID: PMC3980572.
- Pandurangan AK, Mohebbali N, Norhaizan ME, Looi CY. Gallic acid attenuates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in BALB/c mice. *Drug Des Devel Ther.* 2015 Jul 30;9:3923-34. doi: 10.2147/DDDT.S86345. PMID: 26251571; PMCID: PMC4524530.
- Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A, van der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro AM, Nyström EE, Wising C, Johansson ME, Hansson GC. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):8-20. doi: 10.1111/imr.12182. PMID: 24942678; PMCID: PMC4281373.. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>.
- Yamamoto-Furusho JK, Bosques-Padilla FJ, Charúa-Guindic L, Cortés-Espinosa T, Miranda-Cordero RM, Saez A, Ledesma-Osorio Y. Inflammatory bowel disease in Mexico: Epidemiology, burden of disease, and treatment trends. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed).* 2020 Jul-Sep;85(3):246-256. English, Spanish. doi: 10.1016/j.rgmx.2019.07.008. Epub 2020 Mar 3. PMID: 32143974.
- Hu, Y., Ye, Z., Wu, M., She, Y., Li, L., Xu, Y., Qin, K., Hu, Z., Yang, M., Lu, F., & Ye, Q. (2021). The Communication Between Intestinal Microbiota and Ulcerative Colitis: An Exploration of Pathogenesis, Animal Models, and Potential Therapeutic Strategies. *Frontiers in medicine*, 8, 766126. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.766126>
- Shen, Z. H., Zhu, C. X., Quan, Y. S., Yang, Z. Y., Wu, S., Luo, W. W., Tan, B., & Wang, X. Y. (2018). Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World journal of gastroenterology*, 24(1), 5–14. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i1.5>
- Hassan AM, Jain P, Reichmann F, Mayerhofer R, Farzi A, Schuligoi R, Holzer P. Repeated predictable stress causes resilience against colitis-induced behavioral changes in mice. *Front Behav Neurosci.* 2014 Nov 6;8:386. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00386. PMID: 25414650; PMCID: PMC4222228.
- Machorro-Rojas, N., Sainz-Espuñes, T., Godínez-Victoria, M., Castañeda-Sánchez, J. I., Campos-Rodríguez, R., Pacheco-Yepez, J., & Drago-Serrano, M. E. (2019). Impact of chronic immobilization stress on parameters of colonic homeostasis in BALB/c mice. *Molecular medicine reports*, 20(3), 2083–2090. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10437>
- Dhabhar F. S. (2009). Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 300–317. <https://doi.org/10.1159/000216188>

- Campos, A. C., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., & Guimarães, F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*, 35 Suppl 2, S101–S111. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1139>
- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista española de enfermedades digestivas*, 107 (11), 686–696. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3846/2015>
- Neish A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65–80. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.080>
- Feichtmayer, J., Deng, L., & Griebler, C. (2017). Antagonistic Microbial Interactions: Contributions and Potential Applications for Controlling Pathogens in the Aquatic Systems. *Frontiers in microbiology*, 8, 2192. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02192>
- Bustos-Fernández, L. M., & Hanna-Jairala, I. (2022). Eje cerebro intestino microbiota. Importancia en la práctica clínica [Brain gut microbiota axis. Importance in clinical practice]. *Revista de gastroenterología del Peru : organo oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Peru*, 42(2), 106–116.
- Yamamoto-Furusho, J. K., Gutiérrez-Grobe, Y., López-Gómez, J. G., Bosques-Padilla, F., Rocha-Ramírez, J. L., & Grupo del Consenso Mexicano de Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (2018). The Mexican consensus on the diagnosis and treatment of ulcerative colitis. Consenso mexicano para el diagnóstico y tratamiento de la colitis ulcerosa crónica idiopática. *Revista de gastroenterología de Mexico (English)*, 83(2), 144–167. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2017.08.006>
- Ciapponi, A., Virgilio, S. A., Berrueta, M., Soto, N. C., Ciganda, Á., Rojas Illanes, M. F., Rubio Martinez, B., Gamba, J., González Salazar, C. A., Rocha Rodríguez, J. N., Scarpellini, B., Bravo Perdomo, A. M., Machnicki, G., Aldunate, L., De Paula, J., & Bardach, A. (2020). Epidemiology of inflammatory bowel disease in Mexico and Colombia: Analysis of health databases, mathematical modelling and a case-series study. *PloS one*, 15(1), e0228256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228256>
- Guilliams, T.G., Edwards, E., (2010) Chronic stress and the HPA axis: Clinical assessment and therapeutic considerations. *The standard, Point institute of nutraceutical research*. 9(2).

9. ANEXOS

9.1. Tabla de pesos de heces

9.2.

Tabla 8. Peso (g) de las heces de ratón.

Muestra	Tratamiento	1° ensayo		2° ensayo	
		7 días	14 días	7 días	14 días
1	agua	0.0730	0.0611	0.0457	0.0586
2	agua	0.0707	0.0628	0.0607	0.0442
3	agua	0.0987	0.0752	0.0853	0.0632
4	agua	0.0801	0.0747	0.0671	0.0660
5	agua	0.1039	0.0741	0.0667	0.0883
6	agua	0.0981	0.0698	0.0881	0.0888
7	agua	--	--	0.0682	0.1030
8	agua	--	--	0.0952	0.0694
1	DSS al 3%	0.0886	0.1009	0.0766	0.0650
2	DSS al 3%	0.0441	0.0000	0.0341	0.0877
3	DSS al 3%	0.0757	0.0000	0.0742	0.0623
4	DSS al 3%	0.0762	0.0962	0.0590	0.0602
5	DSS al 3%	0.0047	0.0000	0.0545	0.0927
6	DSS al 3%	0.0423	0.0713	0.0362	0.1439
7	DSS al 3%	--	--	0.0185	0.1428
8	DSS al 3%	--	--	0.0713	0.0750

Tabla 9. Peso (g) de las heces de ratón del 3° ensayo

Muestra	Tratamiento	7 días	14 días
1	agua + estrés	0.0714	0.0371
2	agua + estrés	0.0582	0.0971
3	agua + estrés	0.0000	0.0000
4	agua + estrés	0.0581	0.0535
5	agua + estrés	0.0415	0.0849
6	agua + estrés	0.0607	0.0790
7	agua + estrés	0.0668	0.0538
8	agua + estrés	0.0477	0.1051
1	DSS al 3% + estrés	0.0820	0.1158
2	DSS al 3% + estrés	0.0690	0.0209
3	DSS al 3% + estrés	0.1144	0.0731
4	DSS al 3% + estrés	0.1058	0.0403
5	DSS al 3% + estrés	0.1038	0.0739
6	DSS al 3% + estrés	0.0516	0.0651
7	DSS al 3% + estrés	0.0933	0.0815
8	DSS al 3% + estrés	0.0719	0.0058

9.2 reparación de medios de cultivo

9.2.1 Caldo tioglicolato

Se pesó 14.25g del medio deshidratado, para posteriormente agregarlos a un matraz Erlenmeyer con 500mL de agua destilada.

Se llevó a ebullición, con agitación constante, hasta dilución.

Se colocó en tubos de centrifuga y esterilizó en autoclave durante 15 minutos. Una vez enfriados los medios se dejó en refrigeración.

9.2.2. Agar soya triptocaseina (TSA)

Se pesa 33.5g del medio deshidratado para colocarse en un matraz Erlenmeyer con 500mL de agua destilada.

Se llevo a parrilla y calentó a ebullición, con agitación constante, hasta obtener la dilución total del medio.

Posteriormente se esterilizó en autoclave por un periodo de 15 minutos.

Mientras el medio se enfría, hasta un manejo más seguro, se preparan las placas de Petri, debidamente rotuladas, para cada dilución.

El plaqueo se llevó a cabo en campana de extracción evitando la formación de burbujas y sin rebasar el límite marcado.

Esperar que el medio solidifique y cerrar las cajas con cuidado, dejándolas boca a bajo

9.2.3. Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS)

Se pesa 20g del medio deshidratado para colocarse en un matraz Erlenmeyer con 500mL de agua destilada.

Se llevo a parrilla y calentó a ebullición, con agitación constante, hasta obtener la dilución total del medio.

Posteriormente se esterilizó en autoclave por un periodo de 15 minutos.

Mientras el medio se enfría, hasta un manejo más seguro, se preparan las placas de Petri, debidamente rotuladas, para cada dilución.

El plaqueo se llevó a cabo en campana de extracción evitando la formación de burbujas y sin rebasar el límite marcado.

Esperar que el medio solidifique y cerrar las cajas con cuidado, dejándolas boca a bajo

9.3. Materiales

- Autoclave AESA Mod. CV 250, Los Reyes Acozac Estado de México
- Microcentrifuga Corning | LSE MOD. LSE 6765-H5, New York U.S.A.
- Vortex Genie 2 Mod. G560, New York, U.S.A

- Campana de flujo laminar vertical ECO Mod. VT-300-ECO, Minnesota, USA
- Incubadora ANA 43x30.5x43 cm
- Balanza Analítica CESLAB Mod. CE-FA2204N, Jalisco México
- Agar Trypticaseína de soya (TSA) cat. no. 1025-E Dibico Cuautitlán Izcalli, Estado de México
- Agar De Man Rogosa y Sharpe (MRS) cat. no. 1267-E Cuautitlán Izcalli, Estado de México
- Agar Base TOS-Propionato cat. no. 1.00043.0500 Millipore Darmstadt Germany
- Suplemento Litio Mupirocina (MUP) cat. no. 1.00045.0010 Millipore Darmstadt Germany
- Caldo Tioglicolato (NIH) cat. no. 211721 Cuautitlán Izcalli, Estado de México
- Sistema de contendor anaerobio GasPak, Becton Dickinson (BD) cat. no. 260678, U.S.A.
- Tiras indicadoras anaeróbicas secas, Becton Dickinson (BD) cat. no. 271051 Sonora México