



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE NUTRICIÓN

**“EVALUACIÓN DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PRESENCIA DE FRUCTANOS
COMERCIALES ORIGINARIOS DE AGAVE”**

TESIS

Que para obtener el título de:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN

P R E S E N T A:

L.N. MARY CARMEN CITLALLY CONDADO HUERTA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. América Ivette Barrera Molina

CODIRECTORA:

Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

COMITÉ TUTORAL

Dra. Haydee Martínez Plascencia

Dr. Heriberto Manuel Rivera

Dr. Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla

CUERNAVACA, MORELOS

2022

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto. A la Facultad de Nutrición, Facultad de Medicina de la UAEM y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias por brindar el espacio necesario para llevar a cabo este proyecto.

En especial a mi directora de tesis la Dra. Ivette Barrera Molina por el apoyo incondicional y por incursionarme en el maravilloso mundo de la investigación, a mi comité tutorial Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica, Dra. Haydee Martínez Plascencia, Dr. Heriberto Manuel Rivera y el Dr. Rodolfo Esteban Lagunes Quintanilla, a la Dra. Vanessa López Guerrero por proporcionarme un espacio en su laboratorio, a mi comité revisor la Dra. Guillermina Ávila Ramírez y la Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez, y a todas las personas que colaboraron en la orientación, seguimiento y supervisión del presente proyecto.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi razón de existir: Mi familia, en especial a mis padres Amador y Eulalia, mis hermanos Francisco, Carlos y su familia, y a mi abuelita Carmen por el apoyo incondicional y la motivación para la realización de mis metas.

Gracias a Dios por su infinita bondad, que me acompaña y me da fuerzas todos los días.

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecen al grupo de microorganismos “seguros” o GRAS y son considerados probióticos ya que se ha demostrado su efecto beneficioso sobre la microbiota intestinal y su tratamiento en la obesidad. Uno de los principales mecanismos de colonización y supervivencia de las bacterias es la producción de biopelículas y la utilización de prebióticos como sustrato para lograr un equilibrio de la microbiota intestinal, sin embargo, los experimentos *in vitro* sobre la formación de biopelícula por BAL en presencia de prebióticos son muy limitados. **Objetivo:** Evaluar *in vitro* la formación de biopelículas de un consorcio de bacterias ácido-lácticas en presencia de fructanos comerciales originarios de agave. **Materiales y métodos:** El consorcio microbiano fue compuesto por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, se utilizó como sustrato prebiótico fructanos comerciales originarios de agave en diferentes concentraciones y se evaluó la formación de biopelícula cuantitativamente mediante densidad óptica y cualitativamente mediante tinción simple con violeta de genciana. **Conclusiones:** Se determinó estadísticamente que la adición de 0.1% de fructanos comerciales originarios de agave adicionados a un medio de cultivo MRS inoculado por BAL estimula significativamente la formación de biopelícula bacteriana de tipo fuerte.

Palabras clave: Biopelícula, Bacterias ácido lácticas, fructanos

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are included with in the group of "safe" microorganisms or GRAS and are considered probiotics since their beneficial effect on the intestinal microbiota and their treatment in obesity has been demonstrated. One of the main mechanisms of colonization and survival of bacteria is the production of biofilms and the use of prebiotics as a substrate to achieve a balance of the intestinal microbiota, however *in vitro* experiments on the formation of biofilm by BAL in the presence of prebiotics are very limited. **Objective:** To evaluate *in vitro* the formation of biofilms of a consortium of lactic acid bacteria in the presence of commercial fructans originating in agave. **Materials and methods:** The microbial consortium was composed of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, were used as prebiotic substrate fructans originating from agave in different concentrations and the formation of biofilm was evaluated quantitatively by optical density and qualitatively by simple staining with gentian violet. **Conclusions:** It was statistically determined that the addition of 0.1% of commercial fructans originating from agave added to an MRS culture medium inoculated by BAL significantly stimulates the formation of strong bacterial biofilm.

Keywords: Biofilm, lactic acid bacteria, fructans

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	IX
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades de las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT).....	2
1.1.1 Obesidad	2
5	
1.1.3 Obesidad y microbiota intestinal	6
1.2 Microbiota intestinal	7
1.2.1 Funciones de la microbiota intestinal.....	10
1.2.2 Eubiosis y Disbiosis	11
1.3 Probióticos	15
1.3.1 Mecanismo de acción de los probióticos	20
1.4 Bacterias ácido lácticas.....	21
1.5 Biopelículas	26
1.5.1 Clasificación de exopolisacáridos	28
1.5.2 Homopolisacáridos	28
1.5.3 Heteropolisacáridos	29
1.5.4 Sistema de comunicación: Quorum sensing	31
1.6 Prebióticos.....	32
1.6.1 Fructanos	36
1.6.2 Fructanos de agave	37
2 JUSTIFICACIÓN.....	40
3 HIPÓTESIS	41
4 OBJETIVOS.....	41

4.1	Objetivo general	41
4.2	Objetivos específicos	41
5	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	42
5.1	Diseño de estudio	42
5.2	Población de estudio	42
5.3	Instrumento de investigación	43
5.4	Estudios preliminares.....	43
5.4.1	Preparación de las concentraciones de fructanos comerciales originarios de agave (FCOA).....	43
5.4.2	Activación de bacterias ácido lácticas (BAL).....	43
5.4.3	Caracterización morfológica y bioquímica de las colonias obtenidas	44
5.4.4	Criopreservación del consorcio microbiano.....	46
5.4.5	Reactivación de las cepas	46
5.4.6	Crecimiento del consorcio de bacterias ácido lácticas en presencia de prebiótico	46
5.5	Métodos para el estudio de formación de biopelícula.....	47
5.5.1	Inducción de la formación de biopelículas en placa de microtitulación	47
5.5.2	Evaluación fenotípico cualitativo de la formación de Biopelículas por BAL en presencia de prebiótico en tubos de cristal	50
5.5.1	Determinación de las características morfológicas de biopelículas formadas utilizando microscopía óptica	51
5.6	Diseño de análisis estadístico	52
6	RESULTADOS	53
6.1	Estudios preliminares.....	53
6.1.1	Caracterización macro, micromorfológicamente y bioquímicamente de un consorcio de BAL.....	53
6.1.2	Crecimiento de BAL en presencia de prebiótico	54
6.2	Densidades ópticas del crecimiento de BAL en presencia de FCOA en 69 h de incubación	56
6.3	Cuantificación de biopelícula.....	58
6.3.1	Clasificación de la formación de biopelícula por BAL en presencia de FCOA	61

6.3.2	Evaluación fenotípica cualitativa de la formación de Biopelículas por BAL en presencia de prebiótico en tubos de cristal	64
6.3.3	Determinación de las características morfológicas de biopelículas formadas utilizando microscopía óptica	68
7	DISCUSIÓN	71
8	CONCLUSIÓN	76
9	PERSPECTIVAS	77
10	REFERENCIAS	78
		89
		¡Error! Marcador no definido.
		¡Error! Marcador no definido.
		94
		¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores que se relacionan con la obesidad	3
Figura 2. Complicaciones de la obesidad y la expansión del tejido adiposo.....	5
Figura 3. Evolución de la microbiota intestinal con la edad.....	9
Figura 4. Factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal.....	9
Figura 5. Anatomía y componentes de la barrera intestinal.....	14
Figura 6. Mecanismos de actividad de los probióticos.....	21
Figura 7. Clasificación según la forma de bacterias ácido lácticas.....	22
Figura 8. Vías metabólicas en la fermentación de hexosas por bacterias ácido lácticas.....	24
Figura 10. Rutas metabólicas de fermentación de azúcares y síntesis de EPS en BAL.....	30
Figura 11. Mecanismos de acción de los probióticos y prebióticos en humanos	35
Figura 12. Estructura química de fructanos tipo inulina.....	38
Figura 13. Caracterización morfológica y bioquímica observada en una muestra liofilizada del consorcio de BAL	53
Figura 14. Muestras de fermentación de lactosa por el consorcio de bacterias ácido lácticas (BA) durante	54

Figura 15. Crecimiento del consorcio de bacterias ácido lácticas (media \pm DE).....	57
Figura 17. Formación de biopelícula	60
Figura 18. Adhesión y formación de biopelícula sobre tubos de ensayo de vidrio	66
Figura 19. Viabilidad del consorcio bacteriano	67
Figura 20. Adhesión y formación positiva de biopelícula sobre portaobjetos.....	68
Figura 21. Observación microscópica.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de la microbiota intestinal	10
Tabla 2. Definiciones de probióticos, prebióticos, simbióticos, BAL y fermentación.....	16
Tabla 3. Principales probióticos, prebióticos y simbióticos empleados en estudios clínicos	17
Tabla 4. Evidencia clínica de probióticos y obesidad	20
Figura 9. Etapas de formación de biopelículas sobre un sustrato	27
Tabla 5. Componentes nutricionales en 15 g inulina Organic agave inulin	37
Tabla 6. Consorcio bacteriano	42
Tabla 7. Clasificación de la formación de biopelículas basada en la densidad óptica medida a 540 _{nm} (Manijeh, et al., 2009)	50
Crecimiento de bacterias ácido lácticas	55
Tabla 9. Clasificación semicuantitativa de la capacidad de formación de biopelícula de BAL	62
Tabla 10. Clasificación de formación de biopelícula.....	63

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AMPs	Péptidos antimicrobianos
ATP	Adenosín Trifosfato
BAL	Bacterias ácido lácticas
CPS	Polisacáridos Capsulares
DM	Diabetes Mellitus
DO	Densidad óptica
ECNT	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EMP	Emden-Meyerhoff-Parnass
EPS	Polisacáridos Extracelulares
EVC	Enfermedad Cerebrovascular
g	Gramos
GC	Guanina y Citocina

GP	Grado de Polimerización
GRAS	Generally Recognized As Safe
HC	Hidratos de carbono
HOPS	Homopolisacáridos
HEPS	Heteropolisacáridos
ICC	Insuficiencia Cardíaca Congestiva
IMC	Índice de Masa Corporal
IUB-IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Lip	Lípidos
MI	Microbiota Intestinal
MRS	Man Rogosa Sharpe
nm	Nanómetro
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
Prot	Proteína
QS	Quorum Sensing
rpm	Revoluciones Por Minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

1 INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) son afecciones que dan como resultado consecuencias para la salud a largo plazo (1), la obesidad es considerada la más frecuente, las causas son multifactoriales incluyendo la inactividad física y los malos hábitos alimentarios (2), éste último está asociado a un desequilibrio en la microbiota intestinal (MI) ya que se ha comprobado que constituye un factor ambiental determinante en su desarrollo (3). La MI es una comunidad microbiana compleja y de gran diversidad, el mayor número se localiza en la porción distal del tubo digestivo, en el colon (4) presenta un predominio de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, que representan entre el 90 al 99%, en humanos y ratones, la cual varía en distintas enfermedades(5). Existen diversos métodos para modificar y restaurar la MI, entre ellos añadir microorganismos nuevos denominados probióticos, la mayoría de las cepas que se emplean son las bacterias ácido lácticas (BAL) particularmente el género de *Lactobacillus*; y el consumo de prebióticos como los fructanos, en su conjunto forman un simbiótico lo cual proporciona beneficios a la salud. Para que las BAL permanezcan el tiempo suficiente para realizar sus funciones a nivel intestinal es importante que desarrollen un método de supervivencia denominado biopelícula, la cual está compuesto por sustancias poliméricas extracelulares denominadas exopolisacáricos (EPS) que ellas mismas producen, el rendimiento total de estos depende de la composición del medio principalmente por la calidad nutricional del medioambiente.

1.1 Generalidades de las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT)

La OMS define a las ECNT como afecciones de larga duración con una progresión generalmente lenta. Entre ellas destacan: Las enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, los infartos de miocardio o accidentes cerebrovasculares); el cáncer; las enfermedades respiratorias crónicas (por ejemplo, la neumopatía obstructiva crónica o el asma); y la diabetes. Son uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud debido a diversos factores como: El gran número de casos afectados, su creciente contribución a la mortalidad, la conformación en la causa más frecuente de incapacidad prematura y la complejidad y costo elevado de su tratamiento (1). Los decesos son consecuencia de un proceso iniciado décadas antes (6). La evolución natural de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares puede modificarse con acciones que cambien el curso clínico de las condiciones que determinan su incidencia (7–11), entre las cuales se encuentran el sobrepeso y la obesidad (7).

1.1.1 Obesidad

La obesidad es un problema de salud mundial, de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2017 para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad, se define como una enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo que puede ser perjudicial para la salud, la cual es una condición multifactorial y multicausal, que se relaciona con la susceptibilidad genética, con trastornos psicológicos, sociales y metabólicos (Figura 1) (12,13); la Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad como uno de

los principales factores de riesgo metabólicos modificable para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como la diabetes mellitus (DM) II y las enfermedades cardiovasculares (2).

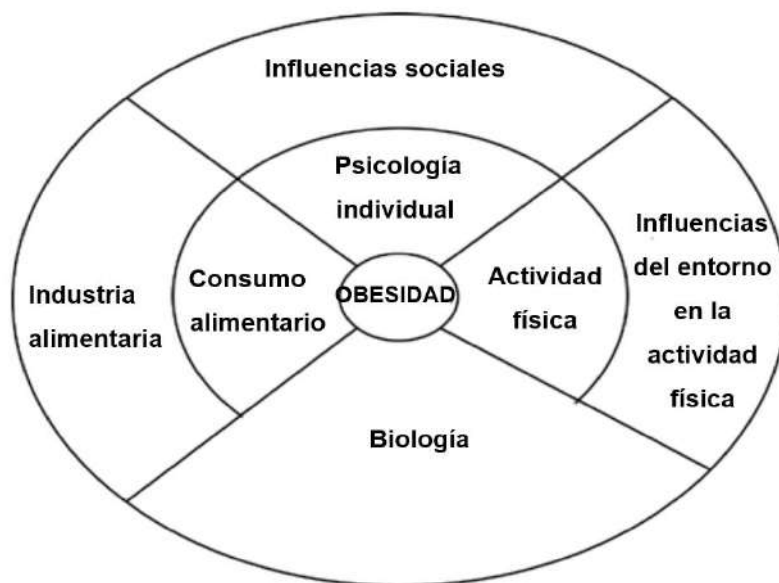


Figura 1. Factores que se relacionan con la obesidad: Susceptibilidad genética, trastornos psicológicos, sociales y metabólicos. Modificada del “Foresight Obesity System Map” (Government Office for Science UK, 2007).

Actualmente, los datos de la UNICEF arrojan que México ocupa el primer lugar mundial en obesidad infantil, y el segundo en obesidad en adultos. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 (ENSANUT) reporta que de acuerdo con los puntos de corte de índice de masa corporal (IMC) (kg/m²) propuestos por la OMS, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en México de la población de 0 a 4 años es del 8.2% y el 22.2% se identifica con riesgo de sobrepeso, de 5 a 11 años es del 35.6%, de 12 a 19 años es del 41.1% en mujeres y del 35.8% en hombres y de 20 años en adelante es de 76.8% para mujeres y 73% para hombres.

Recientemente, Pasca y Montero (14) han ido más allá y definen la obesidad como una enfermedad sistémica, multiorgánica, metabólica e inflamatoria crónica, multideterminada por la interrelación entre lo genómico y lo ambiental, fenotípicamente expresada por una acumulación de grasa aumentada debido a un balance energético positivo continuo (en relación con la suficiencia del organismo para alojarla) por lo que el peso corporal y la acumulación de grasa aumentan, que conlleva un mayor riesgo de morbimortalidad, algunos individuos pueden aumentar los depósitos de tejido adiposo tanto por el aumento del tamaño (hipertrofia), como del número de adipocitos (hiperplasia), asociada a una función normal del tejido adiposo. Sin embargo, las personas con obesidad suelen responder al balance energético positivo con la hipertrofia de sus adipocitos, frecuentemente asociada con factores patógenos que causan deterioro de la función del tejido adiposo, desarrollando una inflamación de este, y contribuyendo al daño de órganos secundarios a través de las señales adversas producidas en el tejido adiposo (Figura 2). Tal definición apunta más a una consideración clínica que anatómica, sin dejar de tener en cuenta los indicadores antropométricos de riesgo.

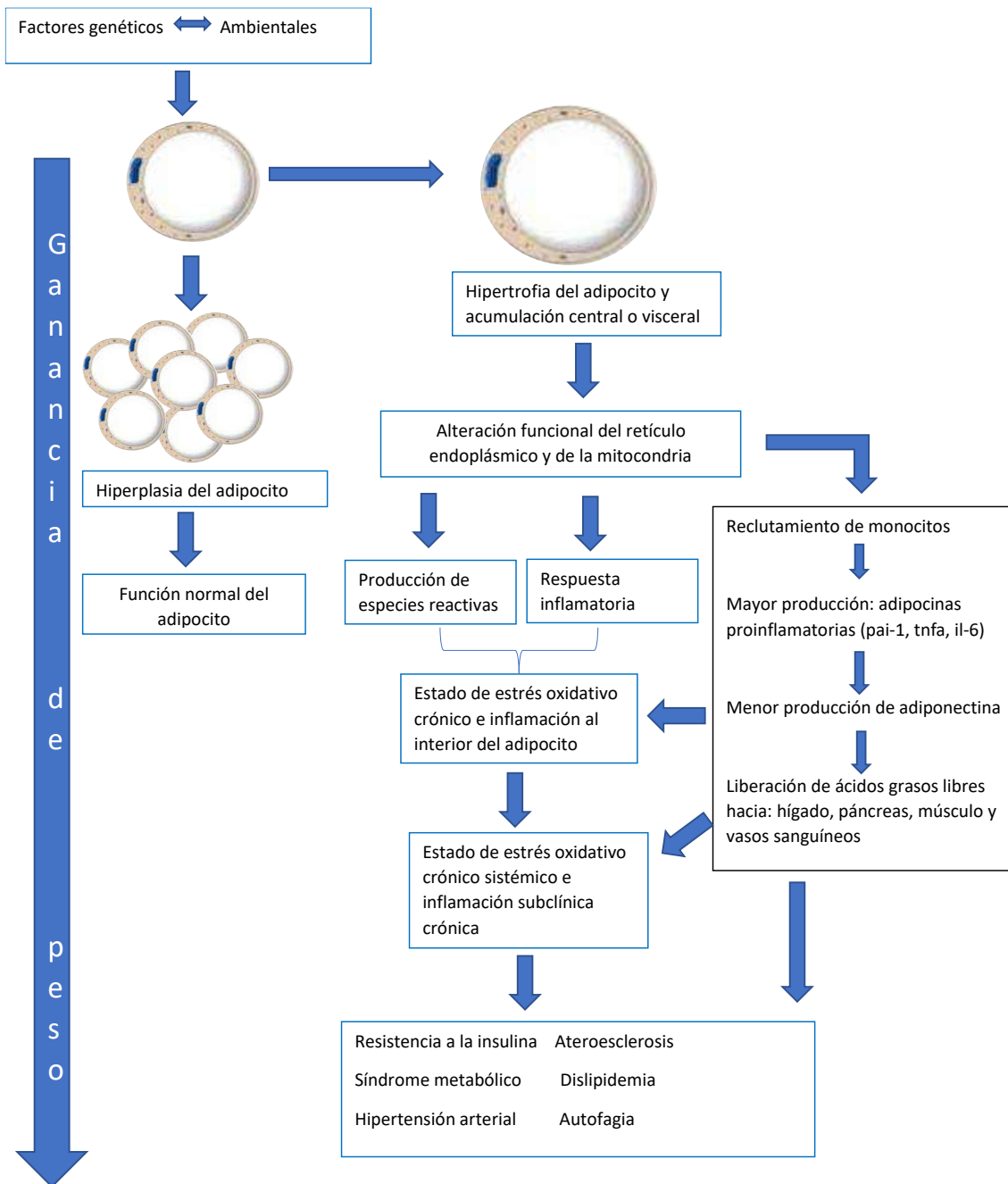


Figura 2. Complicaciones de la obesidad y la expansión del tejido adiposo. Con un balance energético positivo continuo, el peso corporal y la acumulación de grasa aumentan. Probablemente debido a factores genéticos y ambientales y su interacción con otros individuos. (Adaptado por Carmona, Sánchez y González, 2017 de Klöting y Blüher, 2014)

Comúnmente está relacionado directamente con factores dietéticos-nutricionales y el sedentarismo (12), esto se debe al resultado de un balance positivo y crónico de energía superior al gasto energético (15).

Las causas inmediatas son influenciadas por causas subyacentes como la alta disponibilidad y accesibilidad de alimentos con elevada densidad energética y bebidas azucaradas, el mercadeo masivo de alimentos procesados; otro factor subyacente reconocido es la pérdida de la cultura alimentaria tradicional, causada por diversas razones, incluyendo el tiempo limitado para la compra, selección y preparación de alimentos, así como la publicidad de alimentos y bebidas procesados que ha acompañado el fenómeno de la globalización (16).

1.1.3 Obesidad y microbiota intestinal

Algunos estudios han indicado que una microbiota intestinal alterada está asociada con varias enfermedades que son particularmente prevalentes en el siglo XXI. Por ejemplo, diversidad microbiana reducida, un signo de un ecosistema disfuncional que conduce a una estabilidad disminuida de la microbiota, se ha asociado tanto con la enfermedad inflamatoria intestinal como con la obesidad. Según lo han demostrado recientes estudios, la obesidad no es únicamente el resultado de la contribución genética, los hábitos alimentarios o la falta de actividad física. También, se ha comprobado que la microbiota intestinal (MI) constituye un factor ambiental determinante en su desarrollo. Esta hipótesis nace de la observación de que pacientes con obesidad presentan una microbiota intestinal distinta a la de individuos normo peso (3), han demostrado

que el número de *Firmicutes* se incrementó mientras que el número de *Bacteroidetes* estaba reducido en ratones y humanos con obesidad, y se explica dado que esta alteración de la microbiota tendría repercusiones en la extracción energética de los alimentos, el metabolismo de ácidos grasos, la síntesis de hormonas intestinales involucradas en la homeostasis energética y la regulación de los depósitos corporales de tejido adiposo (17).

1.2 Microbiota intestinal

El cuerpo hospeda una comunidad microbiana compleja llamada microbiota la cual hace referencia a una comunidad de microorganismos vivos reunidos en un nicho ecológico determinado, estos ecosistemas microbianos se encuentran en el tracto gastrointestinal, genitourinario, respiratorio, cavidad oral, nasofaríngea, y la piel. En general la microbiota se describe según Matthew R. como “comunidades de microorganismos que habitan en forma estable en un sitio anatómico y que interaccionan entre sí, autorregulando su concentración numérica y dinámica metabólica, la que puede influir en el estado de salud o enfermedad del huésped” (18)

El intestino hospeda una comunidad microbiana compleja y de gran diversidad denominada microbiota intestinal (MI), el mayor número se localiza en la porción distal del tubo digestivo, en el colon (4); la cual desarrolla una interacción estrecha con la mucosa intestinal y los mecanismos de defensa del sistema inmune del ser humano, tanto en condiciones saludables como de enfermedad. La MI es heterogénea y constituye cerca de 10^{14} células microbianas, aunque también están presentes virus (5,8 %), arqueas (0.8 %) y eucariotas (0.5 %) (19). El ecosistema microbiano del intestino incluye especies nativas que colonizan

permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de microorganismos vivos que transitan temporalmente por el tubo digestivo (20).

El microbioma es el conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos en un nicho ecológico dado. En el microbioma fecal humano se han identificado unos 9,9 millones de genes microbianos (21). El 80% de la MI se clasifica en 3 grandes grupos: Firmicutes (bacterias Gram positivas con bajo contenido de GC), Bacteroidetes (bacterias Gram negativas) y Actinobacteria (bacterias Gram positivas con alto contenido de GC) (22). La microbiota presenta un predominio de Firmicutes y Bacteroidetes, que representan entre el 90 al 99%, en humanos y ratones, la cual varía en distintas enfermedades (5).

Existen diferencias en la MI, tanto en la composición como en el número de microorganismos por especie, proporcionalmente el cuerpo humano está conformado por células humanas solo en un 10% y el restante 90% corresponde a células de origen microbiano, lo que indica la presencia de dos genomas dentro del organismo: El genoma humano, genéticamente heredado de los padres, y el genoma bacteriano, también llamado microbioma, adquirido después del nacimiento (23). Así, el metabolismo global del hospedero es el resultado de estos dos genomas integrados y su interacción con el ambiente (24).

La microbiota intestinal nativa es adquirida desde el nacimiento y juega un papel importante a lo largo de la vida, está influenciada por factores de la forma de nacimiento (parto normal versus cesárea), tipo de alimentación (lactancia materna versus lactancia artificial), tiempo de gestación, peso al nacimiento (normal versus bajo peso y prematuridad), condiciones del medio ambiente y

estilo de vida (países desarrollados respecto a países en vías de desarrollo) (25). La microbiota, comienza a converger gradualmente al final del primer año de vida y se asemeja por completo a la microbiota del adulto a los dos 2 años y medio de edad. A partir de esta etapa predominan *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que en los primeros días tras el nacimiento predominan las *Proteobacterias* y las *Actinobacterias* (Figura 3). Una vez que la microbiota ha alcanzado la madurez influenciada por diversos factores (Figura 4), ésta permanece en su mayor parte estable hasta la vejez, cuando se reduce esta estabilidad (26), estos factores son decisivos para el equilibrio a largo plazo y su repercusión en la aparición de enfermedades intestinales y extraintestinales (25).

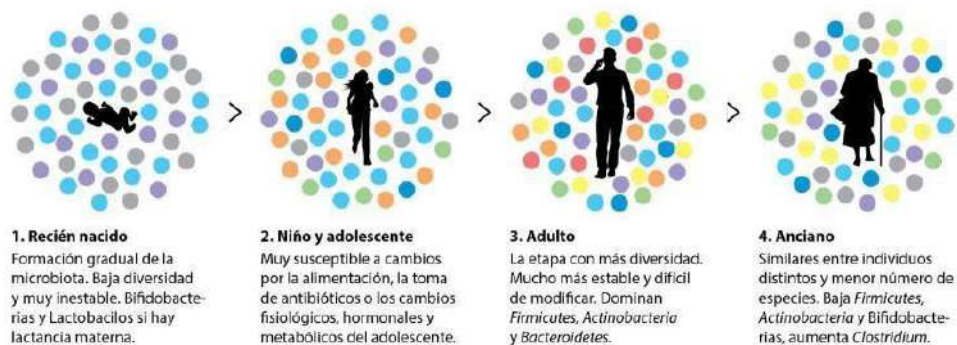


Figura 3. Evolución de la microbiota intestinal con la edad. (Longas H 2018)

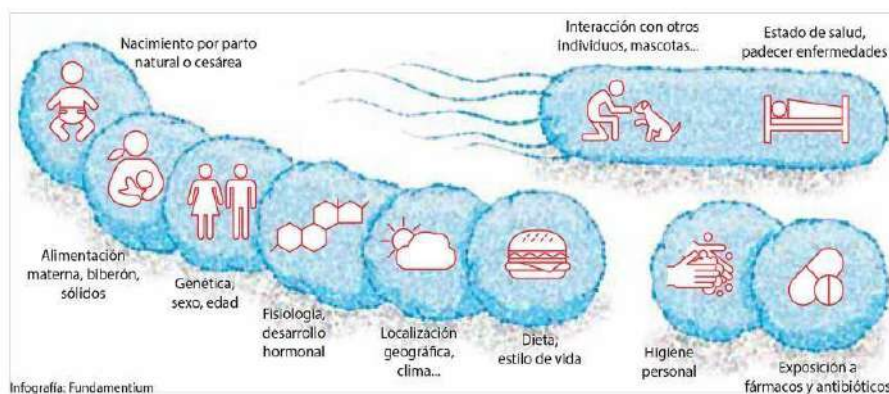


Figura 4. Factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal. (Longas H 2018)

1.2.1 Funciones de la microbiota intestinal

La MI tiene funciones metabólicas, de nutrición, tróficas y de protección contra patógenos (Tabla 1). En condiciones normales, la microbiota intestinal, influye en la estructura anatómica y fisiológica del intestino aumentando la superficie de absorción, promoviendo la renovación de las células de las vellosidades, incrementando el contenido intraluminal y acelerando el tránsito intestinal (24). Además, estos microorganismos desempeñan una amplia variedad de funciones metabólicas; participando en la digestión y obtención de energía mediante la hidrólisis de los componentes de la dieta (glúcidos, proteínas, lípidos) que de otro modo no serían digeribles. Este beneficio se produce porque los componentes de la microbiota son capaces de desplegar de forma adaptativa una gran variedad de glucósidos hidrolasas y polisacáridos lisas que los humanos no codificamos en nuestro genoma (17,27–29), extracción de nutrientes esenciales, síntesis de vitaminas (K, B12, biotina, ácido fólico y pantoténico), y favoreciendo la absorción de diversos minerales como calcio, fósforo, magnesio y hierro (30).

Tabla 1. Funciones de la microbiota intestinal (Castañeda 2014)

Metabolismo y nutrición Fermentación de residuos no digeribles de la dieta y el moco endógeno <ul style="list-style-type: none">• Energía, como ácidos grasos de cadena corta• Producción de vitamina K y ácido fólico• Absorción de iones
Trófica <ul style="list-style-type: none">• Control de la proliferación celular epitelial y su diferenciación• Desarrollo de la homeostasis del sistema inmune
Protección <ul style="list-style-type: none">• Efecto de barrera, protección contra antígenos y patógenos

El equilibrio entre las bacterias nativas proporciona estabilidad a la población microbiana y contribuye a mantener la salud del individuo en circunstancias normales; situaciones que modifiquen la composición microbiana o alteren su homeostasis se asocian con condiciones patológicas (31). Las recientes investigaciones, plantean que una alteración de la microbiota intestinal, podría estar relacionado con la obesidad, definiendo cambios como la pérdida de diversidad y funcionalidad microbiana relacionado a factores dietéticos y el aumento al uso de antibióticos, también si una comunidad microbiana es altamente eficiente en la recuperación de energía de los alimentos puede constituir un factor de riesgo de obesidad en una persona con fácil acceso a los alimentos, mientras que puede ser saludable en un individuo con acceso limitado a los alimentos.

1.2.2 Eubiosis y Disbiosis

Las poblaciones microbianas están sujetas a dos fuertes presiones selectivas como la presión ejercida por la propia microbiota, que tiende a diversificar la genómica microbiana para disminuir la competencia entre ellas, y la ejercida por el huésped que, por el contrario, tiende a homogeneizar los genomas, promoviendo la redundancia funcional. De esta manera, el huésped asegura que las funciones que desempeña la microbiota, importantes para su salud, no están codificadas por una sola especie, sino por diversas especies, evolutivamente distantes. De esta manera, en ocasiones la pérdida de una especie bacteriana no corresponde a la pérdida de la función lograda por la especie perdida. Estas dos presiones selectivas coexisten en un ecosistema sano en perfecto equilibrio

de fuerzas: El exceso de uno de los dos conduciría inevitablemente a un desequilibrio en el ecosistema, favoreciendo la diversidad genómica individual o la redundancia funcional (32).

El término eubiosis se refiere al equilibrio de la microbiota intestinal, en condiciones normales, tiene dos funciones principales en el tracto gastrointestinal: Nutrición, por la digestión y absorción de nutrientes; y defensa, por el desarrollo de sistemas de prevención y rechazo de posibles agresiones de fármacos o microorganismos patógenos, por lo contrario, los principales factores que causan un desequilibrio en la microbiota, llamado disbiosis son los hábitos alimentarios ya que los alimentos no nutritivos, altos en azúcares refinadas, grasas saturadas, etc. pueden desequilibrar la microbiota, ya que pueden ser sustratos selectivos de ciertas bacterias, principalmente bacterias Gram negativas las cuales poseen un componente mayoritario de la membrana externa llamados lipopolisacáridos (LPS), que es uno de los patrones moleculares asociados a patógenos. Estas bacterias pueden causar daño a la barrera epitelial y permitir la translocación de las bacterias y la liberación de los LPS, que al solubilizarse se convierten en un endotoxina, los cuales son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrón, en los que se encuentran la familia de los tipo "Toll", estos patrones moleculares son esenciales para el reconocimiento de los microorganismos por parte de las células de la inmunidad innata, las cuales responden de manera distinta según el microorganismo identificado. Cuando se produce un daño tisular o una infección, el TNF- α desarrolla una acción proinflamatoria, esto puede causar resistencia a la insulina y por consecuencia intolerancia a la glucosa (30,33) .

El intestino es el órgano inmune más grande del cuerpo humano. La función de defensa intestinal involucra tres componentes principales: Microbiota intestinal, el epitelio intestinal y el sistema inmune en el intestino. El sistema inmune en el intestino (el tejido linfoide asociado al intestino, GALT) es integral para la protección del huésped debido a su capacidad de distinguir entre antígenos inofensivos (alimentos, bacterias comensales) y posibles patógenos o sustancias nocivas.

La mucosa intestinal se compone de una monocapa de células epiteliales columnares polarizadas, así como de la región subepitelial que contiene la lámina propia, el sistema nervioso entérico, el tejido conectivo y las capas musculares. Por encima de la barrera epitelial, se encuentra la capa de moco no agitada, que contiene glicocálix, y a continuación la capa de moco agitada, que contiene la microbiota, IgA secretora, mucinas y péptidos antimicrobianos. Los linfocitos intraepiteliales, se encuentran por encima de la membrana basal, subyacentes a la unión estrecha. La lámina propia contiene el tejido linfoide difuso compuesto de macrófagos, células dendríticas, células plasmáticas, linfocitos y, en algunos casos, neutrófilos, y el tejido linfoide organizado, compuesto de estructuras linfoides como la placa de Peyer, que contiene células M, células dendríticas y linfocitos (Figura 5) (34).

La mucosa intestinal está especialmente adaptada para la colonización por bacterias comensales que participan en los procesos digestivos e influyen decisivamente en el desarrollo y la función del sistema inmunitario intestinal (35). Estas dos funciones, digestiva y defensiva, son llevadas a cabo gracias a la peculiar anatomía de la mucosa intestinal y, en particular, de la denominada

“función barrera intestinal” en la que confluyen diferentes mecanismos, inmunológicos y no inmunológicos, que actúan de forma coordinada para asegurar su correcto funcionamiento (36). La alteración en los mecanismos de defensa que componen esta función barrera favorece el paso de sustancias luminales al medio interno, que en condiciones normales serían excluidas, dando lugar al desarrollo de respuestas inmunitarias exageradas que, a su vez, pueden amplificar la disfunción de la barrera y perpetuar el proceso inflamatorio.

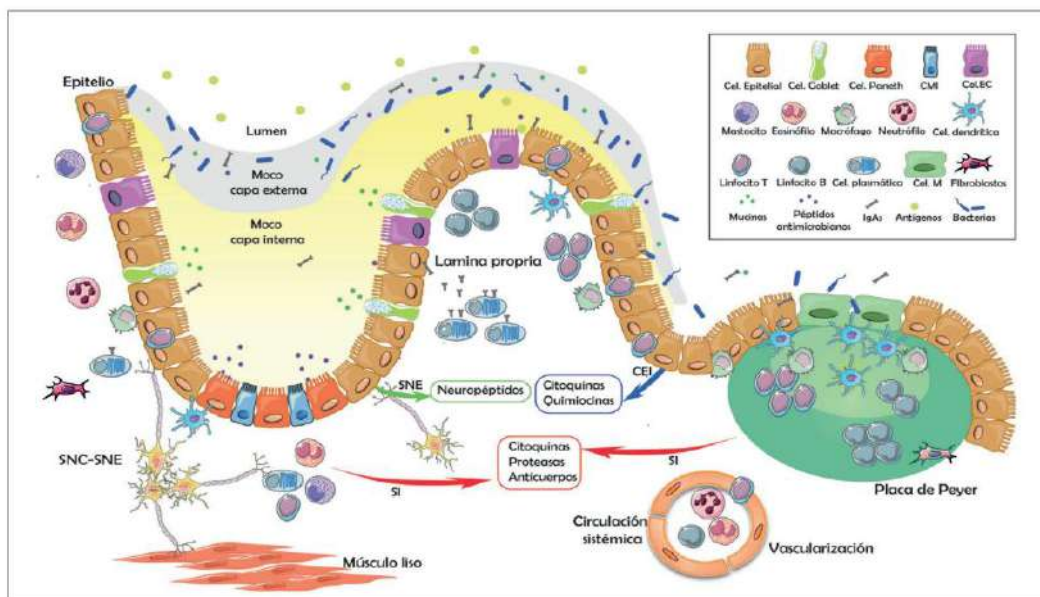


Figura 5. Anatomía y componentes de la barrera intestinal. (SNC: Sistema nervioso central; SNE: Sistema nervioso entérico; SI: Sistema inmunitario; CEI: Célula epitelial intestinal; CMI: Célula madre intestinal; Cel. EC: Célula enterocromafín; IgAs: IgA secretora) (Salvo E, 2015).

1.3 Probióticos

La importancia de los probióticos ha sido evidenciada desde tiempos atrás, hace más de un siglo, Elie Metchnikoff (un científico ruso, premio Nobel, y profesor en el Instituto Pasteur en París), postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) eran beneficiosas para la salud, y capaces de promover la longevidad. Metchnikoff sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal y reemplazando los microbios proteolíticos los cuales producen sustancias tóxicas como fenoles, indoles, y amoníacos derivados de la digestión proteica por microbios útiles, diseñó una dieta con leche fermentada con una bacteria a la que bautizó “Bacilo búlgaro.”

Este concepto siguió evolucionando (Tabla 2), frecuentemente, los trastornos del tracto intestinal eran tratados con bacterias no patogénicas viables para modificar o sustituir la microbiota intestinal. En 1917, antes de que Alexander Fleming descubriera la penicilina, el científico alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patogénica de *Escherichia coli* a partir de las heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial que no presentó enterocolitis durante un brote severo de shigelosis. Esa cepa resultó ser *Escherichia coli* cepa Nissle 1917, y constituye uno de los pocos ejemplos de un probiótico que no es BAL.

Henry Tissier (del Instituto Pasteur) aisló Bifidobacterium de un lactante alimentado a pecho con el objetivo de administrárselo a lactantes que padecieran diarrea. Su hipótesis era que ese germen desplazara a las bacterias proteolíticas que provocaran diarrea.

En Japón, el Dr. Minoru Shirota aisló la cepa *Shirota* de *Lactobacillus casei* para enfrentar los brotes de diarrea. Hoy en día hay un producto probiótico con esta cepa que se comercializa desde 1935 (37). Estos fueron los primeros predecesores en un campo científico que han evolucionado el tratamiento a diferentes patologías a partir del uso de probióticos en el campo clínico.

Recientemente, una búsqueda de ensayos clínicos en humanos en PubMed muestra que se han publicado más de 1500 ensayos sobre probióticos y cerca de 350 sobre prebióticos lo que evidencia información que respalda los beneficios a la salud de los probióticos y prebióticos (Tabla 3).

Tabla 2. Definiciones de probióticos, prebióticos, simbióticos, BAL y fermentación (World Gastroenterology Organization, 2017)

Concepto	Definición de probióticos
Probióticos	Microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud en el huésped.
Prebióticos	Un ingrediente fermentado selectivamente que da lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped.
Simbióticos	Los productos que contienen tanto probióticos como prebióticos, que confieren beneficios a la salud.
Bacterias ácido lácticas (BAL)	Clasificación funcional de bacterias fermentadoras Gram positivas, no patogénicas ni toxigénicas, que se asocian con la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que las hace útiles para la fermentación de alimentos. En este grupo se incluyen las especies de <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , y <i>Streptococcus thermophilus</i> . Muchos probióticos también son BALs, pero algunos probióticos (como ciertas cepas de <i>E. coli</i> , formadoras de esporas, y levaduras usadas como probióticos) no lo son. Proceso
Fermentación	Proceso por el cual un microorganismo transforma los alimentos en otros productos, habitualmente a través de la producción de ácido láctico, etanol, y otros productos finales metabólicos

Tabla 3. Principales probióticos, prebióticos y simbióticos empleados en estudios clínicos

(G. Oliveira, I. González 2016)

<p>Principales probióticos de cepa única empleados en estudios clínicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Saccharomyces boulardii</i> • <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG • <i>Bifidobacterium bifidum</i> • <i>Lactobacillus plantarum</i> 299 • <i>Lactobacillus sporogens</i> • <i>Enterococcus</i> SF68 • <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12 (L) • <i>Lactobacillus reuteri</i> • <i>Lactobacillus casei</i> (L) • <i>Bifidobacterium longum</i> BB 536 (L) • <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA1 • <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (serotipo 06: K5:H1) <p>Principales probióticos de varias cepas empleados en estudios clínicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i> • <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i> • <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium infantis</i> • <i>Bifidobacterium longum</i> BB 536 + <i>L. acidophilus</i> NCFB 1748 (L) • <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 (8812) y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG • <i>Bifidobacterium bifidum</i> + <i>Streptococcus thermophilus</i> • <i>Bifidobacterium lactis</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> (L) • <i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i> + <i>Streptococcus thermophilus</i> (L) • VSL#3: 4 cepas de lactobacilos (<i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Lactobacillus casei</i>, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecie <i>bulgaricus</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i>), 3 cepas de bifidobacterias (<i>Bifidobacterium longum</i>, <i>Bifidobacterium infantis</i>, <i>Bifidobacterium breve</i>) y <i>Streptococcus salivarius</i> subespecie <i>thermophilus</i> • TREVIS: <i>Streptococcus acidophilus</i>, LA5, <i>Bifidobacterium lactis</i> BP12, <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i> • Ecologic 641: 4 Lactobacilos (<i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Lactobacillus casei</i>, <i>Lactobacillus salivarius</i> y <i>Lactococcus lactis</i>) y 2 bifidobacterias (<i>Bifidobacterium bifidum</i> y <i>Bifidobacterium lactis</i>) • Ergyphilus: 10¹⁰ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, <i>Lactobacillus casei</i>, <i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium bifidum</i> • Jinshuangqi: <i>Bifidobacterium longum</i> > 10 UFC, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> >10 UFC y <i>Streptococcus thermophilus</i> >10 UFC <p>Principales prebióticos empleados en estudios clínicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fruto - oligosacáridos (FOS) • Galacto - oligosacáridos (GOS) • Inulina • Trans - galacto - oligosacáridos (TOS) • Beneo Synergy 1 (SYN1): Oligofruktosa - Inulina • Lactulosa • Fibra de avena^a • Cebada germinada (rico en hemicelulosa)^a • Goma guar hidrolizada^a • Almidón resistente^a • <i>Plantago ovata</i>^a • Betaglucano^a • Pectina^a <p>Principales simbióticos empleados en estudios clínicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus plantarum</i> 299 y 10g de fibra de avena • <i>Lactobacillus sporogens</i> + Fruto - oligosacáridos • Synbiotic 2000: 10¹ UFC de cada: <i>Pediococcus pentoseceus</i> 5-33:3, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 32-77:1, <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 19, <i>Lactobacillus plantarum</i> 2362 y 2,5g de cada uno de betaglucanos, inulina, pectina y almidón resistente • Synbiotic 2000 Forte: 10¹ UFC de: <i>Pediococcus pentoseceus</i> 5-33:3, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 32-77:1, <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 19, <i>Lactobacillus plantarum</i> 2362 y 2,5g de cada uno de: Inulina, fibra de avena, pectina y almidón resistente • Oligofruktosa + inulina (SYN1) + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG y <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 • Golden Bifid: <i>Bifidobacterium bifidum</i>, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> con FOS
<p>(L): Son probióticos suministrados en productos lácteos</p> <p>^a No cumplen estrictamente el criterio de prebiótico</p>

La Organización de Alimentos y Agricultura [Food and Agriculture Organization (FAO)] de las Naciones Unidas y la Organización Mundial de la Salud (OMS) consideran a la microbiota bacteriana como probióticos, “microorganismos vivos que proporcionan un beneficio a la salud del hospedador cuando son ingeridos en las cantidades adecuadas”, en la tabla 3 se enlistan los principales probióticos.

Los sitios anatómicos en donde se pueden encontrar los probióticos ingeridos que componen la microbiota gastrointestinal, dependerá de las condiciones nutricionales, pH y otros. En el estómago son menos abundantes, debido al pH ácido, sin embargo, el intestino delgado es menos abundantes, pero más diversa y en el intestino grueso es más abundante en cuanto a cantidad y diversidad de microorganismos gracias al ambiente estable en humedad, temperatura y nutrientes.

Para producir los efectos beneficiosos sobre el huésped los probióticos no necesariamente deben colonizar por un tiempo definido el órgano diana, aunque sí llegar vivos con una cantidad suficiente como para afectar a su micro ecología y metabolismo. Así, la mayoría de cepas probióticas son capaces de llegar al colon vivas (en un porcentaje variable) pasando por todo el tracto gastrointestinal superior, y su viabilidad dependerá de muchos factores: Por un lado, los intrínsecos del probiótico, y por otro, dependientes del huésped, como, por ejemplo, el grado de acidez en el estómago, la longitud de la exposición al ácido, la concentración y la duración de la exposición a las sales biliares y otras (18).

Ley y cols. en 2006, fueron los primeros en demostrar que en personas con obesidad la microbiota intestinal cambia en cuanto a su composición y diversidad; ya que se observó en personas con obesidad un exceso de *Firmicutes* sobre *Bacteroidetes* y que dicha proporción también era superior a la que se daba en los individuos con normo peso. Mientras que en los individuos obesos se vieron incrementados los géneros como *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Campylobacter* y *Staphylococcus*; y en los individuos con normo peso predominaron géneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* y *Akkermansia*.

Este mismo efecto se observó en un estudio realizado por Le Chatelier y cols. en 2013. Otro estudio realizado por Garret Ws. y colaboradores (2015) demostró que la disminución de bacterias productoras de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC) por el consumo de antibióticos promovía la reducción de la barrera intestinal importante para contrarrestar la invasión de microorganismos patógenos, lo que conlleva a procesos de inflamación y afecciones metabólicas como obesidad y diabetes mellitus tipo 2; entre otros.

Una preparación probiótica debe contener un cierto número mínimo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por dosis. Las dosis usadas en terapéutica y prevención varían según los estudios. La ingestión diaria de 10^6 a 10^9 UFC es considerada una dosis efectiva con propósito de tratamiento (38). Un estudio en humanos con obesidad demostró que el uso de probióticos tiene un efecto anti obesogénico. (Tabla 4).

Tabla 4. Evidencia clínica de probióticos y obesidad (Vitteta, 2014)

Pacientes	Tipo (N)	Tratamiento	Duración	Resultados	Ref.
Adultos con tendencia a obesidad	DBPC T (87)	5×10^8 CFU/g <i>L. gasseri</i> SBT2055 UFC/200 g diariamente	12 sem	Red. de grasa abdominal visceral y subcutánea Red. de peso corporal y otras medidas. Inc. Adiponectina de alto peso molecular en suero	Kadooka Y, et al., 2010
Mujeres embarazadas con tendencia a obesidad	DBPC T (159)	1×10^{10} CFU/cap <i>L. rhamnosus</i> GG/o.i.d.	4 sem	Moderación de la fase inicial de la ganancia excesiva de peso de los niños, no de la segunda fase.	Luoto R, et al. 2010
Adultos Obesos	DBPC T (75)	$\times 10^8$ CFU/mL <i>L. acidophilus</i> La5/ 1×10^8 CFU/mL <i>B. BB12</i> / 1×10^8 CFU/mL <i>L. casei</i> DN001/o.i.d.	8 sem	Red. Expresión del gen T-bet	Zarrati M, et al., 2013
Niños con sobrepeso y obesidad	TBPC T (70)	2.0×10^8 CFU multiple probiotics with prebiotics (fructooligosaccharides), Vitamin E, Vitamin A and Vitamin C/o.i.d	8 sem	Red. Triglicéridos séricos, y de niveles totales y de lipoproteína de baja densidad de colesterol	Safavi M, et al., 2013

RCT: Randomized Controlled Trial; DBPC: double blind placebo controlled trial; TBPC: triple blind placebo controlled trial

b.i.d.: 2 al día
o.i.d.: 1 al día

Vitteta, 2014

1.3.1 Mecanismo de acción de los probióticos

El consenso de la asociación científica internacional sobre probióticos y prebióticos recoge una serie de posibles mecanismos de acción, desde algunos muy comunes a la mayoría de los probióticos estudiados como las bacterias ácido lácticas, hasta otros muy raros específicos de algunas cepas (Figura 6).

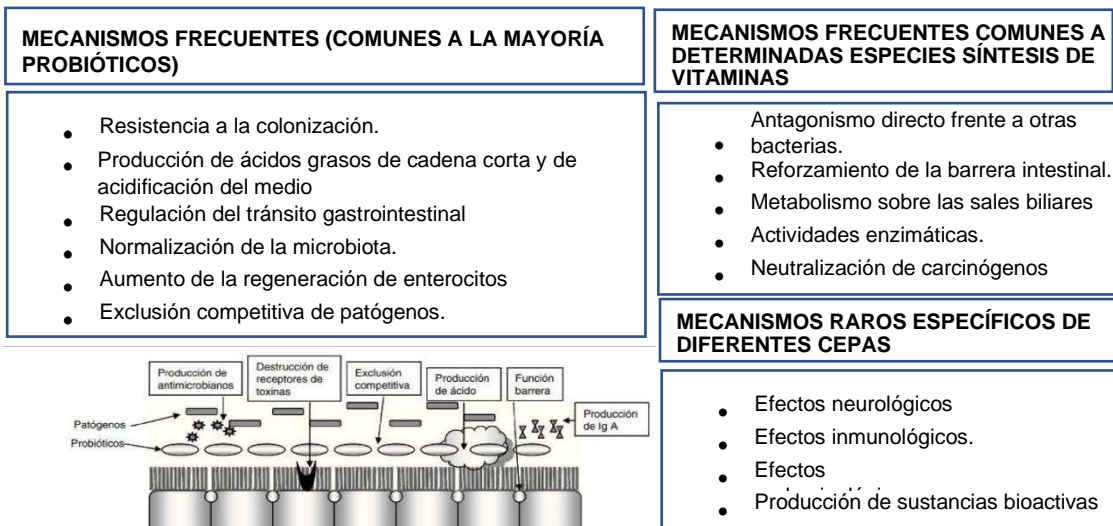


Figura 6. Mecanismos de actividad de los probióticos (modificado de Ewaschuk et al.)

1.4 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias probióticas se descubrieron en los productos lácteos, y su efecto beneficioso sobre la microbiota intestinal fue observado por los agricultores búlgaros que vivieron más tiempo como consecuencia del consumo constante y regular de yogur, así mismo, se ha observado que bacterias presentes en alimentos como el yogur y otros fermentados lácteos (queso, crema, kéfir, yogur, etc.) generan un ambiente estable en el intestino de su hospedero.

Estas bacterias son conocidas como Bacterias Ácido Lácticas (BAL), son un grupo de bacterias Gram positivas, no esporulados, anaerobios facultativos, generalmente inmóviles, de forma bacilar o esférica (Figura 7) de longitud variable y de un grosor de 0.5 a 0.8 μm , catalasa negativa y tiene la capacidad de crecer en diversos sustratos y bajo diferentes condiciones biológicas, así como contar con la capacidad de obtener dos productos finales del proceso de fermentación a partir de glucosa; producen fundamentalmente ácido láctico.

Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (39).

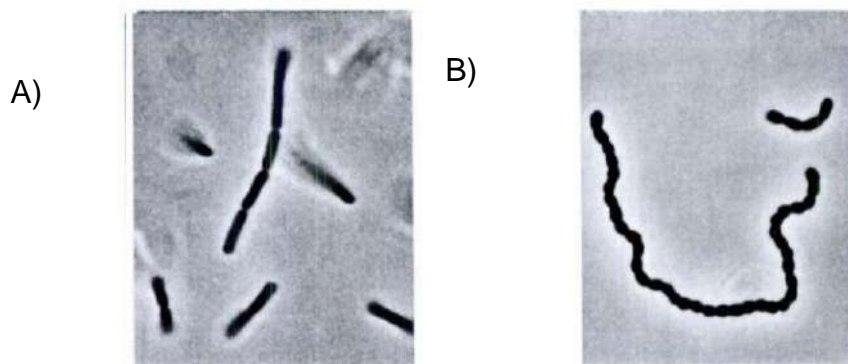


Figura 7. Clasificación según la forma de bacterias ácido lácticas: A) forma bacilar y B) forma circular (contraste de fases, X2180) (Roger Y. Stanier, Julio R. Villanueva, Microbiología, 1996)

Las BAL carecen del ciclo de Krebs, por lo que la generación de adenosín trifosfato (ATP) ocurre mediante la fermentación de carbohidratos y compuestos relacionados, acoplada a fosforilación a nivel de sustrato. Entre los sustratos fermentables por las BAL se encuentran los azúcares (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos), los polialcoholes, el citrato y algún aminoácido (arginina).

Las BAL están incluidas dentro del grupo de microorganismos “seguros” o GRAS (generally recognized as safe), lo que implica que pueden utilizarse para la elaboración de productos alimentarios.

En la naturaleza existen los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Axelsson, 1998; Carr y col., 2002). Sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (40).

Su clasificación es basada en principio en la morfología, modo fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina.

1.5.1 Características fermentativas de las bacterias lácticas.

Basado en la producción final se agrupan como homofermentadoras o heterofermentadoras. Las BAL pueden ser homofermentativas como son *Streptococcus* y *Pediococcus* y utilizan la vía de glucosa Embden-Meyerhoff-Parnass (EMP), y se caracterizan por degradar fructosa 1,6-difosfato con aldosa en dos restos de triosas fosfatos, los cuales son convertidos en lactato (Kandler, 1983; Hiyama et al, 1968). Teóricamente esta vía origina a partir de un mol de glucosa, dos moles de lactato por fermentación homoláctica. Sin embargo, el rendimiento real a condiciones de laboratorio e incluso de operación es de aproximadamente el 90% del rendimiento teórico (Bruno B et al, 1999; Akeberg et al., 1998). Algunas especies del género *Lactobacillus* son heterofermentativas facultativos; en condiciones de anaerobiosis y microaerobiosis se comportan como homofermentativas, y en condiciones aeróbicas forman además de ácido láctico, ácido acético, acetoina y peróxido de hidrógeno (Li et al, 2006; Porro et

al, 1999). La heterofermentación inicia por la oxidación de glucosa 6-fosfato a gluconato 6-fosfato seguido de descarboxilación y división de la pentosa 5-fosfato resultante en un C-2 y un resto de C-3. Por lo tanto, las cantidades equimolares de CO₂, lactato y acetato o etanol se forman a partir de hexosa. La relación acetato/ etanol depende de la oxidación potencial de reducción del sistema (Figura 8).

La heterofermentación en *bifidobacterias* se inicia al dividir la fructosa 6 fosfato con fosfocetolasa en un resto C-2 y un resto de C-4. Mientras que el resto C-2 se convierte en acetato, se forma heptosa 7-fosfato a partir del resto C-4 y un resto de triosa derivado de una molécula adicional de fructosa 6-fosfato por la acción de la transcetolasa. La división consecutiva de la heptosa 7-fosfato y la pentosa 5-fosfato resultante por la fosfocetolasa finalmente da como resultado la formación de acetato y lactato en una relación molar de 3:2 (41).

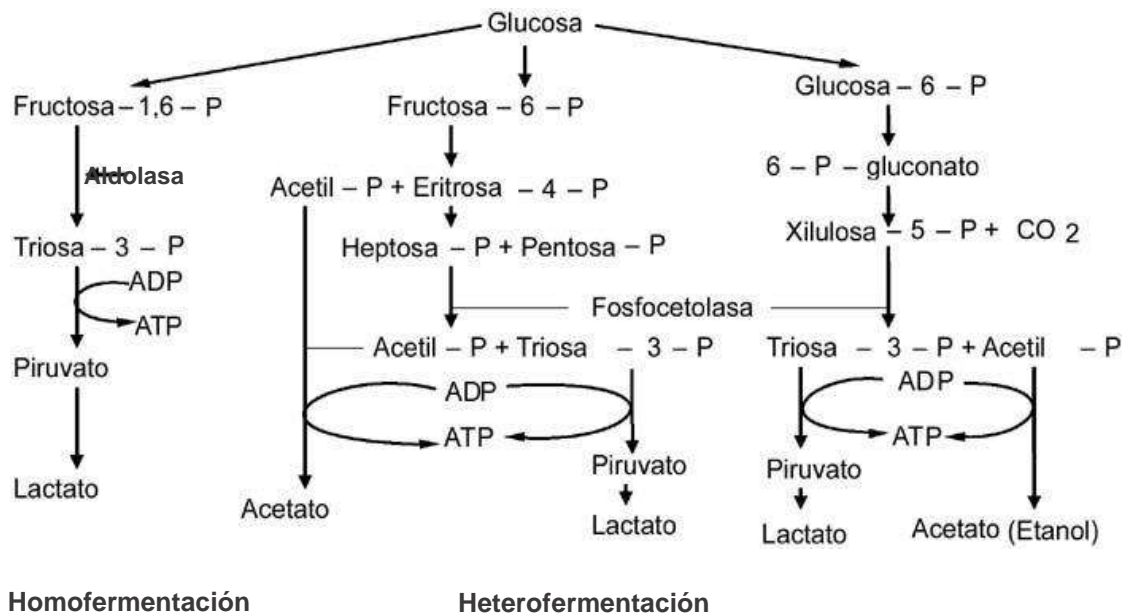


Figura 8. Vías metabólicas en la fermentación de hexosas por bacterias ácido lácticas (Kandler, 1983).

De acuerdo con estos mecanismos de fermentación se pueden distinguir fácilmente por la determinación de sus productos finales de fermentación. Los resultados pueden ser confusos si se fermentan sustratos complejos que contienen compuestos distintos de las hexosas fermentables, pentosas o ácidos orgánicos que producen lactato, acetato y CO₂, en diferentes proporciones, esto es a menudo el caso con materia natural (zumos de frutas, vegetales).

1.5.2 Producción de exopolisacáricos

Algunas bacterias lácticas tienen la capacidad de sintetizar polisacáridos extracelulares (EPS). Se trata de polímeros de cadena larga y elevado peso molecular que se disuelven o dispersan en agua y que contribuyen a mejorar la textura y viscosidad del producto fermentado (De Vuyst y Degeest, 1999; Ruas-Madiedo, 2002) además, las bacterias los utilizan como un mecanismo de defensa y supervivencia al formar biopelículas compuestas de una matriz compleja construida según las exigencias de las condiciones ambientales, las cuales también benefician fortaleciendo el mantenimiento de la mucosa intestinal, tal es el caso de las bacterias probióticas, estos polímeros han sido objeto de numerosos estudios que han puesto de manifiesto características beneficiosas para la salud, tales como la estimulación del sistema inmune, actividad antitumoral o actividad reductora de los niveles de colesterol y antiulceral (Kitazawa et al., 1991; Nakajima et al., 1995; De Vuyst y Degeest, 1999). Los EPS producido por BAL permanece estable en el tracto gastrointestinal del huésped, lo que mejora la colonización de bacterias beneficiosas (J. Cerning, 1995; Kanmani et al, 2013; Kavita et al., 2014; Kim et al., 2010; Konieczna et al, 2018; Sungur et al, 2017).

1.5 Biopelículas

La formación de biopelícula es una estrategia de vida para la mayoría de las bacterias, ya que esta les brinda estabilidad, desempeña funciones catalíticas, aumenta las posibilidades de transferencia de material genético, participa en los procesos de comunicación celular y ofrece protección para sobrevivir a las condiciones adversas y variables del medio ambiente como la resistencia a antibióticos ya que la susceptibilidad a estos agentes antimicrobianos es menor en bacterias asociadas a biopelículas que en sus correspondientes planctónicas; aspectos que contribuyen a una colonización exitosa del hospedador (42). Las biopelículas son estructuras complejas formadas por una población de bacterias las cuales actúan e interactúan como un solo organismo, la composición de la biopelícula es variable, aunque en general el componente mayoritario es el agua, que representa un 97 % del contenido total. La matriz está formada por exopolisacáridos (EPS), fimbrias, proteínas de adherencia, ADN exógeno (eDNA) y pilus, así como diversos productos procedentes de la lisis de las bacterias. La estructura de la matriz contiene canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno, incluso hasta las zonas más profundas de la biopelícula. En la biopelícula se encuentran diversos ambientes en los que la concentración de nutrientes, el pH y la disponibilidad de oxígeno son diferentes (43–45). La formación de estas biopelículas depende de la organización multicelular la cual es temporal e involucra la transición de diferentes etapas: (I) fase planctónica, acondicionamiento de superficies (II) fase de adhesión reversible, (III) fase de formación de micro colonias y adhesión irreversible, (IV) Maduración de la biopelícula y (V) fase de dispersión (46) (Figura 9) . Una vez

formada esta biopelícula el medio que la rodea es fundamental para su capacidad de formación, alimentación y reproducción de los microorganismos que se encuentra en esta.

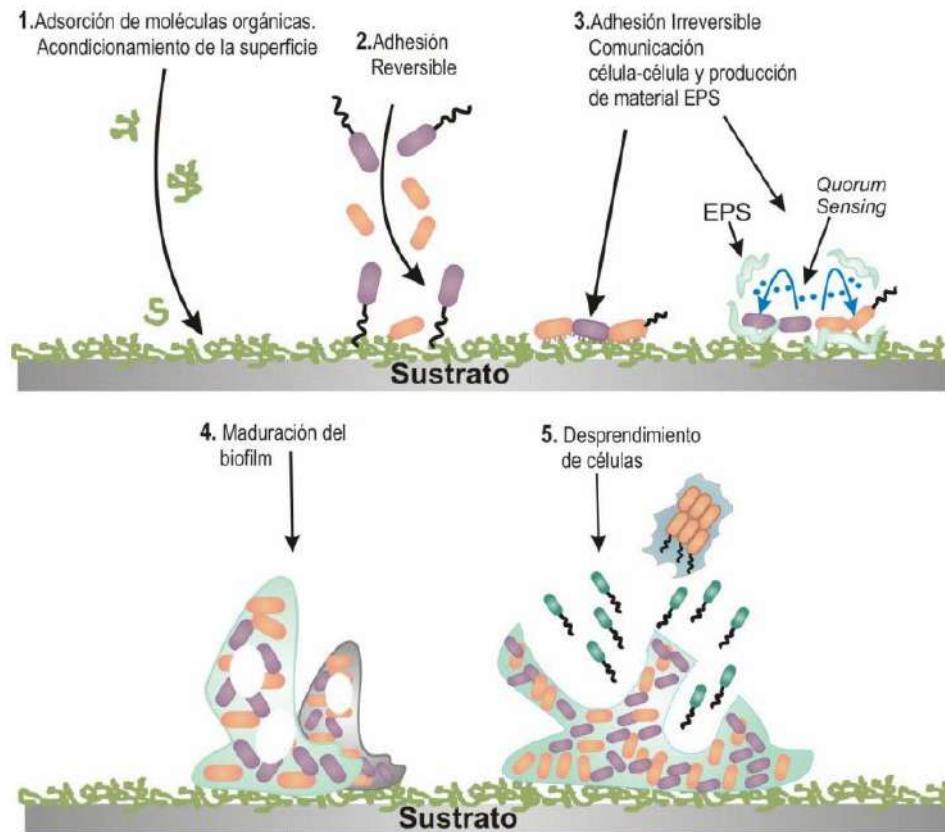


Figura 9. Etapas de formación de biopelículas sobre un sustrato (Díaz, 2011)

Las cepas de microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) de calidad alimentaria, en particular bacterias de ácido láctico (BAL), y bifidobacterias, son capaces de producir EPS sin embargo no siempre en cantidades suficientemente grandes, se han vuelto una alternativa interesante para usos alimentarios de EPS (Cerning , 1990; Abbad-Andaloussi, Talbaoui, Marzack, y Bonaly, 1995; Cerning y Marshall, 1999; De Vuyst y Degeest, 1999; Roberts et al., 1995; Ricciardi y Clementi, 2000). Además, estos

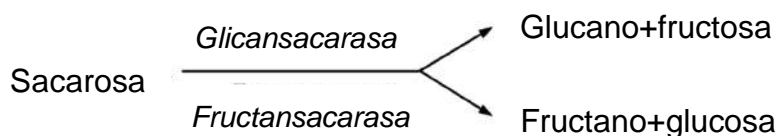
microorganismos pueden ser utilizados para la producción in situ de EPS, en particular para productos lácteos fermentados para mejorar su reología, la textura y el cuerpo, y sensación en la boca. El rendimiento total de EPS producidos depende de la composición del medio principalmente la disponibilidad de sustratos y las condiciones de crecimiento (Degeest et al., 2001)

1.5.1 Clasificación de exopolisacáridos

De acuerdo con su localización se pueden distinguir dos tipos de exopolisacáridos: Polisacáridos capsulares (CPS) y polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos propiamente dichos (EPS) (Cerning, 1995). Los EPS se pueden subdividir en dos grupos, homopolisacáridos (HOPS) y heteropolisacáridos (HEPS).

1.5.2 Homopolisacáridos

Los HOPS se componen de un tipo de monosacáridos constituyentes (d-glucopiranososa o d-fructofuranosa) (Monsan et al., 2001). y su mecanismo de formación por BAL es el siguiente:



Los homopolisacáridos se sintetizan extracelularmente por la acción de glicansacarasas que utilizan sacarosa como donador de fructosa o glucosa. Estos enzimas utilizan la energía del enlace de la sacarosa para catalizar la transferencia del monosacárido a la cadena del EPS.

1.5.3 Heteropolisacáridos

Los HEPS son polímeros que están compuestos de una columna vertebral de subunidades repetidas, que están ramificados (en las posiciones C2, C3, C4, o C6) o no ramificado, y que constan de tres a ocho monosacáridos, derivados de monosacáridos o monosacáridos sustituidos.

Están constituidos por diferentes monosacáridos, siendo glucosa, galactosa y ramnosa los más comunes. También se ha descrito la presencia en menor cantidad de residuos de N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, manosa, fucosa, xilosa, arabinosa, ácido glucurónico o grupos fosfato y acetilo (Cerning, 1995, De Vuyst y Degeest, 1999; Knoshaug et al., 2000; Duboc y Mollet, 2001).

En la Figura 10 se muestran algunas de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de EPS por BAL.

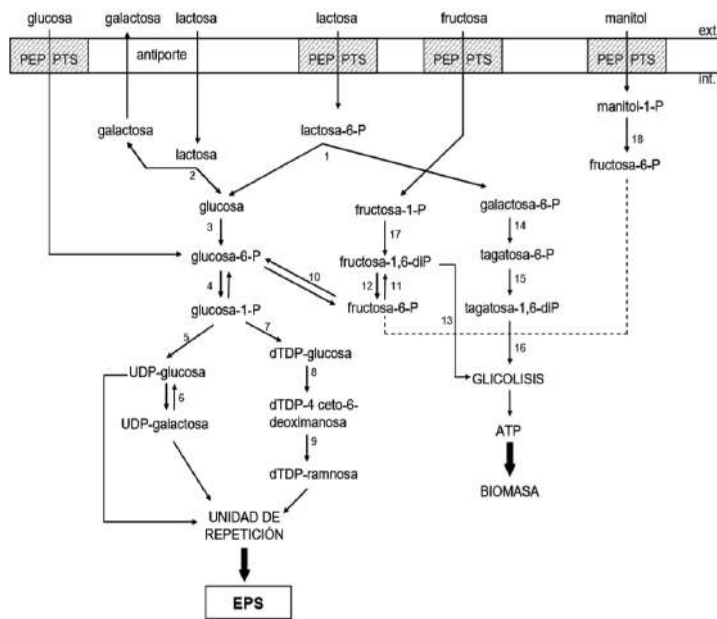


Figura 10. Rutas metabólicas de fermentación de azúcares y síntesis de EPS en BAL. Los números indican los enzimas implicados : 1, fosfo- β -galactosidasa; 2, β -galactosidasa; 3, glucoquinasa; 4, fosfoglucomutasa; 5, UDP-glucosa pirofosforilasa; 6, UDP-galactosa-4-epimerase; 7, dTDP-glucosa pirofosforilasa; 8, deshidratasa; 9, epimerasa reductasa; 10, fosfoglucosa isomerasa; 11, 6-fosofructoquinasa; 12, fructosa-1,6-difosfatasa; 13, fructosa-1,6-difosfato aldolasa; 14, galactosa 6-fosfato isomerasa; 15, tagatosa 6-fosfato quinasa; 16, tagatosa1,6-difosfato aldolasa; 17, 1-fosofructoquinasa; 18, manitol 1-fosfato-5-deshidrogenasa. (Sánchez, 2005)

1.5.4 Sistema de comunicación: Quorum sensing

Varios estudios recientes indican que la formación de biopelícula es regulada por la expresión de genes dependientes de la densidad poblacional y controlados por señalización célula-a-célula en un mecanismo denominado “quorum sensing” (Jiang y Pace, 2006). El “quorum sensing” regula varias funciones tan diversas como la movilidad, expresión de factores de virulencia, esporulación, producción de antibióticos, intercambio de material genético además del desarrollo de la biopelícula (Jiang y Pace, 2006; Sauer et al., 2007). Existen sistemas de fosfotransferencia de dos componentes conocidos como TCS (del inglés de Two-Component Systems), que transmiten la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a las situaciones externas fluctuantes, además usan la producción y detección de químicos extracelulares llamados autoinductores para monitorear la densidad de la población celular denominado quorum sensing (QS), el cual regula la expresión de genes mediante la secreción y detección de señales químicas conocidas como autoinductores. Los mecanismos de señalización son los responsables de determinar, en respuesta a señales del medio ambiente, la morfología de las biopelículas (desde pilares cilíndricos a estructuras filamentosas semejantes a hongos) y la organización de las complejas redes de canales acuosos específicamente diseñados para permitir la circulación de nutrientes y eliminación de desechos (47–49). La naturaleza de la biopelícula y el estado fisiológico de las células bacterianas dentro de la biopelícula confiere un alto nivel de resistencia a los agentes antimicrobianos.

La mayoría de las bacterias lácticas productoras de EPS estudiadas han sido aisladas de productos lácteos, tales como el yogur (Ariga et al, 1992; Ricciardi et al, 2002), queso (Kojic et al, 1992; Staaf et al, 1996) leches fermentadas (Gamar et al, 1997) o kéfir (Micheli et al, 1999).

Se ha descrito que la producción de exopolisacáridos para la formación de biopelícula se ve limitado por la disponibilidad de nutrientes esenciales, algunas cepas estudiadas ampliamente por su producción de exopolisacáridos son, por ejemplo, la cepa *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus delbrueckii*, aislados de productos lácteos fermentados. Algunas investigaciones sugieren que la producción de exopolisacáridos a partir de estas bacterias es inestable, donde se plantea que estos microorganismos ganan y/o pierden la capacidad de producir biopolímeros.

1.6 Prebióticos

El término prebiótico (Tabla 2) se refiere a ingredientes fermentados selectivamente que dan lugar a cambios específicos en la composición y/o la actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped (18). Para que un ingrediente alimenticio sea clasificado como prebiótico, debe cumplir con los siguientes criterios (50,51):

- Resistencia a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas de mamíferos, y a la absorción gastrointestinal.
- Fermentación por la microbiota intestinal.
- Estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de microorganismos probióticos.

- Efecto beneficioso en la salud del huésped.
- Estabilidad a las condiciones de procesamiento de alimentos.

Por lo tanto, cualquier ingrediente que logre llegar al intestino grueso podría ser un prebiótico. Sin embargo, para que sea efectivo, es crucial la fermentación selectiva por la microbiota colónica (Roberfroid, 2001). La definición de prebiótico se asocia en parte con la definición de fibra dietética, aunque añade la selectividad de los prebióticos sobre ciertos microorganismos en concreto. Algunos de los prebióticos tales como inulina, goma guar, almidón resistente, pectinas, quitosano y lactulosa ya han sido estudiados tanto en animales como en humanos (Awati y col., 2005; Kelly, 2008). La mayoría de los avances en cuanto a prebióticos se refiere, se han realizado con dos grupos de compuestos, los fructanos (tipo inulina) y los galactooligosacáridos, los cuales han demostrado su capacidad de estimular el crecimiento de bacterias benéficas a la salud, en la tabla 3 se pueden encontrar los principales prebióticos utilizados. Los hidratos de carbono se pueden clasificar según el grado de polimerización (GP), como oligosacáridos (GP entre 2 y 10 unidades de monosacáridos) y polisacáridos (GP más de 10 monosacáridos) tal y como indica la terminología de la IUB-IUPAC 1982 (International Union of Pure and Applied Chemistry), estos componentes de la fibra cumplen estrictamente los criterios para ser considerados como prebióticos (inulina, fructo-oligosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos derivados de la soja, xilooligosacáridos, pirodextrinas e isomalto-oligosacáridos).

Los hidratos de carbono no digeribles participan en la estimulación de la microbiota intestinal, en especial en el colon y producen un estado de

fermentación sobre la población bacteriana de *Lactobacillus* y *Bífidas*, las cuales fomentan la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) principalmente acetato, propionato y butirato y muchos otros metabolitos y gases (37). Los AGCC acidifican el pH luminal, lo que suprime el crecimiento de determinados patógenos e influencia la motilidad intestinal. Por otro lado, son absorbidos por la mucosa colónica y contribuyen a aportar energía para el huésped. El acetato se metaboliza principalmente en el músculo, los riñones, el corazón y el cerebro; el propionato lo hace en el hígado y es un sustrato neoglucogénico y podría inhibir la síntesis de colesterol y regular la lipogénesis en el tejido adiposo; el butirato es metabolizado preferentemente por el epitelio colónico, donde sirve como sustrato preferencial y regula el crecimiento y la diferenciación celular por diferentes mecanismos (52). Los prebióticos en general tienen que ver con la proliferación de las bacterias intestinales intrínsecas y proporcionan por esta vía una estrategia alternativa para modificar eficazmente el ecosistema intestinal ya que funcionan como el alimento de los probióticos favoreciendo su reproducción y funcionalidad (Figura 11). Otros efectos son la disminución del tiempo de tránsito intestinal, de lo cual resulta aumento de volumen del bolo fecal y de la frecuencia de las deposiciones. Existen alimentos que por su composición química y sus propiedades nutricionales se consideran como prebióticos, sin embargo, alimentos con características similares podrían ser considerados con efecto prebiótico.

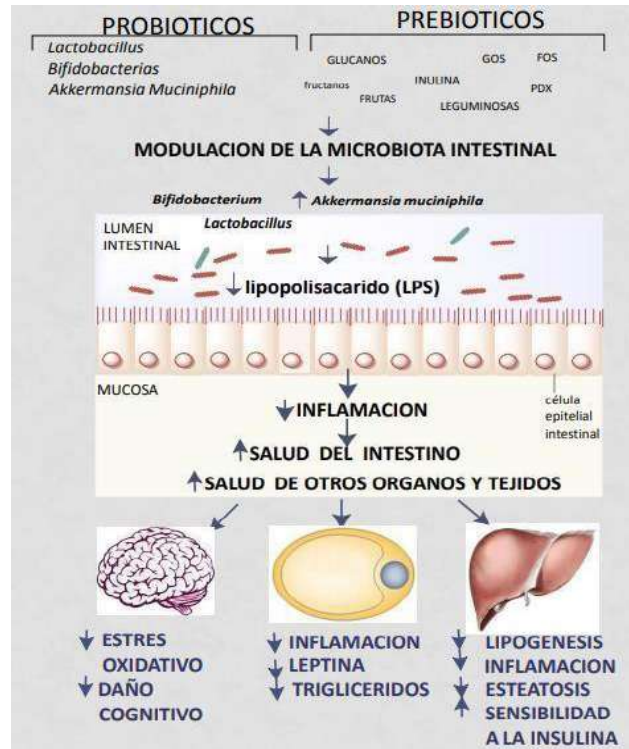


Figura 11. Mecanismos de acción de los probióticos y prebióticos en humanos. (Nimbe torres, 2018).

Es importante recordar que es casi exclusivamente a través de la fermentación microbiana de las diferentes plantas que se liberan y absorben los antioxidantes bioactivos. Claramente, la microbiota gastrointestinal / probióticos de ácido láctico suministrados juegan un papel importante (53)

En los últimos años se han estudiado nuevos candidatos, que aún están en fase de estudio. Es necesario demostrar su eficacia en humanos. Algunos componentes, aunque tengan un efecto similar al que ejercería un prebiótico, estrictamente no se puede clasificar como tal porque puede que no sean una fuente directa de energía para las bacterias beneficiosas del intestino. En vez de ello, su efecto parece estar más relacionado en una modulación de la fisiología

del huésped que favorecería la supervivencia de determinados microorganismos (54).

Los jugos de frutas y verduras, percibidos como productos saludables y refrescantes, se han sugerido como un vehículo ideal de ingredientes funcionales para la salud, como minerales, vitaminas, fibra dietética y compuestos bioactivos, como fenólicos, colina, carotenoides, fitoestrógenos y glucosinolatos (55,56).

1.6.1 Fructanos

Los fructanos son un grupo de oligosacáridos y fructooligosacáridos con distinto origen, estructura y características de fermentación, están presentes en una variedad de plantas como la achicoria, alcachofa de Jerusalem, ajo, cebolla, espárragos y las plantas de la especie *Agavoideae* y están acumulados en cantidad de miligramos (57). Las fuentes de inulina utilizadas en la industria internacional son achicoria (*Cichorium intybus*), la alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*) y el agave (*Agave tequilana*) o se fabrican a partir de sacarosa (58). En México se cuenta con la especie *Agave tequilana* Weber var. *azul*, reconocida por el contenido alto de inulina (59). La inulina ocupa la primera posición en la lista de prebióticos, esto debido a su disponibilidad de amplios recursos con una participación de costo mínimo e incluye un grupo de biomoléculas, a saber; inulina, oligofructosa y fructooligosacáridos (60).

1.6.2 Fructanos de agave

La composición general de nutrientes se presenta en la tabla 5. Los fructanos de agave poseen una estructura de tipo mixta que les provee la característica de ser ramificados, consiste en polímero de fructosas del tipo inulina-levano, pues están unidas por enlaces β -2,1 y β -2,6 con ramificaciones y glucosas terminales (Figura 12), y son hidrolizados mediante enzimas inulinasas y levanasas de las bacterias probióticas ya que el organismo no es capaz de digerir estos compuestos ni de asimilarlos (61)

Tabla 5. Componentes nutricionales en 15 g inulina Organic agave inulin® (enature taste feel evolution)

CONTENIDO ENERGÉTICO	60 kcal
PROTEÍNAS	0 g
GRASAS	0 g
CARBOHIDRATOS TOTALES	15 g
AZÚCARES	0.7 g
FIBRA DIETÉTICA	14.3 g
SODIO	180 mg
CALCIO	8%
HIERRO	4%

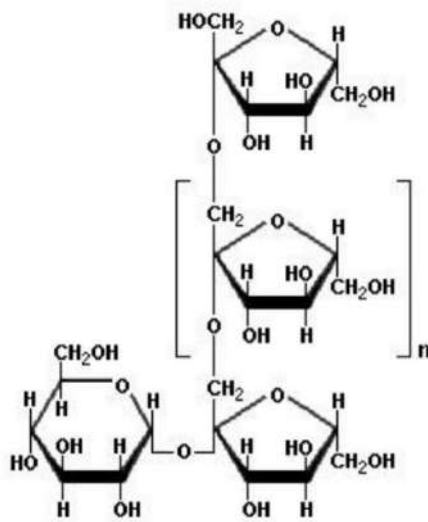


Figura 12. Estructura química de fructanos tipo inulina (Armando, et al, 2010)

La presencia de fructanos en agave fue reportado en 1888 (Suzuki et al. 1993). Inicialmente, se describe como "inulinas" debido a su similitud con β 2-1 fructanos, debido a su complejidad estructural y heterogeneidad, ahora se ha propuesto que se nombren agavin (López et al, 2003). La inulina estimula el desarrollo de bacterias ácido lácticas (62), que actúan contra entero patógenos causantes de diarreas, mediante la producción de bacteriocinas (63) por lo que constituyen el sustrato específico para bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* del colon, las cuales producen cambios que favorecen la salud del hospedero (64). Las bacterias ácido lácticas de los géneros *Streptococcus*, *Leuconoctoc*, y *Lactobacillus* y algunas especies no ácido lácticas como *Bacillus subtilis* y *Bacillus polymyxa* producen fructanos, los cuales han sido descritos como polisacáridos extracelulares, sin embargo, los fructanos de origen vegetal presentan menor grado de polimerización (GP, ≤ 200

moléculas de fructosa) que los de origen microbiano y estructuras más complejas (Olvera, Castillo, & López-Munguía, 2007).

Estudios experimentales han mostrado su uso como agentes bifidogénicos, estimulando el sistema inmune del cuerpo, disminuyendo los niveles de bacterias patogénicas a nivel intestinal, aliviando el estreñimiento, disminuyen el riesgo de osteoporosis debido a la incrementación en la absorción mineral (Carabin y Flamm, 1999; Coudray y col., 1997; Ohta y col., 1994), especialmente de calcio, reduciendo el riesgo de aterosclerosis disminuyendo la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado y disminuye su nivel en sangre (Roberfroid, 2001; Delzenne, 1999). Otra importante característica de los fructanos es que son ingredientes de bajo contenido calórico, su valor energético es solamente del 40% al 50% comparado a carbohidratos digeribles, es decir, proporcionan de 1 a 2 Kcal/g, por tal motivo, tanto la inulina como los fructooligosacáridos son utilizados en la formulación de dietas para personas obesas (Kaur y Gupta, 2002).

Los fructanos también se ha reportado que modulan el nivel hormonal de insulina y glucagón (Luo y col., 1996; Boillot y col., 1995), por medio de la regulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos (Delzenne, 1999) disminuyendo los niveles de glucosa en sangre; el consumo de fructanos se ha reportado que tiene efectos sobre la modulación del gen proglucagón incrementando como consecuencia, los niveles de la incretina GLP-1 y confiriendo así, efectos positivos en obesidad y diabetes (Urías-Silvas y col., 2008; Cani y col., 2006; 2005; 2004).

2 JUSTIFICACIÓN

Las bacterias ácido lácticas pertenecen al grupo de los probióticos ya que al ser ingeridos cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped y son consideradas de grado alimenticio, sin embargo, se sabe que el desequilibrio de estos microorganismos a nivel intestinal está asociado a factores dietéticos-nutricionales, obesidad y a su capacidad de colonización y puede repercutir en el estado de salud del huésped.

Una de las principales contribuciones para dicha colonización, supervivencia y mantenimiento exitoso de una población microbiana es la producción de exopolisacáridos para la formación de biopelícula, los cuales le confieren resistencia a una variedad de ambientes estresantes incluyendo antibióticos, pH, limitaciones nutricionales, etc.

En este punto de nuestro documento, referenciamos la importancia y relación que existe del estudio de los microorganismos probióticos y su influencia sobre enfermedades principalmente crónicas no transmisibles; una forma de estimular el crecimiento duradero de estos microorganismos es a partir de la formación de biopelícula y la influencia de la presencia de prebióticos como fructanos del tipo inulina de origen de agave, sus efectos aún no han sido evaluada de forma extensiva principalmente *in vitro*; por lo que es de gran interés encontrar especies de BAL capaces de formar biopelícula con igual o mejores propiedades que las previamente descritas y evaluar las condiciones óptimas de su producción, por esta razón, el interés en evaluar la formación de biopelículas

formadas por bacterias ácido lácticas y el fortalecimiento de estas biopelículas durante un estímulo prebiótico de fructanos comerciales de origen de agave.

3 HIPÓTESIS

Es factible la formación fuerte de biopelícula de bacterias ácido lácticas con elevada producción de exopolisacáridos utilizando fructanos comerciales de origen de agave como sustrato.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar *in vitro* la formación de biopelículas de un consorcio de bacterias ácido lácticas en presencia de fructanos comerciales originarios de agave.

4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar macro, micromorfológicamente y bioquímicamente un consorcio de bacterias ácido lácticas liofilizadas.
2. Cuantificar el poder de adherencia de la biopelícula por un consorcio de bacterias ácido lácticas liofilizadas inducida por la presencia de fructanos comerciales originarios de agave en diferentes concentraciones.
3. Clasificar la capacidad de formación de biopelícula por un consorcio de bacterias ácido lácticas liofilizadas inducida por la presencia de fructanos comerciales originarios de agave,

4. Determinar fenotípica y morfológicamente la formación de biopelícula por un consorcio de bacterias ácido lácticas liofilizadas inducida por la presencia de fructanos comerciales originarios de agave en diferentes concentraciones.

5 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 Diseño de estudio

Se realizó un estudio experimental mixto con componentes cualitativos y cuantitativos.

5.2 Población de estudio

Se utilizó un consorcio bacteriano de bacterias ácido lácticas liofilizadas de la marca Danisco France S.A.S. (Tabla 6) y como fructanos comerciales Inulina liofilizada Organic agave inulin® (enature taste feel evolution).

Tabla 6. Consorcio bacteriano

Bacterias ácido lácticas	Características generales
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>ssp. lactis</i> 	Cultivos iniciadores utilizados para la elaboración de queso, yogur y otros productos lácteos cultivados.
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i> 	
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus thermophilus</i> 	

5.3 Instrumento de investigación

Los experimentos fueron realizados en el laboratorio A de la Facultad de Nutrición, en la facultad de medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) con base a las normas generales de bioseguridad.

5.4 Estudios preliminares

Los estudios preliminares para evaluar la formación de biopelícula se realizaron para confirmar que el consorcio microbiano corresponda a bacterias ácido lácticas (BAL) y que los fructanos comerciales de origen de agave (FCOA) sean utilizados como sustrato para la fermentación de las bacterias a utilizar.

5.4.1 Preparación de las concentraciones de fructanos comerciales originarios de agave (FCOA)

El sustrato liofilizado de FCOA fue previamente pesado en una báscula analítica (Ohaus, Adventurer™) en distintas concentraciones (0.1%, 4%, 8% y 16%) y en condiciones de esterilidad para posteriormente ser adicionado al medio de cultivo.

5.4.2 Activación de bacterias ácido lácticas (BAL)

Las variables independientes tenidas en cuenta durante la activación de BAL y formación de biopelícula bacteriana fueron pH 4,5 y 6,5; temperatura 37(°C) y tiempo de crecimiento de 24 h en condiciones estáticas de anaerobiosis.

Se ha reportado el uso de diferentes medios de cultivo entre ellos el de Man Rogosa Sharpe (MRS), motivo por el cual se seleccionó para el siguiente ensayo

in vitro, el medio seleccionado permite el crecimiento de biomasa de las BAL respondiendo a sus complejos requerimientos nutricionales.

Para realizar su activación, como control positivo se inoculó el consorcio en frascos de 15 ml con tapa que contenían leche orgánica y se incubaron a 37°C por 24 h en una incubadora Ecoshel™ con control digital modelo 9052, posteriormente se colocó 1% del cultivo obtenido de BAL en 50 ml de caldo MRS, enseguida se incubó de manera estática a 37 °C por 24 horas en atmósfera microaerofílica (5% de O₂), utilizando contenedores de anaerobiosis (Merck™) y sobres generadores de condiciones anaerobias (GasPak-Merck™). Como control negativo, se preparó en los mismos frascos, 15 ml del caldo MRS en las mismas condiciones sin ser inoculada.

Pasado el tiempo de incubación se realizaron inóculos en medios de cultivos agar MRS incubadas a 37°C por 24 horas, para monitoreo de las células viables.

5.4.3 Caracterización morfológica y bioquímica de las colonias

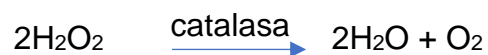
obtenidas

Se visualizó macroscópicamente la morfología de las colonias obtenidas en los medios de cultivo, siguiendo las características previamente reportadas por Jackson et al. (2002) donde se menciona que las cepas de *BAL* forman colonias con un tamaño de 1 a 2 mm, de color blanco cremoso, de forma redonda, puntiformes, con bordes enteros, y superficie convexa, de consistencia butirosa y húmeda.

Con la finalidad de encontrar colonias Gram positivas, se realizó tinción de Gram posterior a las 24h de incubación para determinar sus características

morfológicas siguiendo el protocolo descrito por Hans Christian Gram (1884). La observación de las bacterias se realizó con un microscopio óptico (RADICAL™, RXL-4B) y se hicieron registros fotográficos.

Para determinar características bioquímicas se evaluaron las colonias mediante la técnica de catalasa ya que las BAL se caracterizan por ser catalasa negativa, esta técnica es utilizada para identificar la presencia de la enzima catalasa en una bacteria. Se colocó una porción de la colonia a evaluar en una placa de plástico con pocillos de fondo negro, posteriormente se adicionó una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% y se visualizó macroscópicamente si se presentaba el desprendimiento de burbujas como consecuencia de la reacción catalizada por la catalasa, si la aparición de burbujas es ausente el resultado es catalasa negativa.



Para determinar su capacidad de fermentación de lactosa en leche, se partió de un cultivo fresco del consorcio microbiano en caldo MRS y se inocularon 100 µL de cada una en 1 ml de leche entera pasteurizada orgánica en tubos de eppendorf y se incubaron a 37°C por 24 h, posterior a ello se observó si presentaba cambio un cambio en la consistencia de la leche partiendo de un estado líquido a una consistencia firme y sin separación de suero.

5.4.4 Criopreservación del consorcio microbiano

Partiendo del cultivo de la cepa en caldo MRS, la muestra fue colocada en la microcentrífuga (Velab™, PRO-12Ka) a 8,000 rpm durante 10 minutos, enseguida se desechó el sobrenadante y las cepas fueron conservadas con caldo MRS suplementado con 15 % glicerol reactivo (MEYER®) y 10% de leche descremada en polvo estéril, se almacenaron en congelación (Thermo SCIENTIFIC™, 02LFEETSA) a -80°C en viales para crio-preservación.

5.4.5 Reactivación de las cepas

La reactivación de las cepas evaluadas antes de cada ensayo se llevó a cabo a partir de un proceso de descongelamiento que consistió en pasar de -80 °C a -20°C y dejar las cepas durante dos horas a esta temperatura, luego se pasaron a 4°C y se mantuvieron así durante una hora. Posteriormente, se inocularon 100 µl del inóculo en caldo MRS (SIGMA-ALDRICH®) a 37°C durante 24 h.

5.4.6 Crecimiento del consorcio de bacterias ácido lácticas en presencia de prebiótico

Para evaluar el crecimiento del consorcio bacteriano en presencia de los fructanos comerciales originarios de agave, se realizó el siguiente procedimiento. Inicialmente se inocularon en 50 ml de caldo MRS 500 µL de cultivo overnight previamente activadas como se describe anteriormente de la cepa a evaluar y se hizo un enriquecimiento al medio selectivo de interés con 2 prebióticos liofilizados comerciales de manera individual, como fructanos comerciales originarios de agave (FCOA) se utilizó inulina Organic agave inulin® (enature taste feel evolution) y nopal deshidratado y concentrado en polvo (Natura

Biofoods®), ambos certificados como producto orgánico por la USDA ORGANIC, en una concentración del 0.1%, se sembraron alícuotas de 200 µL de los cultivos individualmente por triplicado en pocillos en microplacas para cultivo de células de fondo plano (Corning™ Costar™) y se incubaron a 37 ° C por 24 h de forma estática en condiciones de anaerobiosis previamente descritas. Se utilizaron pozos con caldo MRS y caldo MRS adicionado con FCOA y nopal de forma individual como controles negativos. Para monitorear el cambio en el recuento (\log_{10} UFC g⁻¹) como función del tiempo se tomó una medición de densidad óptica de 620nm (DO_{620nm}) al inicio y posterior a la incubación en un lector de placas microtiter (Labsystems Multiskan Ascent 354).

5.5 Métodos para el estudio de formación de biopelícula

La capacidad de formación de biopelícula por un consorcio de BAL fue evaluada con la metodología propuesta por Danese et al. 1990 y Ramage et al. 2001 (65), incluyendo algunas modificaciones. Se estudió la interferencia de variables como la presencia de FCOA en diferentes concentraciones y la utilización de un protocolo con etapa de incubación de 69 h. Para la interpretación de los resultados se requirió definir un punto de corte que separe a las muestras con formación o no de biopelícula en presencia de FCOA.

5.5.1 Inducción de la formación de biopelículas en placa de microtitulación

La finalidad de este ensayo es demostrar si existe una relación sinérgica entre las BAL y la presencia de FCOA en la formación de biopelícula.

Para reducir la posibilidad de contaminación, este paso debe realizarse en condiciones de esterilidad. Dado que la expresión fenotípica de la formación de biopelículas es muy susceptible a diversas condiciones *in vitro*, con el fin de minimizar los errores y proporcionar un análisis fiable de los datos obtenidos, es esencial realizar pruebas de cada muestra al menos por triplicado.

Se realizó la metodología descrita anteriormente en el crecimiento de BAL en presencia del prebiótico, pero incubando por 69 h a 33°C. Al término de la incubación, se eliminó el medio de cultivo con el prebiótico mediante decantación y se prosiguió a realizar 4 lavados con 200 µL de agua destilada (JT Baker®). Posterior a los lavados, las placas se agitaron vigorosamente para eliminar todas las bacterias no adherentes, enseguida se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las biopelículas adheridas en los pozos fueron teñidas con 200 µL de violeta de genciana GOLDEN BELL® (solución colorante según la fórmula de Hucker para coloración en técnica de GRAM) al 0.1% durante 5 minutos, después el colorante fue retirado por decantación y los pozos fueron lavados 4 veces nuevamente con 200 µL de agua destilada. Enseguida las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se añadió 200 µL de caldo MRS a cada pozo y se dejó reposar durante cinco minutos. Para cuantificar la presencia de biopelícula, las placas microtiter se llevaron a un lector de ELISA (Labsystems Multiskan Ascent 354) para medir la densidad óptica a 540_{nm} de cada uno de los pozos, incluyendo el control negativo. Los valores promedios de DO_{540nm} de los triplicados obtenidos de cada muestra, se consideraron como el índice de formación bacteriana.

Los intervalos discriminatorios para cuantificar el poder de formación de biopelícula sobre las placas microtiter se clasificaron en función de las DO de las biopelículas (Manijeh, et al., 2009), las capacidades de formación de las BAL analizadas se clasificaron en cuatro categorías: No formadora (0), débil (+), moderadamente (++) o fuertemente (+++) formadora (Tabla 7) como lo describió anteriormente (66). El análisis estadístico realizado a los datos fue la media, desviación estándar y se aplicó la fórmula de densidad óptica (OD) del control para clasificar las cepas de acuerdo con la formación de la biopelícula; esto se realizó con los resultados del ensayo a las 69 h.

Para este estudio se calculó la media y desviación estándar de la densidad óptica (DO) de las muestras. A continuación, se definió el punto de corte del control (DOc) utilizado. El DOc se define como tres desviaciones estándar (SD) sobre la DO media de los controles: $DOc = DO \text{ media de los controles} + (3 \times SD \text{ de los controles})$. La DO final de cada una de las cepas podemos expresarla como el valor de la DO medido para cada una de las muestras sustrayendo el valor de DOc ($DO = DO \text{ de una muestra} - DOc$). Si algún valor obtenido de DO resultaba negativo, se tomaba como valor cero, mientras que cualquier valor positivo indicaba la producción de biopelícula (67,68).

Tabla 7. Clasificación de la formación de biopelículas basada en la densidad óptica medida a 540_{nm} (Manijeh, et al., 2009)

No formadoras (0)	$DO \leq DO_c$
Débil (+)	$DO_c < DO \leq 2(DO_c)$
Moderadamente (++)	$2(DO_c) < DO \leq 3(DO_c)$
Fuerte (+++)	$3(DO_c) < DO$

DO= densidad óptica; DO_c= densidad óptica del control negativo

Ya que los valores de DO de la biopelícula fueron por triplicado; para eliminar este sesgo, a partir de la obtención de los resultados se recurre a la estandarización de resultados.

5.5.2 Evaluación fenotípico cualitativo de la formación de Biopelículas por BAL en presencia de prebiótico en tubos de cristal

Ensayo fenotípico cualitativo para determinar la habilidad de producir biopelícula en el consorcio microbiano de BAL. Siguiendo el método en tubo de ensayo de Chritsensens y col., 1982 con algunas modificaciones.

En este estudio los cultivos se realizaron en tubos de cultivo de cristal con tapa y con medio MRS por triplicado en una escala proporcional de 10 ml, se adicionó diferentes concentraciones de FCOA; posterior a la incubación bajo las mismas condiciones y metodología estandarizadas previamente descritas, se desechó el

cultivo por el método de decantación, y se lavaron los tubos cuatro veces con 10 ml de agua destilada y se secaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. La tinción simple de los tubos se realizó con 10 ml de violeta de genciana al 0.1 % durante 5 min y se retiró el colorante. Se lavaron los tubos cuatro veces con agua destilada y se secaron una hora a temperatura ambiente. Como control positivo se inoculó el consorcio microbiano en tubos de cristal con tapa por triplicado que contenían 10 ml de caldo MRS, bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Como control negativo, se preparó en tubos similares, 10 ml de caldo MRS y 10 ml de caldo MRS adicionado con cada concentración de los FCOA, posteriormente se visualizaron macroscópicamente los tubos teñidos con violeta de genciana para determinar la presencia de biopelícula por BAL adherida a la pared de los tubos. La evaluación de la producción de biopelícula fue clasificada como se describe anteriormente sin aplicar ninguna fórmula: No formadora, formador débil, formador moderado y formador fuerte.

Con el sobrenadante reservado se tomaron 50 µl y se inocularon en cajas Petri que contenían agar MRS, se incubaron en condiciones de anaerobiosis previamente descritas por 24 h; con este ensayo se verificó la viabilidad de las bacterias inoculadas formadoras de biopelícula.

5.5.1 Determinación de las características morfológicas de biopelículas formadas utilizando microscopía óptica

Se siguió la metodología anteriormente descrita, en un tubo falcon de plástico de 50 ml se colocó en su interior un portaobjeto de vidrio estéril, se agregó a cada una de las muestras el medio de cultivo MRS previamente adicionado con los FCOA e inoculado con el consorcio microbiano de BAL hasta cubrir el portaobjeto

y se incubó de la misma forma descrita anteriormente durante 69 h. Transcurrido el tiempo de incubación, en esterilidad los portaobjetos se retiraron del tubo con apoyo de unas pinzas de laboratorio y se lavaron 4 veces con agua destilada estéril para eliminar las bacterias no adheridas y se dejaron secar durante 20 minutos a temperatura ambiente. La biopelícula adherida en el portaobjetos fue teñida con violeta de genciana al 0.1% durante 5 minutos, después el colorante fue retirado y los portaobjetos lavados 4 veces con agua destilada. Seguidamente los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 hora para fijar las bacterias adheridas. Las biopelículas fijadas se analizaron en el microscopio óptico (RADICAL™, RXL-4B) a 100 X.

El criterio para la valoración de la biopelícula fijada fue positivo si se observó la tinción de la biopelícula en la superficie del portaobjetos.

5.6 Diseño de análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva (media, varianza y desviación estándar) de los valores obtenidos y se analizaron las diferencias entre cada ensayo, a fin de determinar cuál de las concentraciones de FCOA adicionados permitía una mejor respuesta para determinar el crecimiento y la capacidad de producción de biopelícula por parte del consorcio microbiano de BAL, utilizando para tal fin la prueba estadística ANOVA y en conjunto comparaciones múltiples con la prueba de Tukey, a través del software GraphPAD Prism 8.0.1

Todos los análisis se llevaron a cabo con un nivel de confianza del 95%, los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

6 RESULTADOS

6.1 Estudios preliminares

6.1.1 Caracterización macro, micromorfológicamente y bioquímicamente de un consorcio de BAL

Se utilizó un consorcio microbiano de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) liofilizadas, las cuales cumplieron con las características inicialmente descritas en 1919 por Orla Jensen, se trata de un grupo de bacterias fisiológicamente uniforme, de pared Grampositivos, son anaerobias facultativas, catalasa negativa. A partir de las pruebas realizadas, los resultados de la caracterización de los microorganismos se muestran en la Figura 13 A, B y C.

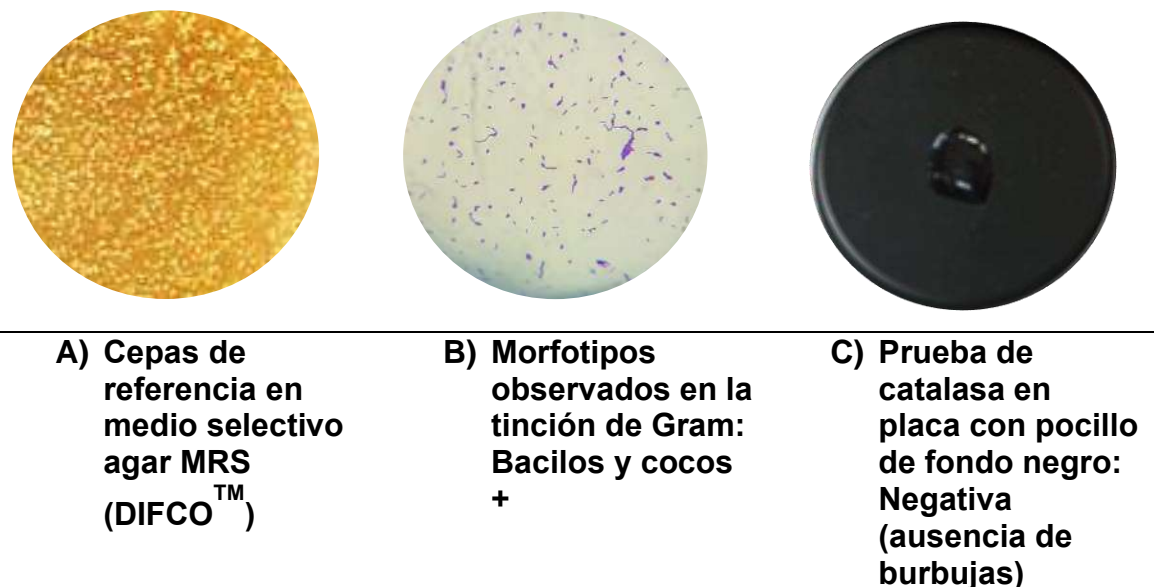


Figura 13. Caracterización morfológica y bioquímica observada en una muestra liofilizada del consorcio de BAL.

Se confirmó la utilización de carbohidratos como fuente de energía por parte del consorcio a través de su capacidad de fermentación principalmente de la lactosa presente en leche orgánica. La capacidad de fermentación en leche se manifestó como cambio en la consistencia de la leche partiendo de un estado líquido a una consistencia firme y sin separación de suero, obteniendo como producto final yogurt debido (Figura 14).

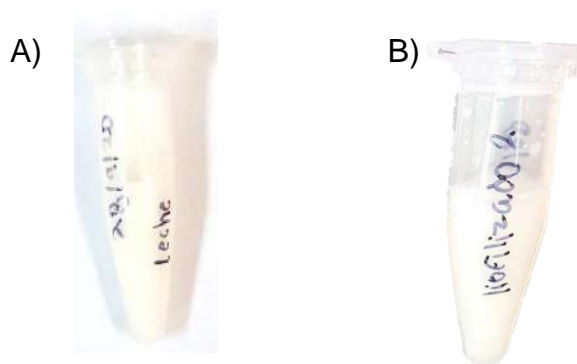


Figura 14. Muestras de fermentación de lactosa por el consorcio de bacterias ácido lácticas (BAL) durante 24 h a 37°C. A) Control negativo sin cambio y B) Muestra inoculada con BAL con cambio en la consistencia.

6.1.2 Crecimiento de BAL en presencia de prebiótico

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos a partir de lecturas de longitud de onda a 620nm de cada muestra posterior a 24 h de incubación, en donde se observó que los fructanos comerciales originarios de agave utilizados para el desarrollo de este proyecto sí cumplen con dos de los criterios descritos anteriormente como prebiótico: Ser fermentados y estimular selectivamente el

crecimiento y/o la actividad de microorganismos probióticos, ya que el consorcio microbiano de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) en presencia de FCOA induce estadísticamente significativo el crecimiento de las BAL, esto con base a la correlación Ordinal de Spearman con un nivel de confianza del 95.0% con valores de $P < 0.001$, estos resultados se compararon con una muestra adicionada como control con nopal liofilizado en la misma concentración el cual es un alimento descrito como prebiótico y también con la muestra ausente del prebiótico (control *Lactobacillus*). Lo que indica que el consorcio fue capaz de fermentar y utilizar los FCOA como fuente energética para su crecimiento.

Crecimiento de bacterias ácido lácticas en medio de cultivo MRS adicionado con fructanos comerciales originarios de agave y nopal al 0.1% posterior a 24 h de incubación.

Muestras	Caldo MRS	Caldo MRS + BAL	Caldo MRS + BAL + 0.1% FCOA	Caldo MRS + BAL + 0.1% nopal
Lecturas de	0.128	0.148	0.655*	0.480
longitud de onda	0.128	0.386	0.749*	0.449
a 620 nm	0.129	0.154	0.684*	0.439

FCOA: Fructanos comerciales originarios de agave

*Valores estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95.0% con valores-P por debajo de 0.05.

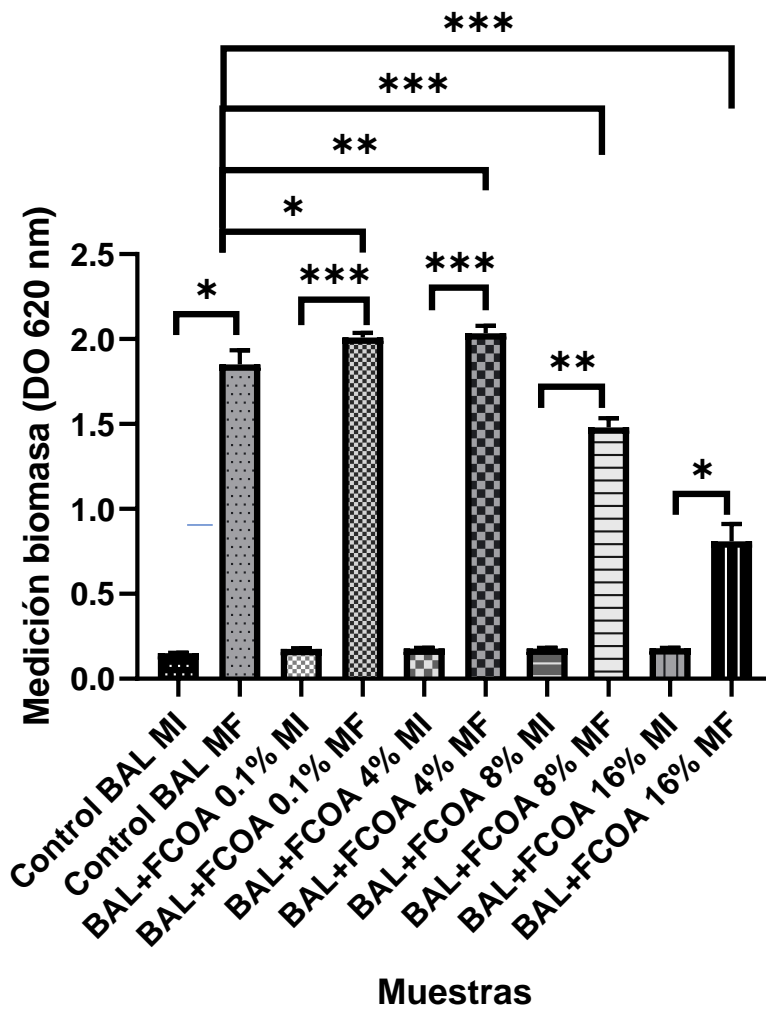
Al comparar los dos prebióticos liofilizados de FCOA al 0.1% y nopal al 0.1%, el mayor crecimiento de las cepas fue en el medio con FCOA al 0.1% ($P < 0.05$), mientras que en los medios con nopal al 0.1% los crecimientos fueron más bajos. Esto se pudiera asociar a la composición química presente en los fructanos, así como a la longitud de las cadenas que, al estar constituidas por polisacáridos, son degradados por parte de las bacterias ácido lácticas (van den Broek et al. 2008)

6.2 Densidades ópticas del crecimiento de BAL en presencia de FCOA en 69 h de incubación

En la Figura 15 se muestran las DO_{620nm} (media \pm DE) de la medición en tiempo 0 y a las 69 h que reflejan el crecimiento alcanzado por todas las muestras como el Control BAL (muestra inoculada por BAL en medio MRS) y de las muestras con medio MRS adicionadas con FCOA en diferentes concentraciones (BAL+FCOA 0.1% MF, BAL+FCOA 4% MF, BAL+FCOA 8% MF, BAL+FCOA 16% MF). En general se observa que la biomasa bacteriana final de los cultivos inoculados en todas las muestras (Control BAL MF, BAL+FCOA 0.1% MF, BAL+FCOA 4% MF, BAL+FCOA 8% MF, BAL+FCOA 16% MF) a las 69 h fueron superiores a las observadas en los pozos a las 0 h (Control BAL MI, BAL+FCOA 0.1% MI, BAL+FCOA 4% MI, BAL+FCOA 8% MI, BAL+FCOA 16% MI), lo que indica que el consorcio bacteriano de BAL fue capaz de aumentar su biomasa en la presencia de las cuatro 4 concentraciones de fructanos comerciales originarios de agave, ya que se obtuvo como resultado que todas las muestras tienen diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de

confianza en el crecimiento de BAL tomando en cuenta la DO inicial a las 0 y 69

h.



DO. Densidad óptica; BAL: Bacterias ácido lácticas; FCOA: Fructanos comerciales originarios de agave; IN: Medición inicial (tiempo 0); FN: Medición final.

Prueba estadística, ANOVA post test Tukey's * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Figura 15. Crecimiento del consorcio de bacterias ácido lácticas (media \pm DE) adicionado con fructanos comerciales originarios de agave (0.1, 4, 8, 16%) a partir de una medición inicial a las 0 h y una medición final a las 24 h a una densidad óptica de 620nm.

Asimismo, en la Figura 15 también se comparó la muestra de Control BAL MF (BAL inoculadas en medio MRS) con las muestras adicionadas con FCOA en las diferentes concentraciones (BAL+FCOA 0.1% MF, BAL+FCOA 4% MF, BAL+FCOA 8% MF, BAL+FCOA 16% MF) a las 69 h y se obtuvo que con las muestras de BAL+FCOA 0.1% MF y BAL+FCOA 4% MF existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza, lo que indica que la adición de 0.1% y 4% de FCOA aumenta la biomasa bacteriana en comparación con la muestra ausente de FCOA. Por el contrario, en las muestras de BAL+FCOA 8% MF, y BAL+FCOA 16% MF se puede notar que también existe una diferencia estadísticamente significativa con un nivel del 95.0% de confianza con la muestra de Control BAL MF (muestra inoculada por BAL sin adición de FCOA) a las 68 h, sin embargo, esta comparación indica que la adición de una mayor concentración de FCOA al 8 y 16% disminuye significativamente su crecimiento.

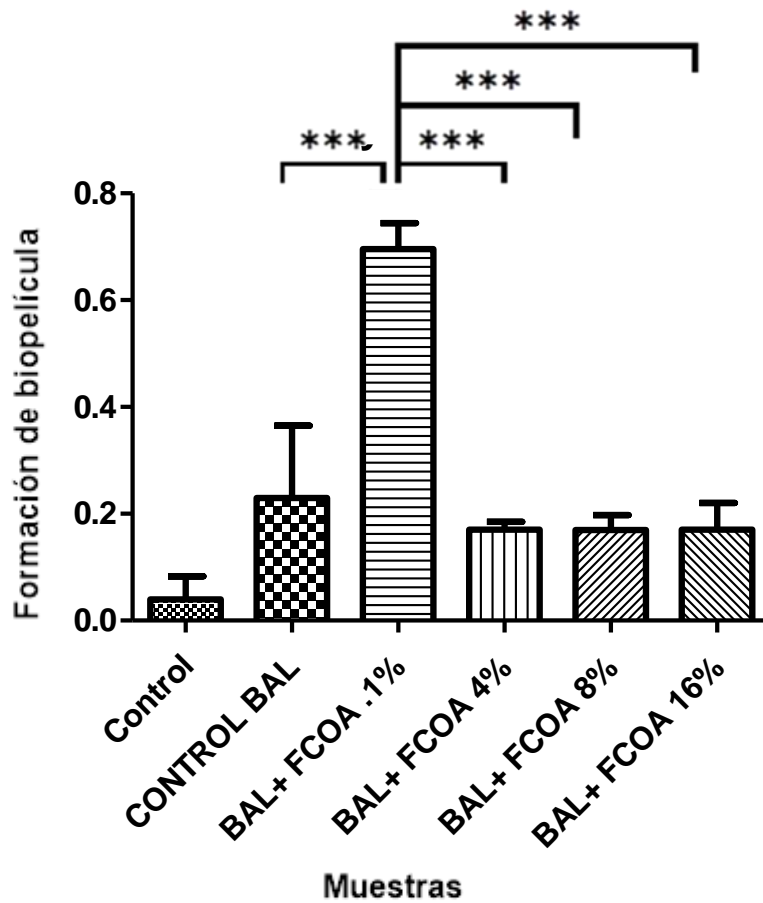
6.3 Cuantificación de biopelícula

En la Figura 17 se muestran las longitudes de onda a DO540nm (media \pm DE) obtenidas que reflejan la formación de biopelícula por el consorcio de BAL en medio de cultivo MRS respectivamente (Control BAL) y adicionado con FCOA en (BAL+FCOA 0.1%, BAL+FCOA 4%, BAL+FCOA 8%, BAL+FCOA 16%), así como las muestras no inoculadas determinada como control negativo (control).

La cuantificación de la formación de biopelícula adherida a los pozos de la placa, mostró que la totalidad de las muestras inoculadas con BAL (Control BAL) y las muestras inoculadas con BAL en un medio MRS adicionado con FCOA en concentraciones 0.1, 4, 8 y 16% (BAL+FCOA 0.1%, BAL+FCOA 4%, BAL+FCOA 8%, BAL+FCOA 16%) presentaron un grado de producción de biopelícula en comparación con el control (control negativo), ya que tienen diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza en comparación con el control (control negativo).

Sin embargo, el contenido de nutrientes del medio influyó significativamente en la cantidad de biopelícula producida por las bacterias analizadas, ya que la cantidad de biopelícula producida por la muestra BAL+FCOA 0.1% que contenía BAL en un medio MRS adicionado con FCOA a 0.1% (DO 540_{nm} 0.696 ± 0.048) era mayor, ya que se encontraron diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza con el resto de las muestras; Control BAL (DO540_{nm} 0.229 ± 0.135), BAL+FCOA 0.1% (DO 540_{nm} 0.696 ± 0.048), BAL+FCOA 4% (DO 540_{nm} 0.170± 0.086), BAL+FCOA 8% (DO 540_{nm} 0.170± 0.027), BAL+FCOA 16% (DO 540_{nm} 0.170± 0.049).

Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de la formación de la biopelícula de las muestras que contenían BAL en un medio MRS adicionado con FCOA al 4, 8 y 16% (BAL+FCOA 4%, BAL+FCOA 8%, BAL+FCOA 16%) en comparación con la muestra que solo contenía BAL (Control BAL), por lo que se determina que una adición de FCOA en una concentración de 4, 8 y 16% no tiene un impacto significativo en la formación de biopelícula por el consorcio bacteriano de BAL.



DO. Densidad óptica; BAL: Bacterias ácido lácticas; FCOA: Fructanos comerciales originarios de agave; control: muestra no inoculada.

Prueba estadística, ANOVA post test Tukey's ***p<0.001

Figura 17. Formación de biopelícula adheridas a los pozos por el consorcio de bacterias ácido lácticas (media ± DE) adicionado con fructanos comerciales originarios de agave (0.1, 4, 8, 16%) a una densidad óptica de 540nm.

6.3.1 Clasificación de la formación de biopelícula por BAL en presencia de FCOA

Diversos valores de DO_{540nm} fueron encontrados dependiendo de la concentración FCOA. Para poder establecer una visión global de la formación de biopelícula en el consorcio bacteriano de BAL, los resultados obtenidos se valoraron por parámetros comunes que permitieron valorar la formación de biopelícula a nivel de cada porcentaje adicionado con FCOA. Para ello, los resultados obtenidos se sometieron a un proceso de estandarización que permitía valorar la formación de las biopelículas de todas las muestras estableciendo un punto de corte común. Se realizó la media de los 3 valores de DO correspondientes al control negativo, obteniendo un valor estándar de control (DO_e) de 0.04. También se calculó la desviación estándar de los 3 valores de control obteniendo un valor de 0.043. Con estos nuevos parámetros definimos un nuevo punto de corte estándar (DO_{ce}): $DO_{ce} = 0.04 + (3 \times 0.043)$; $DO_{ce} = 0.169$.

Utilizando estos nuevos valores de referencia, la nueva clasificación de las bacterias en función de la producción de biopelícula se encuentra en la Tabla 9, los cuales están representados los parámetros de clasificación de cada una de las muestras utilizadas.

Tabla 9. Clasificación semicuantitativa de la capacidad de formación de biopelícula de BAL

Clasificación	Fórmula	Rangos
No formadoras (0)	$DO_{630} \leq DO_{ce}$	$DO \leq 0.169$
Débil (+)	$DO_c < DO_{630} \leq 2(DO_{ce})$	$(0.169 < DO \leq 0.338)$
Moderadamente (++)	$2(DO_{ce}) < DO_{630} \leq 3(DO_{ce})$	$(0.338 < DO \leq 0.507)$
Fuerte (+++)	$3(DO_{ce}) < DO_{630}$	$(0.507 < DO)$

DO: Densidad óptica de cada muestra; DO_{ce}: Punto de corte estándar del control

Es importante resaltar que fue comparada la densidad óptica de las muestras con la del control negativo y se consideró formadora de biopelícula cuando esta absorbancia fue superior a 0,169.

Los resultados obtenidos en el estudio tras el análisis y estandarización se encuentran en la Tabla 10, destacándose la muestra de BAL en un medio MRS adicionado con 0.1% de FCOA (BAL+FCOA 0.1%) como la de formación fuerte en comparación con las muestras que contenían FCOA en diferentes concentraciones (BAL+FCOA 4%, BAL+FCOA 8%, BAL+FCOA 16%) y las que sólo contenía BAL (Control BAL), por lo que mostró mayor capacidad para formar biopelícula.

Las muestras de que contenían BAL en un medio MRS adicionado con FCOA en concentraciones de 4, 8 y 16% (BAL+FCOA 4%, BAL+FCOA 8%, BAL+FCOA

16%) fueron formadoras débiles de biopelícula y la muestra que sólo contenía BAL en medio MRS (Control BAL) fue formadora moderada de formación de biopelícula.

Clasificación	Control BAL	BAL + FCOA 0.1%	BAL + FCOA 4%	BAL + FCOA .8%	BAL + FCOA 16%
No formadoras (0)					
Débil (+)			X	X	X
Moderadamente (++)	X				
Fuerte (+++)		X			

BAL: Bacterias ácido lácticas; FCOA: Fructanos comerciales originarios de agave.

Tabla 10. Clasificación de formación de biopelícula

6.3.2 Evaluación fenotípica cualitativa de la formación de Biopelículas por BAL en presencia de prebiótico en tubos de cristal

Se visualizó macroscópicamente la presencia de biopelícula en los tubos de cristal mediante tinción simple con violeta de genciana en las muestras del control de BAL (Control BAL) y las adicionadas con FCOA en las concentraciones del 0.1%, 4%, 8% y 16% (BAL+FCOA 0.1%, BAL+FCOA 4%, BAL+FCOA 8%, BAL+FCOA 16%).

Los resultados obtenidos muestran que los fructanos comerciales originarios de agave podrían modular la producción de exopolisacáridos para la formación de biopelícula por las BAL, ya que fue posible visualizarla y compararla macroscópicamente por su adhesión a la pared del tubo y la tinción.

Se valoró cualitativamente la formación de biopelícula según el tono de cristal violeta observado, no se consideró como formación de biopelícula la única formación de un anillo en la zona de fase aire-líquido. Los tubos observados con mayor coloración presente corresponden a los mayores productores de biopelícula, los tubos observados con coloración intermedia corresponden a los moderados productores de biopelícula, mientras que los tubos con menor coloración corresponden con los productores débiles de biopelícula. Únicamente en los casos en donde no puede ser determinada visualmente la presencia de coloración se considera negativa la prueba para la producción de biopelícula.

En la Figura 18 A (Control -) no se observa ninguna coloración ya que es el control negativo, los tubos no presentaban ningún inóculo bacteriano por lo que no hay presencia de formación de biopelícula.

En la muestra control del consorcio bacteriano la Figura 18 B (Control BAL) se observa formación de biopelícula moderada. En las muestras que contenían el consorcio de BAL en medio MRS adicionado con FCOA en diferentes concentraciones se puede observar que la formación de biopelícula clasificada como fuerte se encuentra en la Figura 18 C (BAL+FCOA .1%) y en las muestras en donde se encuentran los FCOA adicionados al 4, 8 y 16% en la Figura 18 D (BAL+FCOA 4%), 18 E (BAL+FCOA 8%) y 18 D (BAL+FCOA 16%) se observa formación de biopelícula débil, esto con base a la biopelícula adherida a los tubos y teñida con violeta de genciana, la cual se pudo visualizar macroscópicamente.

Se observa que los datos obtenidos en este ensayo para la clasificación cualitativa de la biopelícula son idénticos a los obtenidos en la clasificación cuantitativa de la formación de biopelícula.



A) Control -



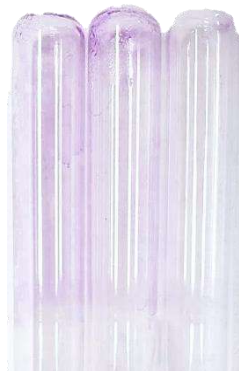
B) Control BAL



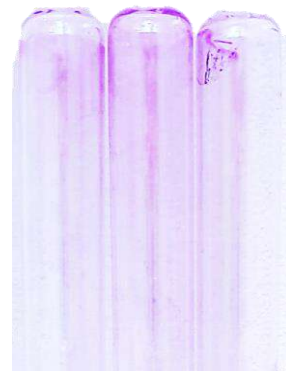
C) BAL+FCOA 0.1%



D) BAL+FCOA 4%



E) BAL+FCOA 8%



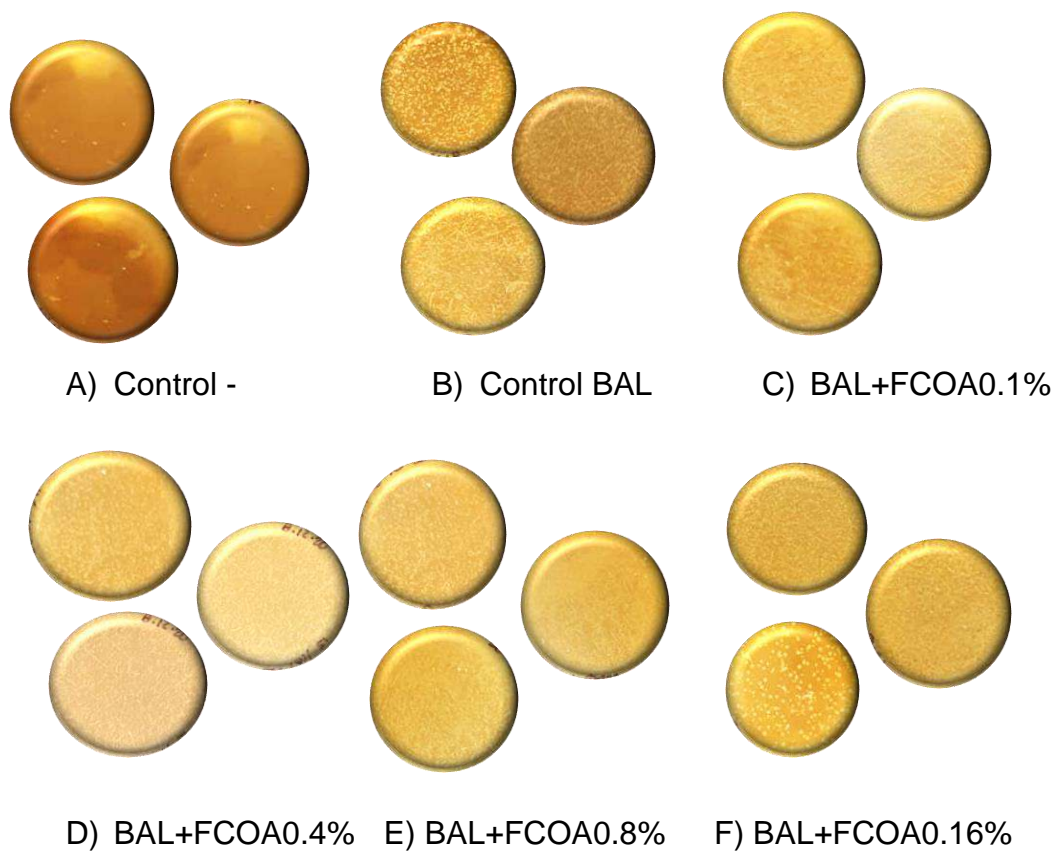
F) BAL+FCOA 16%

BAL: Bacterias ácido lácticas; FCOA: Fructanos comerciales originarios de agave

Figura 18. Adhesión y formación de biopelícula sobre tubos de ensayo de vidrio.

A) Control (-) tubo con medio MRS no inoculado pero sometido a tinción con violeta de genciana, B) Control BAL producción moderada, C) BAL+FCOA 0.1% producción fuerte y D) BAL+FCOA 4%, E) BAL+FCOA 8% y F) BAL+FCOA 16% producción débil.

Posteriormente, en la Figura 19 se puede observar el crecimiento de todas las muestras estudiadas (Control BAL, BAL+FCOA 0.1%, BAL+FCOA 4%, BAL+FCOA 8% y BAL+FCOA 16%) en medio agar MRS posterior a 24 h de incubación anaerobia, se determinó que el consorcio bacteriano de BAL sigue siendo viable después de 69 h de incubación en presencia y ausencia de los FCOA en diferentes concentraciones.



BAL: Bacterias ácido lácticas; FCOA: Fructanos comerciales originarios de agave

Figura 19. Viabilidad del consorcio bacteriano posterior a 69 h de incubación. Presencia de UFC en todas las muestras: A) Control -, B) control BAL, C) BAL+FCOA 0.1%, D) BAL+FCOA 4% E) BAL+FCOA 8% y F) BAL+FCOA 16%.

6.3.3 Determinación de las características morfológicas de biopelículas formadas utilizando microscopía óptica

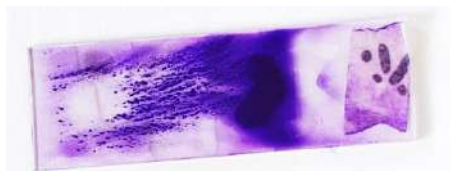
En la Figura 20 se puede distinguir a un conjunto bacteriano adherido en forma de biopelícula adherida y fijada en la superficie del portaobjetos extraído del cultivo de BAL en medio MRS (Figura 20 B Control -) y en medio MRS adicionado con FCOA en diferentes concentraciones (Figura 20 C BAL+FCOA .1%, Figura 20 D BAL+FCOA 4%, Figura 20 E BAL+FCOA 8%, Figura 20 F BAL+FCOA 16%) teñida con violeta de genciana, previo a la observación microscópica.



A) Control -



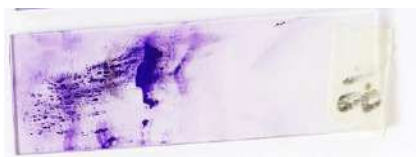
B) Control BAL



C) BAL+FCOA .1%



D) BAL+FCOA 8%



E) BAL+FCOA 16%

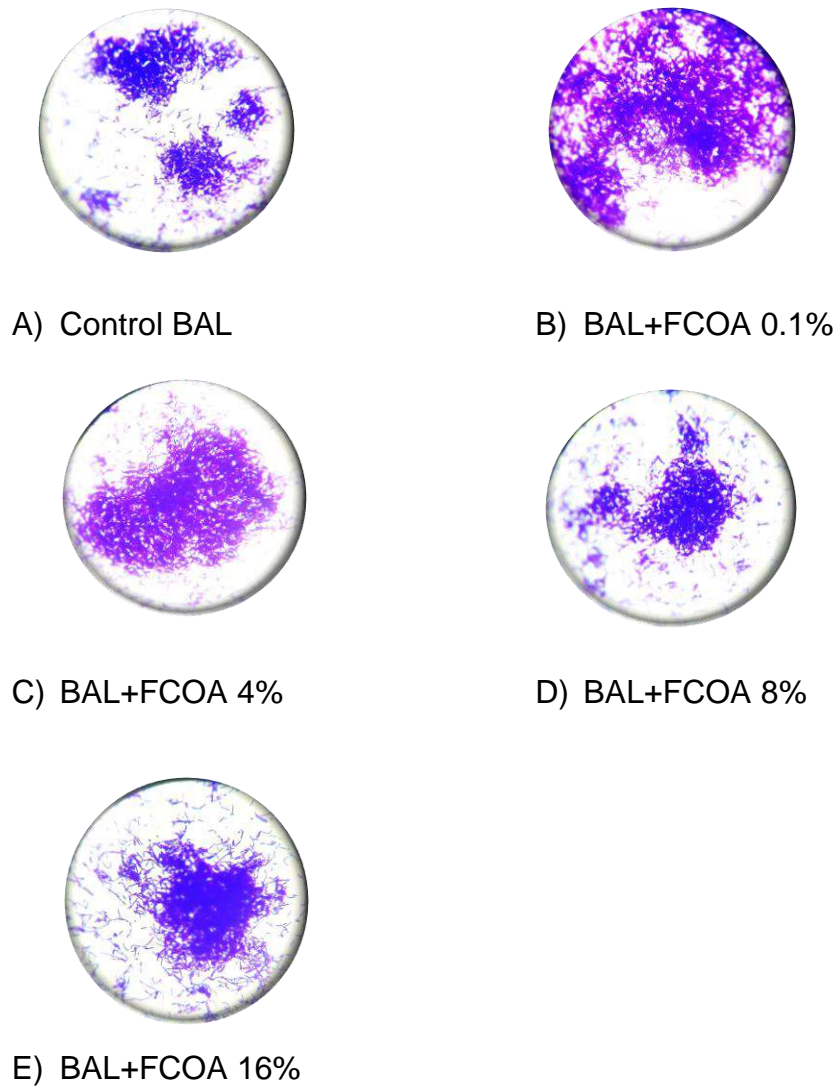


F) BAL+FCOA 16%

BAL: Bacterias ácido lácticas; FCOA: Fructanos comerciales originarios de agave

Figura 20. Adhesión y formación positiva de biopelícula sobre portaobjetos.

En la Figura 21 se encuentra la observación microscópica a 100 X de la formación de biopelícula mostrando morfológicamente aglomerados grandes en la Figura 21 B) BAL+FCOA 0.1% y Figura 21 C) BAL+FCOA 4%, se observan aglomerados medianos en la Figura 21 E) BAL+FCOA 16% y Figura 21 A) Control BAL y aglomerados pequeños en la Figura 21 D) BAL+FCOA 8%, con diferentes densidades bacterianas, de la misma forma, se puede observar que la biopelícula formada por el consorcio en presencia y ausencia de los FCOA en la Figura 21 A) control BAL, B) BAL+FCOA 0.1%, C) BAL+FCOA 4%, D) BAL+FCOA 8% y E) BAL+FCOA 16% se encuentran en la fase de maduración iniciando con la fase de dispersión, según las características visualizadas microscópicamente descritas previamente en 1965 por Egelberg et al.



BAL: Bacterias ácido lácticas; FCOA: Fructanos comerciales originarios de agave

Figura 21. Observación microscópica (100 X) de biopelícula del consorcio microbiano de BAL en presencia de FCOA. En la Figura 21 B) BAL+FCOA 0.1% y Figura 21 C) BAL+FCOA 4% se observan aglomerados grandes, en la Figura 21 E) BAL+FCOA 16% y Figura 21 A) Control BAL, se observan aglomerados medianos y en la Figura 21 D) BAL+FCOA 8% aglomerados pequeños, asimismo, todas las muestras se encuentran en la etapa de maduración de la biopelícula iniciando la fase de dispersión.

7 DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la formación de biopelícula por un consorcio microbiano de BAL compuesto por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, en presencia de FCOA en concentraciones del 0.1, 4, 8 y 16 %, obteniendo diferencias significativas en las muestras que contenían BAL+FCOA 0.1% en comparación con las muestras que solo contenía BAL y las muestras con el resto de las concentraciones.

En los últimos años se ha investigado minuciosamente las desventajas de la formación de biopelículas por bacterias Gram negativas sin embargo no se investigado extensivamente el beneficio a la salud humana de la producción de biopelículas en bacterias Gram positivas, particularmente de bacterias ácido lácticas (BAL) consideradas como probióticos.

Varios estudios han investigado la capacidad de cepas de *Lactobacillus* y su capacidad de formación de biopelículas sin embargo no se ha encontrado investigación extensiva sobre la realización de experimentos donde se evalúe la formación de biopelícula de BAL frente a un sustrato en específico, como fructanos de origen de agave, los cuales ya han sido considerados como prebióticos.

Es importante evaluar la biopelícula producida por bacterias consideradas como probióticos ya que de acuerdo con Kubota et al. (2008) la presencia de las biopelículas particularmente en BAL funciona como control frente al

asentamiento de otros microorganismos otorgando una protección frente un ambiente hostil. Según Sahed y Ahmaed (2020) las BAL consideradas como propensas a formar biopelículas corresponden a *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* GG. En este estudio nos hemos centrado en la biopelícula mixta formada por de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, de los cuales los resultados obtenidos son similares a los reportados en un estudio realizado por Z. Rezaei, et al. (2021) en donde encontraron que las cepas que formaron biopelícula fueron *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. brevis*, and *Lactobacillus Lactis* ssp. *lactis* e incluso tienen efectos antibacterianos en comparación cuando las bacterias se encuentran en forma planctónica, mostraron que el efecto antibacteriano en forma de biopelícula era más fuerte e intenso, por lo que confiere mayor supervivencia a las bacterias.

Ya se ha evidenciado que algunas BAL poseen los genes y enzimas para llevar a cabo la fermentación de fructanos para su utilización, sin embargo, existe un vacío en el conocimiento de la descripción de las funciones específicas de estos genes; también no se ha determinado qué especies de BAL tienen afinidad con sustratos en específico como los fructanos y qué concentración es viable para que se presente un efecto impactante en la producción de EPS y la formación de biopelícula.

En este estudio se utilizaron FCOA y se comprobó que el consorcio microbiano de BAL fue capaz de utilizarlos mediante la fermentación para la obtención de energía para aumentar la biomasa y para la formación de biopelícula, esto se debe a que según Probert y Gibson (2002 y Ehrmann et al. (2003) reportaron

que los géneros *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* presentan enzimas denominadas fructosil-furanosidasas, las cuales son capaces de degradar los enlaces β presentes en las estructuras químicas particularmente de los fructanos por lo que esta característica permite que se logren crecimientos en los medios donde se utilizan estos carbohidratos como fuente energética, también, Cerning et al., (1994) y Oleksy-Sobczak et al., (2020) mencionan que la fuente de carbono y nitrógeno pueden estar implicados directamente en el rendimiento y en la composición de la biosíntesis de exopolisacáridos por *Lactobacillus* para la formación de biopelícula, así también las interacciones entre distintas fuentes de carbono en un mismo medio de cultivo.

En este estudio se utilizó un tiempo de fermentación de 69 h, en un cultivo con un pH de 4 y una temperatura de 33°C. Adekemi, et al., (2018) y Wang et al., (2010) han informado que el tiempo de cultivo, la temperatura y el pH influyen en el crecimiento y la producción de EPS por BAL para la formación de biopelícula. El tiempo utilizado, se considera dentro de los parámetros de un cultivo de fermentación prolongada e incluso microscópicamente se observó que las biopelículas se encontraban en la etapa de maduración iniciando la etapa de dispersión, los valores obtenidos de la DO_{540nm} de la cuantificación de la biopelícula (en la mayoría de los estudios, la formación de biopelículas por diferentes especies de microorganismos es estimada por las DO obtenidas después de la tinción de las bacterias adheridas con a superficies y el uso de colorantes que indican la biomasa tota) se vio reflejada una disminución en la producción de biopelícula de las muestras de BAL+FCOA 4%, BAL+FCOA 8% Y BAL+FCOA 16% ya que se consideran como formadores de biopelícula débil,

esto puede ser resultado de la presencia de enzimas producidas por las bacterias que degraden la biopelícula, ya que Pham et al., 2000 han informado por primera vez que las hidrolasas de glucósidos aparecen al final de la fase de crecimiento logarítmico y en la fase de declive de los cultivos de *L. rhamnosus* R, lo que puede explicar la razón de la degradación de EPS de bacterias ácido lácticas en cultivos prolongados, estos resultados fueron confirmados por Tsuda & Miyamoto, (2010) y L. Zhang et al., (2013) ya que observaron que la disminución en las cantidades de EPS para la formación de biopelícula después de una incubación prolongada para diferentes cepas de *Lactobacillus* productoras de EPS, se debía por la acción de las glucohidrolasas en el cultivo ya que catalizan la degradación de los exopolisacáridos. De la misma forma Lin & Chien, (2007); Yang et al., (2010) mencionan que la posible presencia de glucohidrolasas en el medio de fermentación, hidrolizando EPS a monómeros, podría causar tal disminución en el rendimiento de EPS durante la fermentación prolongada por lo tanto la disminución en la formación de biopelícula.

Sin embargo, Yang et al., (2004), Reisner et al., (2006), Skyberg et al., (2006) reportan que en un estudio que realizaron la cantidad de biopelícula fue sensiblemente mayor en los medios mínimos, tal como se obtuvo en el presente estudio, lo que está de acuerdo con estudios publicados anteriormente mostrando que tanto la adherencia bacteriana como la formación de biopelícula son estimuladas en condiciones de escasez de nutrientes en el medio. No obstante, este aspecto también está controvertido y otros autores han descrito una intensa formación de biopelículas por ejemplo en *E. coli* en caldo LB y una baja formación en caldos mínimos suplementados con una única fuente de

carbono como glucosa o glicerol, sin embargo, no se han realizado suficientes ensayos en bacterias Gram positivas. Pratt y Kolter, (1998) sugirieron que diferencias en la metodología principalmente en la presencia de un sustrato en particular, influyen en el comportamiento de las cepas estudiadas en cada ensayo.

Referente al análisis de las biopelículas mediante microscopía óptica, el método fue muy limitado porque la amplificación de 100 X no permitió una observación detallada de las estructuras superficiales, sin embargo este tipo de microscopía ayudó a comprobar que las biopelículas formadas se encontraban en la etapa de maduración iniciando la fase de dispersión lo que permite comprender los valores obtenidos en la cuantificación de la biopelícula, ya que en la etapa de dispersión las bacterias migran para formar biopelícula en otra superficie sin embargo, pueden no lograr adherirse a la superficie y ser eliminadas en el proceso de decantación, previo a la cuantificación de la biopelícula adherida, obteniendo valores menores de densidad óptica.

Los diferentes resultados encontrados en las diferentes concentraciones utilizadas indican que las condiciones experimentales son fundamentales y que es necesario seguir evaluando con diferentes concentraciones de FCOA y distintos tiempos de fermentación para que se pueda comparar la actividad *in vitro* de los BAL con los resultados obtenidos en este proyecto.

8 CONCLUSIÓN

La importancia de la microbiota intestinal y su correlación con la obesidad se ha vuelto un tema importante en las ciencias de la salud, a partir de las vías metabólicas se ha ampliado la visión sobre cuáles son las causas del desequilibrio de la microbiota intestinal y con ello el desarrollo de la obesidad, sin embargo, al considerarse una condición multifactorial este vínculo sigue siendo muy complejo. Cada día se diseñan estrategias terapéuticas para tratar la obesidad y sus manifestaciones clínicas consideradas como factores de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) las cuales se han relacionado con el desequilibrio de la microbiota intestinal. En este estudio se realizó un ensayo *in vitro*, sin embargo los hallazgos obtenidos implican la posibilidad de modular la microbiota intestinal existente en particular bacterias ácido lácticas las cuales permitan prevenir o tratar la obesidad, ya que se demostró estadísticamente que la utilización de prebiótico como fructanos comerciales originarios de agave en una concentración del 0.1%, que además de los beneficios reportados en la literatura, fueron capaces de estimular la formación de biopelícula de tipo fuerte por un consorcio bacteriano compuesto por bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* lo que les confiere mayor supervivencia de las bacterias y con ello puedan realizar funciones benéficas para la salud humana.

9 PERSPECTIVAS

Se sugiere que se lleven a cabo más experimentos sobre la determinación de la interacción molecular entre BAL y FCOA, ensayos *in vitro* donde se evalúen más concentraciones de FCOA adicionados al medio MRS y en diferentes tiempos de fermentación, también ensayos que permitan describir la influencia de los prebióticos en la formación de biopelículas por BAL en condiciones que sean equivalentes a las que experimenta esa particular biopelícula cuando se desarrolla a nivel intestinal y determinar la viabilidad de la combinación de un consorcio microbiano de BAL y fructanos comerciales originarios de agave en la industria alimentaria para generar alimentos con un perfil más saludable

10 REFERENCIAS

1. Rivera JA, Barquera S, González-Cossío T, Olaiz G, Sepúlveda J. Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutr Rev.* 2004;62(7 II):8–12.
2. Organización Mundial de la Salud [OMS]. OMS | Obesidad. Who. 2016.
3. Herbert-Tilg MD. Obesity, Metabolic Syndrome, and Microbiota Multiple Interactions. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44(September):16–8.
4. Hao WL, Lee YK. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol Biol.* 2004;268(3):491–502.
5. Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):996–1047.
6. Córdova-Villalobos JÁ, Barriguete-Meléndez JA, Lara-Esqueda A, Barquera S, Rosas-Peralta M, Hernández-Ávila M. Chronic noncommunicable diseases in Mexico: epidemiological synopsis and comprehensive prevention. *Salud Publica Mex [Internet].* 2008;50(5):419–27. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=19112>
7. Epping-Jordan JAE, Galea G, Tukuitonga C, Beaglehole R. Preventing chronic diseases: Taking stepwise action. *Lancet.* 2005;366(9497):1667–71.
8. Córdova-villalobos JÁ, Esp M, Barriguete-meléndez JA, Lara-esqueda A,

- Barquera S, Rosas-peralta M, et al. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México. 2008;50(5):419–27.
9. Gerstein HC, Yusuf S, Mann JFE, Hoogwerf B, Zinman B, Held C, et al. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: Results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet*. 2000;355(9200):253–9.
 10. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9326):7–22.
 11. Fernández IF. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *FMC Form Medica Contin en Aten Primaria*. 2007;14(3):192.
 12. Suárez-Carmona W, Sánchez-Oliver AJ, González-Jurado JA. Pathophysiology of obesity: Current view. *Rev Chil Nutr*. 2017;44(3):226–33.
 13. Maternity F, Thapa S, Neupane S, Xia A, Zhang Y, Xu JJ, et al. NORMA Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2017, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad. *Int Rev Immunol [Internet]*. 2018;66(1):1–15. Disponible en:
<https://doi.org/10.3109/08830185.2014.902452>
https://www.bertelsmann-stiftung.de/fileadmin/files/BSt/Publikationen/GrauePublikationen/MT_Glob

alization_Report_2018.pdf%0Ahttp://eprints.lse.ac.uk/43447/1/India_globalisation%2C_society_and_inequalities%28I

14. Hughes R. EL CORAZÓN DEL OBESO. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2008. 287 p.
15. García Milian AJ, Creus García ED. La obesidad como factor de riesgo, sus determinantes y tratamiento. Rev Cuba Med Gen Integr [Internet]. 2016 [citado el 30 de noviembre de 2019];32(3):0–0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252016000300011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
16. Ткач М. Obesidad en México. Recomendaciones para una política de Estado. 2013.
17. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444(7122):1027–31.
18. Oliveira G, González-molero I. Endocrinología y Nutrición Actualización de probióticos , prebióticos y simbióticos. 2016;63(9):482–94.
19. Agudelo Ochoa GM, Giraldo Giraldo NA, Barrera Causil CJ, Valdés Duque BE. Microbiota intestinal y ácidos grasos de cadena corta en pacientes críticos. Perspect en Nutr Humana. 2017;18(2):205–22.
20. Yeste D, Carrascosa A. Complicaciones metabólicas de la obesidad infantil. An Pediatr. 2011;75(2).
21. Sebastián JJ, Sánchez C. De la flora intestinal al microbioma. Rev

- Española Enfermedades Dig. 2017;110(1):51–6.
22. de Vos WM, De Vos EAJ. Role of the intestinal microbiome in health and disease: From correlation to causation. *Nutr Rev.* 2012;70(SUPPL. 1):45–56.
 23. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* [Internet]. 2012;486(7402):207–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11234>
 24. Wright D. Lemierre's Syndrome in an Adult: A Case Review. *Otolaryngology.* 2014;04(02):4–6.
 25. Castañeda Guillot CD. Microbiota intestinal, probióticos y prebióticos. *Enfermería Investig Investig Vinculación, Docencia y Gestión.* 2017;2(4, Dic):156–60.
 26. Cien T, Libros TDE, Colaboradoras E. Microbioma humano : un universo en nuestro interior. 2018;1–15.
 27. Linares R, Leve FA, Jah MK, Crassidis JL. Space object mass-specific inertia matrix estimation from photometric data. *Adv Astronaut Sci.* 2012;144:41–54.
 28. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: Links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes.* 2010;59(12):3049–57.

29. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070–5.
30. Bik EM. Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr Rev*. 2009;67(SUPPL. 2).
31. Shimizu K, Ogura H, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, Tasaki O, et al. Probiotic/synbiotic therapy for treating critically ill patients from a gut microbiota perspective. *Dig Dis Sci*. 2013;58(1):23–32.
32. Su X, Xue Y, Wei J, Huo X, Gong Y, Zhang H, et al. Establishment and characterization of gc-006-03, a novel human signet ring cell gastric cancer cell line derived from metastatic ascites. *J Cancer*. 2018;9(18):3236–46.
33. María Magdalena Farías N, Catalina Silva B, Jaime Rozowski N. Microbiota intestinal: Rol en obesidad gut microbiota: Role in obesity. *Rev Chil Nutr*. 2011;38(2):228–33.
34. Salvo-Romero E, Alonso-Cotoner C, Pardo-Camacho C, Casado-Bedmar M, Vicario M. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2015;107(11):686–96.
35. Caricilli AM. Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014;5(1):18.

36. Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 2011;32(6):256–64.
37. Guarner F, Sanders ME, Eliakim R, Fedorak R, Gangl A, Garisch J, et al. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. *World Gastroenterol Organ* [Internet]. 2017;35. Disponible en:
<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf>
38. Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int J Food Microbiol.* 2004;97(2):147–56.
39. Gilliland SE. Downloaded from <https://academic.oup.com/femsre/article-abstract/7/1-2/175/510108> by guest on 06 October 2018 Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. 1990;87:175–88.
40. José Carmen Ramírez Ramírez¹, Petra Rosas Ulloa², Martha Yanira Velázquez González¹, José Armando Ulloa² FAR. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Rev Fuente Año.* 2011;2(9):1–16.
41. KANDLER O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *An tonie van Leeuwenhoek.* 1983;49(3):209–24.
42. Ramírez-Mata A, Fernández-Domínguez IJ, Nuñez-Reza KJ, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: Quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2014;46(3):242–55. Disponible en:

[http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70079-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70079-3)

43. Barbara GLBGL. @Hans Memling : master painter in fifteenth-century Bruges Barbara G. Lane. 2009;64(4):386.
44. Spormann AM, Thormann K, Saville R, Shukla S, Entcheva P. Microbial biofilms. *Nanoscale Technol Biol Syst*. 2004;341–57.
45. Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol*. 2005;13(1):20–6.
46. De Vuyst L, De Vin F, Vanningelgem F, Degeest B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J*. 2001;11(9):687–707.
47. Li YH, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*. 2012;12(3):2519–38.
48. Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK, Bassler BL. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*. 2002;110(3):303–14.
49. Ng W-L, Bassler BL. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu Rev Genet*. 2009;43(1):197–222.
50. Han YZ, Zhou CC, Xu YY, Yao JX, Chi Z, Chi ZM, et al. High-efficient production of fructo-oligosaccharides from inulin by a two-stage bioprocess using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain. *Carbohydr Polym [Internet]*. 2017;173:592–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.043>

51. Espinosa H, García E, Gastélum E. Los compuestos bioactivos y tecnologías de extracción [Internet]. Nanobio. 2016. 114 p. Disponible en: https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b85320f15.pdf#page=115
52. Noack J, Timm D, Hospattankar A, Slavin J. Fermentation profiles of wheat dextrin, Inulin and partially hydrolyzed guar gum using an in Vitro digestion pretreatment and in Vitro batch fermentation system model. *Nutrients*. 2013;5(5):1500–10.
53. Bengmark S, Mesa MD, Gil A. Plant-derived health - the effects of turmeric and curcuminoids. 2009;24(3):273–81.
54. Guillot CC. Actualización en prebióticos. *Rev Cubana Pediatr*. 2018;90(4).
55. Hygreeva D, Pandey MC, Radhakrishna K. Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products [Internet]. Vol. 98, *Meat Science*. Elsevier B.V.; 2014. 47–57 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.04.006>
56. Luckow T, Delahunty C. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Res Int*. 2004;37(8):805–14.
57. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Caballero V, Castellano V. Assessment of prebiotics and probiotics: An overview [Internet]. First edit. *Bioactive Foods in Promoting Health*. Elsevier Inc.; 2010. 19–41 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374938-3.00002-5>

58. Franc J, Mabeau S, Corre L. Changes in inulin and soluble sugar concentration in artichokes (*Cynara scolymus* L .) during storage Ga elle and C eline. 2010;(January):1203–9.
59. Carranza CO, Fernandez AÁ, Bustillo GR. Processing of Fructans and Oligosaccharides from Agave Plants [Internet]. Processing and Impact on Active Components in Food. Elsevier Inc.; 2015. 121–129 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00015-9>
60. Samanta AK, Jayapal N, Senani S, Kolte AP, Sridhar M. Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Brazilian J Microbiol.* 2013;44(1):1–14.
61. Diferentes EN, Bifidobacterias CDE. EFECTO PREBIÓTICO DE DEXTRINA MODIFICADA E INULINA DE AGAVE EN DIFERENTES CEPAS DE BIFIDOBACRTERIAS. :2–7.
62. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *Br J Nutr.* 2010;104(SUPPL.2).
63. Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, Prévost H, Connil N, Chobert JM, et al. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol [Internet].* 2013;36(2):296–304. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.010>
64. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125(6):1401–12.

65. Ibarra-Trujillo C, Villar-Vidal M, Gaitán-Cepeda LA, Pozos-Guillen A, Mendoza-de Elias R, Sánchez-Vargas LO. Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Iberoam Micol.* 2012;29(4):214–22.
66. Mahdavi M, Jalali M, Kasra KR. The Assessment of Biofilm Formation in Iranian Meat Processing Environments. *Res J Microbiol.* 2008;3(3):181–6.
67. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000;40(2):175–9.
68. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Bonaventura G DI, Djukic S, Ruzicka F, et al. The Authors Printed in Denmark. All rights Reserv J Compil C. 2007;115:891–900.

11 ANEXOS

11.1 Votos aprobatorios



FACULTAD DE NUTRICIÓN



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN. Voto Sinodal.

COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la licenciada Condado Huerta Mary Carmen Citlally, estudiantede la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033871, y que lleva portítulo “EVALUACIÓN DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PRESENCIA DE FRUCTANOS COMERCIALES ORIGINARIOS DE AGAVE” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente: La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el jurado correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

DRA. DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO
PITC-FACULTAD DE NUTRICIÓN

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 17 días del mes de junio del 2022



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DELIA VANESSA LOPEZ GUERRERO | Fecha: 2022-06-17 20:20:59 | Firmante
POluBK6KId8DE78OlgGTKcgizy4o2kDzcUthlLIGWJxsxrJbjFuevirw+blHJT0Kx8C59YukBMeklxgiC1wf3R53nxQwrB9ZvAwV6wXanN54odb2VAzbMUIFqzMw4bhkRFFAbli/nN1G
CmZ8cKR+9m5ZsbenX957pQZUQyy/1TC-DGv6V7ENcLV1/PEnAID1LI1aH55ryEB1MDgMi-1X3Hki0d0ALiKeE9R500nJhMJS76bEZcK36IO:0DN7MIFFVVK2ywnx1353QTiJ
wWVtBoMFI0YfHtq0CbM6WAvXvZLjg48o2i1UJukTmdSzaqYGpWQSTUqQ0ISmWYhw==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

dWyyHTM1Q

<https://efirma.uaem.mx/NoRepudio/BFyitSImIot2W8y4YbPqfPX5SuQVXza>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la licenciada Condado Huerta Mary Carmen Citlaly, estudiantede la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033871, y que lleva portítulo "EVALUACIÓN DE FORMACIÓN DE BIOPELICULAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PRESENCIA DE FRUCTANOS COMERCIALES ORIGINARIOS DE AGAVE" ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

1. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente


D. en C. Haydee Martínez Plascencia
Sinodal (Titular).

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 16 días del mes de junio del 2022.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

HAYDEE MARTÍNEZ PLASCENCIA | Fecha:2022-06-20 15:53:58 | Firmante

hfihE15QdE1jrAvrF5k4UyIucVV/CJEkav+mZSvxsMd4VCbPpZzuoYy1SsyTiv7DTcX8ejagh+lInuzp93EZzqbpGe249GMyu3o0PQw10S8ifGrflVYd8G+s3KB3WKI9advGJE45Nq185A Cz+iYgkWhnQhQa5ns5gEWp4V56oTFeR9/cQx/6AJYuL5v5CtrygEzLXbPrWGfgSAWBBuhbjfJgaKehDu5QN2AB1QijVBBiGStaqEBihnvpiEaHpltapTa1egpcP+p34xM2U2cMdy n8QRYyFrib+HGUzwqJf74l2oNvVS0w/wmdhjZ0mSYLhCUoUU8t65lIFrC5DtuA18Ww==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Zuh3QVnKR

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/XH7JbfAPaculpOv/k1CSoqHMIIHz8lfNN>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Voto Sinodal.**


**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la licenciada Condado Huerta Mary Carmen Citlally, estudiantede la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033871, y que lleva portítulo “EVALUACIÓN DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PRESENCIA DE FRUCTANOS COMERCIALES ORIGINARIOS DE AGAVE” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente



Dr (a).Guillermina Ávila Ramírez
Sinodal (Titular/Suplente).

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los días del mes de junio del 2022



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GUILLERMINA AVILA RAMIREZ | Fecha:2022-06-20 20:44:54 | Firmante

eDQL9W43izM7izfMK1/kOyx9wDocagNuPGDa0nFTWafyllSBLzApzEY42OPoOKyFYpo4Ji3i7RPoQTzOTdvJxtN+m7h1uMGOOWoFDtc8TvCvIVJMrDHLQnQwkvqWkFQoaxm vOAJuyZxB376eSYHjSqDtdhCveETMfywA4jZi+dnG8MORlc6Xia90AGAs/lj3VWXR5AuSAQJvzN6iV2d3T/A8X5sqDi0qkOeba212Vlg47KBxNPLBPKLxxsQBzLD2m93CkqwqF UZE962Kqn1xcGlpx78gbxh90+myKSBKrE6ikHaC2cBv8cUj7ZfzGAD1mWMEILIGHHy2INT0Lw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[RwFWknlq9](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/aoPLZXUVYcct7pXc5Yk8CcVfjDGsxDSf>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE NUTRICIÓN

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la licenciada Condado Huerta Mary Carmen Citlally, estudiantede la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033871, y que lleva portítulo “EVALUACIÓN DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PRESENCIA DE FRUCTANOS COMERCIALES ORIGINARIOS DE AGAVE” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente


Dra. Ollin Celeste Martínez Ramírez
Suplente

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 16_días del mes de junio del 2022

Calle Iztaccíhuatl Núm. 100 Col. Los Volcanes, Cuernavaca, Mor., C.P. 62350
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 7951 315 04 35 / academicanutricion@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

OLLIN CELESTE MARTINEZ RAMIREZ | Fecha:2022-06-16 13:22:00 | Firmante
QGYAdl6v/745JcUNX9fX4xg5x74a709F5+vejN5wAHdLTeyMPZ3TRvyXkMk3Zchfa9Ww+OyOvURopDucSKXJR5V7MQRG8zUUUuggabhVA1bG6tHAZgan8GRYhTOVrtUIE1m
3WOP48GiqQkoBMMK/T09yxVADUEy8mEQwq+INqJvow32B3pZy+X82QZG2ndOwF5fS006te0dC0Ckbm4Fcm2zEvFRtB1pzmDtd/XO9oeiAwztl2nG+Fn+xdQM4JgXklFdYJ
pseudmvQp2soQLwHc5ICRTq4qRi+Q8Dwd7qD6ULzXNjuXPg68VXfvFxcde9FTtIAS5V9HmsleCw=

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



U87Rt2Hgu

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hMyPq2SQtb7SgULakYja6pfZgxUDfXid>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN.
Voto Sinodal.**

**COMISIÓN ACADÉMICA DE
LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA NUTRICIÓN
PRESENTE**

Toda vez que el trabajo de Tesis realizado por la licenciada Condado Huerta Mary Carmen Citlally, estudiante de la Maestría en Ciencias de la Nutrición, con número de matrícula 10033871, y que lleva por título “EVALUACIÓN DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PRESENCIA DE FRUCTANOS COMERCIALES ORIGINARIOS DE AGAVE” ha sido revisado a satisfacción me permito en mi carácter como miembro de la Comisión Revisora comunicar lo siguiente:

- I. La tesis se aprueba, dado que reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente.

Sin otro particular, agradezco la atención que sirva prestar a la presente.

Atentamente

Dr(a).

Sinodal (Suplente).

Dr. Heriberto Manuel Rivera

Este documento esta firmado de forma electrónica

Firmo para lo que resulte conducente, en la ciudad de Cuernavaca Morelos, a los 20 días del mes de junio del 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

HERIBERTO MANUEL RIVERA | Fecha: 2022-06-20 11:55:37 | Firmante

mXd4sE0YXNmekJIsRdb3QBJCgzw+n15cOmMbKNar6+EYwcyJdyhLFYcZfdsRgSzzAwG+KfuLQPhinyt9VmEGBY6x5w2yZnlusjfvEXuEFop5VCjJ3TGIUWedv0Ut3CU2sdZd
tA0CMXXy4QG6i9iFWT73XK8M7G30wvqjZngxv385dkmmK/IZLk3LcY7bXVd+cvazyzRJs4UMg7+WBPSu0x1VLd8ijrzZslqJrhXi0ZUqorjyW5mVoCPLSSP1zUyCfWnF+FazSIJDC
62lpLWIN2NKQp8x0LRqtpSqKzr+/AsPXBmeuNRxy/W8SzVMt635pl2pkUL8v+qw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



5Vq4JRcUG

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/a30lCeTxPkWFQ3K90Lldyel1TKR7bsRe>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORIA
2017-2023