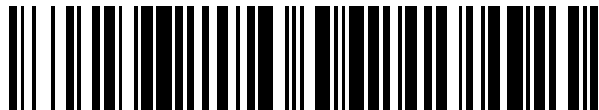


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 793**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/CA2012/050641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13037067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12832589 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2756071**

54 Título: **Complementos de medio y métodos para cultivar microorganismos anaerobios gastrointestinales humanos**

30 Prioridad:  
**14.09.2011 US 201161534456 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.04.2018**

73 Titular/es:  
**NUBIYOTA LLC (100.0%)  
66 Old Newbridge Rd.  
Teaneck, NJ 07666-2230, US**

72 Inventor/es:  
**ALLEN-VERCOE, EMMA y  
MCDONALD, JULIE**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 662 793 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Complementos de medio y métodos para cultivar microorganismos anaerobios gastrointestinales humanos

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a métodos para preparar un complemento de medio para cultivar bacterias anaerobias y a métodos para aislar bacterias anaerobias del intestino humano.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El intestino humano es el ecosistema más densamente poblado de la Tierra (Marchesi y Shanahan, 2007). Al igual que otros ecosistemas microbianos complejos, la microbiota humana no se ha muestreado hasta su finalización (Eckburg et al., 2005). Esto se debe a que las especies individuales de la microbiota intestinal son difíciles de cultivar axénicamente *in vitro* (Hart et al., 2002). De hecho, de las más de 500 especies bacterianas que colonizan el tracto intestinal humano, aproximadamente el 75 % no se han cultivado utilizando técnicas convencionales (Duncan et al., 2007, Eckburg et al., 2005, Hayashi et al., 2002). Se reconoce que se requieren técnicas de cultivo novedosas para cultivar estos microorganismos "no cultivables".

20 Los estudios de la microbiota intestinal se han visto obstaculizados por la falta de sistemas modelo. Si bien los modelos *in vivo* pueden proporcionar a los investigadores modelos experimentales fisiológicamente relevantes, tienen varios inconvenientes. Por ejemplo, diferentes participantes del estudio pueden tener cada uno perfiles comunitarios únicos y específicos del huésped que representan su microbiota intestinal, dificultando la comparación de la microbiota intestinal entre los sujetos, especialmente cuando se intenta correlacionar los efectos de un tratamiento con los cambios en la microbiota intestinal. Los modelos *in vivo* también suelen limitar la monitorización dinámica de la microbiota intestinal derivando sus datos de las mediciones del criterio de valoración. Los experimentos con seres humanos o animales requieren una aprobación ética de la investigación que puede limitar los experimentos realizados en la microbiota intestinal de un individuo *in vivo*.

30 En un intento por mejorar los inconvenientes de los modelos *in vivo*, se han desarrollado varios modelos *in vitro*. Estos sistemas *in vitro* van desde simples recipientes de cultivo discontinuo hasta complejos cultivos continuos o sistemas de "quimiostato" (Macfarlane, G.T. y Macfarlane, S., Curr. Opin. Biotechnol., 18(2): 156-62, 2007). Mediante el uso de quimiostatos, las comunidades sembradas a partir de heces frescas pueden alcanzar un estado estable que se asemeja mucho a las comunidades de intestino distal *in vivo*. Siendo un sistema libre de huéspedes, los quimiostatos que soportan la microbiota intestinal son recipientes ideales para estudiar las alteraciones microbianas que son resultado directamente de la adición de estímulos exógenos aislados de los efectos de estos estímulos en la fisiología del huésped, haciéndolos útiles para estudios mecanísticos (Macfarlane, G.T. y Macfarlane, S., Curr. Opin. Biotechnol., 18(2): 156-62, 2007).

40 Los modelos *in vitro* también proporcionan varias otras ventajas sobre los modelos *in vivo* en estudios de la microbiota intestinal humana. Los estudios *in vitro* generalmente son económicos y fáciles de configurar. También permiten el control estricto de los factores que influyen en el entorno al mismo tiempo que facilitan el muestreo frecuente y simple de las comunidades intestinales simuladas. Sin embargo, mientras que los quimiostatos proporcionan una herramienta útil para investigar la ecología microbiana del intestino, los parámetros operativos varían ampliamente entre diferentes modelos en diferentes laboratorios, a menudo sin validación experimental. La preparación del inóculo, la composición de los medios y el tiempo de retención del recipiente son parámetros que pueden variar entre diferentes estudios.

50 Para representar un modelo válido del intestino distal humano, las comunidades que se desarrollan dentro de los recipientes del quimiostato deberían compartir cierta similitud con el inóculo fecal del que se obtuvo la comunidad intestinal. El ecosistema microbiano del intestino es una comunidad muy diversa y, por lo tanto, es importante que las comunidades cultivadas en sistemas artificiales también retengan un alto nivel de diversidad (incluida la riqueza y equidad de las especies). Finalmente, la reproducibilidad y estabilidad de estas comunidades debe establecerse y caracterizarse antes de que pueda comenzar la experimentación. Esto significa que las comunidades microbianas desarrolladas dentro de estos modelos deben analizarse exhaustivamente y compararse con las comunidades *in vivo* antes de que se pueda confirmar la validez de un sistema.

60 Pultz et al (FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 241: 2, pág. 201-205) describen la inhibición de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina mediante un cultivo de flujo continuo *in vitro* que contiene microflora de heces humanas.

Wilson et al (INFECTION + IMMUNITY, 56: 10, pág. 2610-2614) describen el papel de la competencia por nutrientes en la supresión de *Clostridium difficile* por la microflora colónica.

65 Feter et al (INFECTION AND IMMUNITY, 39: 2, pág. 676-685) describen mecanismos que controlan poblaciones bacterianas en modelos de cultivo de flujo continuo de flora intestinal grande de ratón.

MacFarlane et al (J. App. Bacteriology, 66, pág. 407-417) describen la influencia de la mucina sobre las actividades de glicosidasa, proteasa y arilamidasa de bacterias humanas cultivadas en un sistema de cultivo continuo de 3 etapas.

5 El quimiostato y las comunidades fecales se pueden controlar usando métodos moleculares tales como electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE). Actualmente, hay una falta de estandarización entre los métodos de análisis por DGGE utilizados en diferentes laboratorios de investigación. Los métodos de análisis por DGGE varían desde la inspección visual hasta métodos que utilizan software de análisis estadístico (tales como GelCompar™, BioNumerics, GeneTools, Quantity One™, etc.). El control de las comunidades que usan software  
10 informático permite un análisis más fiable y detallado de los geles de DGGE y proporciona más datos sobre la composición y estructura de las comunidades microbianas, la estabilidad de la comunidad, y la similitud entre los perfiles. Sin embargo, los laboratorios que utilizan estos programas de análisis no usan métodos consistentes al analizar sus geles de DGGE e informan de datos variables en sus comunidades. Si el análisis de los geles de DGGE puede estandarizarse, entonces esto facilitará la comparación entre las comunidades de quimiostatos de diferentes  
15 laboratorios.

Por lo tanto, sería deseable proporcionar modelos de quimiostato del intestino distal humano que sean estables, reproducibles y biológicamente significativos, así como métodos más completos para la evaluación y verificación de dichos modelos.

20

## RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan en el presente documento métodos que comprenden cultivar microorganismos que normalmente viven en el intestino grueso humano. Los métodos para desarrollar y caracterizar comunidades microbianas del  
25 colon distal humano y para evaluar y/o verificar dichas comunidades se describen en el presente documento.

En un aspecto, los métodos proporcionados comprenden cultivar microorganismos del colon distal humano usando un complemento de medio denominado "Oro líquido (*Liquid Gold*)". Oro líquido se refiere a un filtrado de 0,2 µm de medio de cultivo agotado o efluente de un recipiente de quimiostato en el que se cultiva un ecosistema diana. Se usa  
30 Oro líquido para complementar medios de cultivo, por ejemplo, medios de laboratorio estándar. La suplementación con Oro líquido permite el cultivo de microorganismos "no cultivables", es decir, microorganismos que son refractarios al cultivo axénicamente utilizando métodos tradicionales. Sin desear quedar limitado por la teoría, se cree que el Oro líquido proporciona "señales de crecimiento" a los microbios no cultivados previamente para potenciar su crecimiento axénico *in vitro* y, por lo tanto, permitir que se cultiven y crezcan *in vitro*. Se sabe en la técnica que ciertos microbios pueden crecer bien dentro de un ecosistema microbiano, pero son refractarios al crecimiento en aislamiento; presumiblemente la comunidad bacteriana más grande en el ecosistema de alguna manera "soporta" el crecimiento de los microbios. Se indica en el presente documento que este soporte puede proporcionarse por el Oro líquido para permitir el aislamiento de ciertos microbios y para establecer su crecimiento como un aislado puro *in vitro*, separado del resto del ecosistema.  
40

Por lo tanto, en un aspecto se proporciona un método para cultivar bacterias anaerobias que comprende cultivar las bacterias en un quimiostato en condiciones que replican el tracto gastrointestinal del colon humano normal en equilibrio y luego purificar bacterias anaerobias individuales en aislados puros.

45 Los métodos proporcionan el uso de comunidades microbianas del colon distal humano. Los métodos proporcionan el uso de un modelo de quimiostato de etapa única del intestino distal humano. En una realización, las comunidades microbianas son estables, reproducibles y/o biológicamente significativas.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método para preparar un complemento de medio para cultivar microbios denominado "Oro líquido". "Oro líquido" se refiere a un efluente filtrado del quimiostato, es decir, el efluente expulsado del quimiostato a través de diferenciales de presión; gotea en botellas estériles, alojadas detrás del quimiostato, a través de tubos. Cuando la botella está llena, se sella y puede almacenarse a + 4 °C hasta que se necesite. El efluente se pasa a través de un filtro de 0,2 µm, por ejemplo, de 0,22 µm (Durapore, Millipore, Estados Unidos), para eliminar las células bacterianas y producir Oro líquido sin células, que se utiliza para complementar el  
50 medio de cultivo (generalmente se añade al 1 % v/v, 3 % v/v, 5 % v/v, 7 % v/v o 10 % v/v). El Oro líquido es esencialmente un sobrenadante de un cultivo de microbios, que contiene una plétora de moléculas de señalización, factores de crecimiento, etc. En una realización, se usa Oro líquido para complementar el medio de cultivo al 3 % v/v. Debe entenderse que el Oro líquido diferirá dependiendo de la comunidad microbiana a partir de la cual se produce.  
60

En una realización, se proporciona un método para preparar un complemento de medio para cultivar bacterias anaerobias, comprendiendo el complemento de medio un filtrado de efluente de un recipiente de quimiostato en el que se ha cultivado un ecosistema bacteriano diana. El filtrado puede ser, por ejemplo, un filtrado de 0,2 µm. El medio de cultivo en el que se cultiva el ecosistema bacteriano diana es el Medio 1. En una realización, el medio de cultivo comprende mucina. La mucina puede estar presente en el medio de cultivo a una concentración de aproximadamente el 1-10 %. En una realización, la mucina está presente en el medio de cultivo a una concentración  
65

de 4 g/l. En una realización, se ha cultivado una muestra fecal humana en el quimiostato. La muestra de materia fecal humana puede ser, por ejemplo, un sobrenadante de suspensión fecal al 10 % p/v o un sobrenadante de suspensión fecal al 20 % p/v. El ecosistema bacteriano diana que se cultiva en el quimiostato es una comunidad experimental definida 1 (DEC-1), comunidad experimental definida 2 (DEC-2) o comunidad experimental definida 3 (DEC-3). En otra realización más, el ecosistema diana que se cultiva en el quimiostato comprende una comunidad de cepas bacterianas que representa un enterotipo de intestino humano, en donde el enterotipo es el enterotipo *Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococcus*. En otra realización, las bacterias anaerobias son bacterias que se encuentran en el microbioma intestinal humano.

10 El recipiente de quimiostato usado en los métodos de la invención es un quimiostato de una sola etapa.

Como tal, la invención proporciona un método para preparar un complemento de medio para cultivar bacterias anaerobias, en el que el método comprende las etapas de: a) cultivar un ecosistema bacteriano diana en un medio de cultivo en un quimiostato de una sola etapa en condiciones que replican el tracto gastrointestinal del colon humano normal, en equilibrio; b) recoger el efluente del quimiostato; y c) filtrar el efluente a través de un filtro de 0,2 µm para eliminar las células bacterianas, a fin de producir el complemento de medio. En una realización, el método para preparar el complemento de medio comprende además una etapa para centrifugar el efluente a 14.000 rpm durante 10 minutos y recoger el sobrenadante antes de la etapa c), en el que el sobrenadante del efluente se filtra a continuación en la etapa c). En otra realización, el método para preparar el complemento de medio comprende además filtrar el efluente o el sobrenadante del efluente secuencialmente a través de un filtro de 1,0 µm, un filtro de 0,8 µm, y un filtro de 0,45 µm, antes de la filtración a través del filtro de 0,2 µm. En una realización, el filtro de 0,2 µm es un filtro de 0,22 µm. El medio de cultivo es el Medio 1.

En una realización, el ecosistema bacteriano diana se obtiene cultivando una muestra de materia fecal humana, por ejemplo, un sobrenadante de suspensión fecal al 10 % p/v o un sobrenadante de suspensión fecal al 20 % p/v. El ecosistema bacteriano diana comprende la comunidad experimental definida 1 (DEC-1), la comunidad experimental definida 2 (DEC-2), la comunidad experimental definida 3 (DEC-3) o una comunidad de cepas bacterianas que representa un enterotipo de intestino humano, en donde el enterotipo es el enterotipo *Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococcus*.

En una realización, el medio de cultivo comprende mucina, por ejemplo, a una concentración del 1-10 %, por ejemplo, a una concentración de 4 g/l. El quimiostato es un quimiostato de una sola fase. En una realización, el quimiostato tiene un tiempo de retención del sistema de 24 horas. Las condiciones que replican el tracto gastrointestinal del colon humano normal comprenden: una temperatura de aproximadamente 37 °C; un pH de aproximadamente 6,9 a 7; un tiempo de retención del sistema de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 horas; y un mantenimiento de condiciones anaerobias en el quimiostato. En otra realización, las condiciones que replican el tracto gastrointestinal del colon humano normal comprenden además cultivar el ecosistema bacteriano diana en un medio de cultivo que contiene mucina, por ejemplo, mucina a una concentración del 1-10 %, por ejemplo, 4 g/l.

El complemento de medio cultivado mediante el método de la invención puede usarse para hacer crecer bacterias anaerobias, en donde el complemento de medio se usa para complementar el medio de cultivo en un cultivo líquido de aproximadamente el 1 % v/v a aproximadamente el 10 % v/v. En una realización, el complemento de medio se usa para complementar medios de cultivo a aproximadamente el 3 % v/v. En una realización, el cultivo líquido se hace crecer en un quimiostato. El complemento de medio se puede añadir al medio de cultivo antes de que comience el cultivo, o durante el cultivo de las bacterias anaerobias. También se proporciona en el presente documento un uso del complemento de medio preparado por el método de la invención para cultivar bacterias anaerobias, en el que el complemento de medio se usa para complementar un medio de cultivo sólido, por ejemplo, un medio de cultivo sólido en una placa de Petri. En una realización, el complemento de medio se añade a las placas de FAA a una concentración final del 3 %.

En algunas realizaciones, para los usos proporcionados en el presente documento, las bacterias anaerobias son bacterias que se encuentran en el intestino humano de un sujeto sano. En una realización, las bacterias anaerobias son *Faecalibacterium prausnitzii* o *Ruminococcus callidus* (ATCC27760).

Como tal, la invención proporciona un método para aislar bacterias anaerobias del intestino humano, que comprende: a) cultivar un ecosistema bacteriano diana como se ha definido anteriormente en un Medio de cultivo 1 en un quimiostato de una fase bajo condiciones que reproducen el tracto gastrointestinal del colon humano normal, hasta que se alcanza el equilibrio; b) diluir el cultivo y colocar en placas sobre agar de anaerobios exigentes (FAA) complementado con el complemento de medio obtenido por el método de la invención, y opcionalmente complementado con sangre de oveja desfibrinada; c) incubar las placas en una cámara anaerobia; d) purificar colonias bacterianas anaerobias individuales cultivadas en la etapa (c); y e) opcionalmente, cultivar las colonias bacterianas anaerobias individuales purificadas de la etapa (d) en cultivo líquido en un quimiostato de una fase en condiciones que replican el tracto gastrointestinal del colon humano normal, opcionalmente en el que el complemento de medio obtenido mediante el método de la invención se usa para complementar medios de cultivo de aproximadamente el 1 % v/v a aproximadamente el 10 % v/v; de tal forma que se obtienen aislados de bacterias

anaerobias. En una realización, el complemento de medio se usa para complementar el medio de cultivo en la etapa (e) a aproximadamente el 3 % v/v. En otra realización, el complemento de medio se añade a una concentración final del 3 % en la etapa (b). En aún otra realización, la sangre de oveja desfibrinada se añade a una concentración final del 5 %. Las condiciones que replican el tracto gastrointestinal del colon humano normal comprenden: una temperatura de aproximadamente 37 °C; un pH de aproximadamente 6,9 a 7; un tiempo de retención del sistema de aproximadamente 20 a 70 horas; y un mantenimiento de condiciones anaerobias en el quimiostato. En una realización, las condiciones de replicación del tracto gastrointestinal del colon humano normal comprenden además el cultivo en medio de cultivo al que se ha añadido mucina. En una realización, las bacterias se cultivan en el quimiostato en las etapas (a) y (e) en una atmósfera reducida con niveles controlados de presión parcial de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>. Por ejemplo, la preparación puede estar en una atmósfera de N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>, o una mezcla de las mismas. En una realización, la mezcla de las mismas es N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>. En otra realización, las condiciones anaerobias se mantienen burbujeando gas nitrógeno filtrado a través de los cultivos en las etapas (a) y (e).

En algunas realizaciones, el ecosistema bacteriano diana cultivado en la etapa (a) es una muestra de materia fecal humana, por ejemplo, un sobrenadante de suspensión fecal al 10 % p/v o un sobrenadante de suspensión fecal al 20 % p/v.

En una realización, se aísla *Faecalibacterium prausnitzii* o *Ruminococcus callidus* (ATCC27760). En otra realización, se obtiene un aislado puro de *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium aldenense 1*, *Clostridium aldenense 2*, *Clostridium hathewayi 1*, *Clostridium hathewayi 2*, *Clostridium hathewayi 3*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus bromii 2*, *Ruminococcus torques 4*, *Ruminococcus torques 5*, *Clostridium cocleatum* (por ejemplo, *Clostridium cocleatum* 21FAA1), *Eubacterium desmolans* (por ejemplo, *Eubacterium desmolans* 48FAA1), *Eubacterium limosum* 13LG, *Lachnospira pectinoshiza*, *Ruminococcus productus* (por ejemplo, *Ruminococcus productus* 27FM), *Ruminococcus obeum* (por ejemplo, *Ruminococcus obeum* 11FM1), *Blautia producta*, o *Clostridium thermocellum*.

En una realización, un método para cultivar una comunidad microbiana a partir de intestino humano comprende: a) obtener una muestra fecal de un sujeto humano sano; b) inocular un cultivo con la muestra fecal; y c) cultivar el cultivo en medio de cultivo (es decir, Medio 1) en un quimiostato de una fase en condiciones que reproducen el tracto gastrointestinal del colon humano normal, hasta que se alcanza el equilibrio; de tal forma que se obtiene una comunidad microbiana que comprende cepas bacterianas que se encuentran en el intestino humano. En una realización, la comunidad microbiana representa un enterotipo de intestino humano. En otra realización, la muestra fecal obtenida en la etapa (a) se prepara como un sobrenadante de suspensión fecal al 10 % p/v o un sobrenadante de suspensión fecal al 20 % p/v antes de inocular el cultivo en la etapa (b).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para un mejor entendimiento de la invención y para mostrar más claramente cómo se puede llevar a cabo, se hará referencia ahora a modo de ejemplo a los dibujos adjuntos, que ilustran aspectos y características de acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, y en los que:

La Figura 1 muestra un recipiente de quimiostato de una sola etapa desarrollado modificando un sistema de fermentación Multifors que se usó para cultivar las cepas bacterianas aisladas como se describe en el presente documento.

La Figura 2 muestra un árbol de agrupamiento basado en el coeficiente de similitud de Dice y la correlación del método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) de los perfiles de DGGE que muestra inóculos fecales al 10 % preparados a partir de heces del Donante 2 en varias donaciones diferentes durante un período de 8 meses. La especie bacteriana predominante de este donante sano se mantuvo estable a lo largo del tiempo.

La Figura 3 muestra un árbol de agrupamiento basado en el coeficiente de similitud de Dice y la correlación UPGMA de los perfiles de DGGE que muestra inóculos fecales al 10 % preparados a partir de cuatro donantes diferentes (donantes 1-4). Cada donante tenía un perfil único, con los perfiles de algunos donantes más similares entre sí que otros (por ejemplo, Donantes 2 y 3).

La Figura 4 muestra un árbol de agrupamiento basado en el coeficiente de similitud de Dice y la correlación UPGMA de los perfiles de DGGE que muestra inóculos fecales al 10 % frente al 20 % preparados a partir de heces del Donante 2 en dos donaciones diferentes. Los inóculos al 10 % y al 20 % fueron muy similares entre sí, justificando por lo tanto el uso de los inóculos al 10 % (lo que requiere menos donación de heces y es más fácil de administrar en el recipiente del quimiostato tras la inoculación).

La Figura 5 muestra la reproducibilidad de dos recipientes de quimiostato (V1 y V2) sembrados con inóculo fecal idéntico del Donante 2. A) Perfiles de DGGE que muestran las comunidades en los días 0, 10, 26 y 28; B) coeficientes de correlación (expresados como porcentajes) que comparan los perfiles de cada recipiente en el mismo punto de tiempo, trazados durante el transcurso del experimento; C) Dinámica de comunidad como se muestra utilizando el análisis de correlación de ventana móvil. La similitud de la comunidad dentro de cada recipiente se calculó comparando el perfil del día (x) y el día (x - 2); D) Gráfico del índice de diversidad de Shannon (H') que representa la diversidad de la comunidad de cada recipiente en el transcurso del experimento; E) Gráfico de riqueza ponderada por rango (Rr) que representa la riqueza en cada recipiente en el transcurso del experimento; F) Gráfico del índice de equidad de Shannon (E<sup>H</sup>) que

representa los valores de uniformidad de la comunidad de cada recipiente en el transcurso del experimento. Sin mucina, pudieron gestionarse dos recipientes en paralelo y mantenerse comunidades idénticas, alcanzando un estado estable aproximadamente 26-28 días después de la inoculación.

La Figura 6 muestra una comparación del medio de quimiostato utilizado en el laboratorio ("Medio 1", utilizado para suministrar V1) a un medio previamente publicado (V6; Walker et al., Appl. Environ. Microbiol., 71(7): 3692-700, 2005). Se usó el mismo inóculo fecal (del Donante 2, 10 %) para sembrar cada recipiente. A) Perfiles de DGGE que muestran las comunidades en los días 0, 10, 26 y 36; B) coeficientes de correlación (expresados como porcentajes) que comparan los perfiles de cada recipiente en el mismo punto de tiempo, trazados durante el transcurso del experimento; C) Dinámica de comunidad como se muestra utilizando el análisis de correlación de ventana móvil. La similitud de la comunidad dentro de cada recipiente se calculó comparando el perfil del día (x) y el día (x - 2); D) Gráfico del índice de diversidad de Shannon (H') que representa la diversidad de la comunidad de cada recipiente en el transcurso del experimento; E) Gráfico de riqueza ponderada por rango (Rr) que representa la riqueza en cada recipiente en el transcurso del experimento; F) Gráfico del índice de equidad de Shannon (E<sup>H</sup>) que representa los valores de uniformidad de la comunidad de cada recipiente en el transcurso del experimento. La comparación muestra que la receta del medio que se desarrolló (Medio 1) proporciona un medio adecuado para cultivar una comunidad de quimiostato estable y diversa en comparación con el medio publicado previamente.

La Figura 7 muestra una comparación de un tiempo de retención de 65 horas (V1) con un tiempo de retención de 24 horas (V2). Se usó el mismo inóculo fecal (del Donante 2, 10 %) para sembrar cada recipiente. A) Perfiles de DGGE que muestran las comunidades en los días 0, 6, 10 y 14; B) coeficientes de correlación (expresados como porcentajes) que comparan los perfiles de cada recipiente en el mismo punto de tiempo, trazados durante el transcurso del experimento; C) Dinámica de comunidad como se muestra utilizando el análisis de correlación de ventana móvil. La similitud de la comunidad dentro de cada recipiente se calculó comparando el perfil del día (x) y el día (x - 2); D) Gráfico del índice de diversidad de Shannon (H') que representa la diversidad de la comunidad de cada recipiente en el transcurso del experimento; E) Gráfico de riqueza ponderada por rango (Rr) que representa la riqueza en cada recipiente en el transcurso del experimento; F) Gráfico del índice de equidad de Shannon (E<sup>H</sup>) que representa los valores de uniformidad de la comunidad de cada recipiente en el transcurso del experimento. El aumento del tiempo de retención del valor biológicamente significativo de 24 horas a 65 horas dio como resultado una comunidad que era menos similar a su inóculo y no mantuvo un mayor nivel de diversidad.

La Figura 8 muestra el efecto de la mucina en la diversidad de las comunidades intestinales distales cultivadas en un quimiostato de una sola fase. Se usó el mismo inóculo fecal (del Donante 2, 10 %) para sembrar cada recipiente. A) Perfiles de DGGE que muestran las comunidades en los días 0 y 24; B) Coeficientes de correlación (expresados como porcentajes) que comparan los perfiles de V1 (sin mucina) con V5 y V6 (con mucina) los días 0 y 24; C) Coeficientes de correlación (expresados como porcentajes) que comparan los perfiles de V1 (sin mucina) con los valores promedio de V5 y V6 (con mucina) los días 0 y 24; D) Índice de diversidad de Shannon (H') que representa la diversidad de la comunidad de cada recipiente los días 0 y 24; E) Riqueza ponderada por rango (Rr) que representa la riqueza en cada recipiente los días 0 y 24; F) Índice de equidad de Shannon (J) que representa los valores de uniformidad de la comunidad de cada recipiente los días 0 y 24. La adición de mucina al quimiostato dio como resultado un aumento en la diversidad, riqueza y uniformidad de la comunidad.

La Figura 9 muestra una descripción esquemática de las medidas utilizadas para caracterizar las comunidades ecológicas microbianas (dinámica, diversidad, uniformidad y riqueza). El diagrama esquemático explica los conceptos ecológicos básicos (incluida la dinámica, diversidad, uniformidad y riqueza de la comunidad). A) La dinámica de la comunidad representa los cambios dentro de la comunidad en un marco de tiempo fijo utilizando el análisis de correlación de ventana móvil (Marzorati, M. et al., Environ. Microbiol., 10: 1571-1581, 2008; Possemiers, S. et al., FEMS Microbiol. Ecol., 49: 495-507, 2004); B) El índice de diversidad de Shannon es una medida de diversidad de la comunidad que tiene en cuenta tanto la riqueza de especies (número de especies presentes) como la uniformidad (abundancia relativa de especies) (Gafan, G.P. et al., J. Clin. Microbiol., 43: 3971-3978, 2005); c) Índice de equidad de Shannon que describe la uniformidad de la comunidad, o el grado en que el número de individuos se divide en partes iguales entre las diferentes especies de la comunidad (Pielou, E.C. 1975. Ecological diversity. Wiley, Nueva York); D) La riqueza de la comunidad se refiere a la cantidad de especies presentes en el ecosistema; esta medida no tiene en cuenta la abundancia de especies relativa.

La Figura 10 representa perfiles de DGGE que comparan las comunidades fecales con las comunidades presentes en los recipientes de quimiostato inmediatamente después de la inoculación. Se compararon dos realizaciones diferentes de quimiostato para cada donante sano (Donantes 5 y 6). El inóculo fecal utilizado para sembrar los recipientes de quimiostato fue muy similar a la donación fecal inicial y no se alteró significativamente por el proceso de preparación del inóculo.

La Figura 11 representa perfiles de DGGE que comparan las comunidades fecales de dos donantes sanos diferentes (Donantes 5 y 6). Cada donante proporcionó una muestra en dos ocasiones diferentes. Los Donantes 5 y 6 tenían diferentes perfiles de DGGE. Los perfiles de DGGE de ambos donantes fueron consistentes entre las donaciones.

La Figura 12 representa perfiles de DGGE que comparan las comunidades fecales presentes en los recipientes de quimiostato inmediatamente después de la inoculación con las comunidades en estado

estable (muestras obtenidas 36 días después de la inoculación) para dos donantes sanos diferentes (donantes 5 y 6). Se sembraron dos recipientes diferentes con inóculo fecal idéntico para cada realización de quimiostato y se compararon dos realizaciones diferentes de quimiostato para cada donante sano. Por DGGE, los inóculos fecales del mismo donante en dos ocasiones diferentes fueron más similares entre sí que los inóculos fecales del otro donante. Además, las comunidades de estado estable sembradas con heces del mismo donante fueron más similares entre sí entre las realizaciones de quimiostato que a las comunidades sembradas con heces de otro donante.

La Figura 13 muestra el análisis de la comunidad de dos recipientes de quimiostato idénticos que modelan el intestino distal humano. Cada recipiente se sembró con inóculo fecal idéntico preparado a partir de las heces de un donante sano (donante 5). Los parámetros se calcularon mediante el análisis de los patrones de DGGE de la Bacteria general (región V3 del gen 16S) usando el software de análisis estadístico GeneTools. Las muestras se analizaron cada dos días durante todo el experimento (días 0-48). La línea de trazos vertical representa el comienzo de las condiciones de estado estable. A: Coeficientes de correlación (expresados como porcentajes) que comparan los perfiles de cada recipiente en el mismo punto de tiempo, trazados a lo largo del experimento. La línea discontinua horizontal representa el umbral de corte calculado al comparar la similitud de carriles de marcador idénticos realizados en un solo gel de DGGE. La línea de trazos horizontal representa el umbral de corte del -5 % y permite una diferencia del 5 % en la similitud entre los perfiles de cada recipiente. Hasta el día 48, ambos recipientes pudieron mantener perfiles de DGGE muy similares. B: Coeficientes de correlación que comparan los perfiles de las muestras tomadas de cada recipiente durante el transcurso del experimento a su inóculo de partida. La línea discontinua horizontal representa el umbral de corte y la línea de trazos horizontal representa el umbral de corte del -5 %. Si bien la comunidad en estado estable fue diferente del inóculo de partida, la similitud fue relativamente constante a lo largo del tiempo. C: Dinámica de la comunidad como se muestra utilizando el análisis de correlación de ventana móvil. La variabilidad de la comunidad dentro de cada recipiente se calculó comparando el perfil del día (x) y el día (x - 2). La línea discontinua horizontal representa 100-(umbral de corte) y la línea de trazos horizontal representa 100-(umbral de corte del -5 %). Para el día 36, las comunidades dentro de ambos recipientes habían alcanzado un estado estable (cuando se confirmó por inspección visual de los perfiles de DGGE entre recipientes). D: Gráfico del índice de diversidad de Shannon (H) que representa la diversidad de la comunidad corregida de cada recipiente en el transcurso del experimento. La línea discontinua horizontal representa el valor promedio del índice de diversidad de Shannon del inóculo de partida. La diversidad en ambos recipientes fue similar entre sí, estable en el tiempo, y similar a la del inóculo de partida. E: Gráfico de riqueza de comunidad (S) representado por el trazado del número de bandas observadas corregidas en cada gel de DGGE frente al tiempo. La línea discontinua horizontal representa el valor promedio de la riqueza del inóculo de partida. La riqueza en ambos recipientes fue similar entre sí, estable en el tiempo, y similar a la del inóculo de partida. F: Gráfico de índice de equidad de Shannon (E<sup>H</sup>) que representa los valores corregidos de uniformidad de la comunidad de cada recipiente en el transcurso del experimento. La línea discontinua horizontal representa el valor promedio del índice de equidad de Shannon del inóculo de partida. La uniformidad en ambos recipientes fue similar entre sí, estable en el tiempo, y similar a la del inóculo de partida.

La Figura 14 muestra placas representativas que demuestran el crecimiento de la cepa de *Faecalibacterium prausnitzii*, que mostró un crecimiento diferencial en respuesta al complemento de medio Oro líquido incluido en la preparación del medio de agar al 3 %. Las placas se inocularon con inóculos idénticos y se incubaron a 37 °C durante 3 días en condiciones anaerobias totales. Placa A: Agar de anaerobios exigentes (FAA) complementado con sangre de oveja desfibrinada al 5 % en solitario. Placa B: FAA complementado con sangre de oveja desfibrinada al 5 % y complemento de medio Oro líquido filtrado al 3 % (sin células) (del Donante 6). El crecimiento se mejoró claramente mediante la adición de complemento de medio Oro líquido al medio.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con un amplio aspecto, los métodos de la invención comprenden las etapas de cultivar microorganismos o microbios anaerobios usando un sistema de quimiostato de una sola fase. También se proporciona el uso de un nuevo complemento de medio, denominado "Oro líquido", obtenido mediante el método de la invención, para cultivar dichos microorganismos o microbios, en particular los que son tradicionalmente difíciles de cultivar. Los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse, entre otros, para cultivar enterotipos del intestino humano y para proporcionar modelos de comunidades bacterianas del colon distal humano. Los métodos proporcionados en el presente documento son particularmente adecuados para cultivar bacterias anaerobias, tales como las que se encuentran en el intestino humano.

El tracto gastrointestinal humano contiene un gran número de bacterias, denominadas colectivamente la microbiota intestinal. La flora intestinal comensal contribuye a la defensa del huésped cebando las células dendríticas del sistema inmune, produciendo productos bactericidas que matan bacterias patógenas, inhiben la colonización de bacterias patógenas y compiten con patógenos por alimentos y sitios de unión a lo largo de la superficie de la célula epitelial intestinal, un fenómeno conocido colectivamente como "resistencia de colonización" (Stecher B. y Hardt W.D., Trends Microbiol. (2008), 16: 107-14; Rolfe, R.D., Infect. Immun. (1984), 45: 185-91).

Estudios recientes han sugerido que los enterotipos intestinales pueden no ser específicos de un individuo, sino que son representativos de diferentes estados de equilibrio que existen en la microbiota intestinal en respuesta a estímulos dietéticos. Se ha informado que el microbioma intestinal humano, es decir, la comunidad de organismos que viven simbióticamente dentro de los seres humanos, ocurre en ciertas variedades de conjuntos o "enterotipos".

5 Hasta la fecha se han identificado tres enterotipos principales del intestino humano, que varían en especies y composición funcional, y se denominan Bacteroides, Prevotella y Ruminococcus (Arumugam, M. et al., Nature 12; 473(7346): 174-80, Epub Apr. 20, 2011).

10 En un aspecto, se proporcionan en el presente documento métodos que comprenden las etapas de cultivar los enterotipos del intestino humano. Como se informa en el presente documento, se cosecharon muestras fecales de donantes de cada enterotipo y se usó un sistema de quimiostato de una sola fase para cultivar una comunidad bacteriana que modela la comunidad del intestino distal del donante. Por lo tanto, en una realización, se proporcionan en el presente documento métodos que comprenden las etapas de cultivar comunidades bacterianas que modelan los enterotipos del intestino humano. Los métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para formar comunidades microbianas que son estables, reproducibles, diversas y/o biológicamente significativas, en términos de modelación del colon distal humano. Como se indica en el presente documento, las comunidades de estado estable generalmente se producen en aproximadamente un mes, por ejemplo, aproximadamente a los 26 días, después de la inoculación con una muestra fecal, usando los métodos descritos en el presente documento.

20 Además, se pueden usar tres comunidades experimentales definidas (DEC) de microorganismos de muestras fecales humanas en los métodos de la invención. Como se describe, usando los métodos proporcionados en el presente documento, se subcultivaron muestras fecales de donantes que representan diferentes enterotipos. Las muestras fecales se cosecharon y se usaron para generar DEC de microorganismos que modelan los enterotipos del intestino humano. En una realización, se usan tres DEC (denominadas en el presente documento DEC-1, DEC-2 y DEC-3) en los métodos.

30 DEC-1 comprende cepas bacterianas intestinales que se aislaron y se purificaron a partir de heces de donante de un donante que no había recibido antibióticos en los últimos 5 años (este donante también se denomina en el presente documento como "Donante 6"). DEC-1 incluye 33 cepas (que representan un total de 26 especies), como se muestra en la Tabla 1; esta DEC se ha utilizado con éxito para tratar a dos pacientes (Kingston General Hospital) con infección recurrente por *Clostridium difficile*, lo que demuestra que el DEC modela con éxito una comunidad microbiana del colon distal humano. Las cepas se diferenciaron por especie usando la secuencia de longitud completa ARNr 16S y la base de datos GreenGenes ([http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-blast\\_interface.cgi](http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-blast_interface.cgi)).

35 DEC-2 (del mismo donante que DEC-1) incluye todas las cepas en DEC-1, así como especies bacterianas adicionales. Las cepas bacterianas incluidas en DEC-2 se muestran en la Tabla 3.

40 DEC-3 incluye aislados de especies bacterianas que se muestran en la Tabla 2. DEC-3 se aisló de un donante masculino, de 43 años de edad, sin antecedentes de uso de antibióticos en los 6 años anteriores a la donación de heces (denominado en el presente documento como "Donante 5"). En particular, DEC-3 contiene una serie de microbios que se sabe o se especula que son altamente beneficiosos y están enriquecidos en individuos sanos, tales como *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., y *Adlercreutzia equolifasciens*.

45 En una realización, se proporcionan en el presente documento métodos que comprenden las etapas de cultivar comunidades bacterianas que modelan los enterotipos del intestino humano en un sistema de quimiostato de una sola fase. Este sistema se ha optimizado para cultivar microbios gastrointestinales. En una realización, se proporciona un sistema de quimiostato que utiliza el siguiente medio de cultivo, denominado en el presente documento "Medio 1": Peptona (0,4 % p/v); Extracto de levadura (0,4 % p/v); NaHCO<sub>3</sub> (0,4 % p/v); Pectina (de cítricos, 0,4 % p/v); xilano (de madera de haya, 0,4 % p/v); Arabinogalactano (0,4 % p/v); Caseína (0,6 % p/v); almidón de trigo no modificado (1 % p/v); inulina (0,2 % p/v); sales biliares (0,1 % p/v); L-cisteína HCl (0,1 % p/v); CaCl<sub>2</sub> (0,0002 % p/v); NaCl (0,0002 % p/v); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,0008 % p/v); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,0008 % p/v); MgSO<sub>4</sub> (0,0002 % p/v); Hemina (0,0001 % p/v); menadiona (0,00002 % p/v); y opcionalmente mucina (porcina, 0,004 % p/v)

50 En una realización, el medio de cultivo utilizado en los métodos de la invención, es decir, el Medio 1; comprende además mucina. Se entenderá por el experto en la técnica que se puede usar mucina de cualquier fuente que esté disponible y sea asequible. Por ejemplo, se puede usar mucina de fuentes de mamíferos, tales como mucina bovina, mucina porcina, etc. En una realización, se usa mucina porcina.

60 En otra realización, se usa un complemento de medio denominado "Oro líquido" para complementar un medio de cultivo de laboratorio estándar para mejorar las capacidades de crecimiento para microbios que de otro modo serían considerados "no cultivables", tales como, por ejemplo, ciertos microbios gastrointestinales, anaerobios. "Oro líquido" se refiere al efluente de un quimiostato en el que se cultiva una comunidad bacteriana, es decir, el efluente expulsado del quimiostato mediante diferenciales de presión. El efluente gotea en botellas estériles, alojadas detrás del quimiostato, a través de tubos. Cuando la botella está llena, puede sellarse y almacenarse a +4 °C hasta que se



necesite. El efluente se hace pasar a través de un filtro, por ejemplo, un filtro de 0,22 µm, para eliminar las células bacterianas y producir Oro líquido sin células, que se usa para complementar el medio de cultivo.

5 La cantidad óptima de Oro líquido a añadir a un cultivo variará dependiendo de las condiciones experimentales y los microbios a cultivar, y será determinada por un experto en la técnica usando técnicas estándar. En una realización, se añade Oro líquido al 1 % v/v, 3 % v/v, 5 % v/v, 7 % v/v o 10 % v/v. En una realización particular, se usa Oro líquido para complementar el medio de crecimiento al 3 % v/v.

10 El Oro líquido es esencialmente un sobrenadante de un cultivo microbiano e incluye una plétora de moléculas de señalización, factores de crecimiento, etc. Debe entenderse que la composición de una preparación de Oro líquido dependerá de la comunidad microbiana a partir de la cual se produce. Por lo tanto, se pueden crear diferentes tipos de Oro líquido cultivando diferentes comunidades bacterianas en un quimiostato. Por ejemplo, el "Oro líquido nativo" se produce a partir del efluente del quimiostato a partir del cultivo de heces nativas completas en un quimiostato, por ejemplo, un sistema de quimiostato de una sola fase, como se describe a continuación. Se produce "Oro líquido DEC" del efluente de quimiostato a partir del cultivo de una comunidad experimental definida (tal como, por ejemplo, DEC-1) en un quimiostato, por ejemplo, un sistema de quimiostato de una sola fase, como se describe a continuación. Como se usa en el presente documento, "Oro líquido DEC-1" se refiere al Oro líquido producido a partir del efluente de quimiostato del cultivo de la comunidad DEC-1; "Oro líquido DEC-2" se refiere al Oro líquido producido a partir del efluente del quimiostato del cultivo de la comunidad DEC-2; y "Oro líquido DEC-3" se refiere al Oro líquido producido a partir del efluente del quimiostato del cultivo de la comunidad DEC-3. Como se indica en el presente documento, las muestras fecales se cosecharon de donantes de diferentes enterotipos y se cultivaron y, por lo tanto, se pudo producir varios tipos diferentes de complementos de medio de Oro líquido, incluyendo, por ejemplo, Oro líquido DEC-1, Oro líquido DEC-2, Oro líquido DEC-3 y Oro líquido nativo.

25 **Tabla 1. Cepas bacterianas intestinales aisladas y purificadas de heces de donante en DEC-1.**

Concordancia de la especie más cercana, inferida por la alineación de la secuencia de ARNr 16S con respecto a la base de datos GreenGenes*	% de identidad con respecto a la correspondencia más cercana	Abundancia relativa (por biomasa) en DEC-1
<i>Acidaminococcus intestinalis</i>	100	+++
<i>Bacteroides ovatus</i>	99,52	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	99,79	++
(2 cepas diferentes)	99,79	++
<i>Bifidobacterium longum</i>	99,86	+++
(2 cepas diferentes)	99,16	+++
<i>Blautia producta</i> **	96,43	+
<i>Clostridium cocleatum</i>	91,92	+
<i>Collinsella aerofaciens</i>	98,73	+
<i>Dorea longicatena</i>	99,62	+
(2 cepas diferentes)	99,60	+
<i>Escherichia coli</i>	99,80	+
<i>Eubacterium desmolans</i>	94,90	+
<i>Eubacterium eligens</i>	98,15	+++++
<i>Eubacterium limosum</i>	97,05	+
<i>Eubacterium rectale</i>	99,59	+++++
(4 cepas diferentes)	99,60	+++++
	99,19	+++++
	99,53	+++++
<i>Eubacterium ventriosum</i>	100	++
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	99,17	+++++
<i>Lachnospira pectinoshiza</i>	95,22	+
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	99,47	+
<i>Lactobacillus casei</i>	99,74	+
<i>Parabacteroides distasonis</i>	99,45	++
<i>Raoultella</i> sp.	99,40	+
<i>Roseburia faecalis</i>	99,65	++
<i>Roseburia intestinalis</i>	100	++
<i>Ruminococcus torques</i>	99,15	+++
(2 cepas diferentes)	99,29	+++
<i>Ruminococcus obeum</i>	94,89	+
(2 cepas diferentes)	94,69	+
<i>Streptococcus mitis</i> <sup>†</sup>	99,79	+

\*La correspondencia de especie más cercana se infirió mediante la alineación de la secuencia de ARNr 16S con la base de datos GreenGenes; se ha de tener en cuenta que, en algunos casos, las secuencias del gen ARNr 16S no podrían resolver la identidad más allá del género, y que la correspondencia más cercana no infiere la especiación

definitiva. Las casillas sombreadas indican cepas que probablemente sean nuevas especies (y en algunos casos, géneros). Se ha de tener en cuenta que algunas cepas representativas se identifican con la misma especie mediante la alineación de la secuencia del gen ARNr 16S, pero se cree que son diferentes cepas basadas en las diferencias en la morfología de las colonias, los patrones de resistencia a los antibióticos y las tasas de crecimiento. \*\*También se denomina *Ruminococcus productus*. Ψ Se identifica con *Strep. mitis* pero no es α-hemolítica.

**Tabla 2. Cepas bacterianas intestinales aisladas y purificadas de heces de donante en DEC-3.**

N.º	Cepa	Especie más cercana <sup>c</sup>	% de ID <sup>a</sup>
1	11 TSAB	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	99,76 %
2	18 FAA SS	<i>Akkermansia muciniphila</i>	100 %
3	9 FAA NB	<i>Alistipes finegoldii</i>	99,27 %
4	19 D5 FAA	<i>Alistipes putredinis</i>	97,15 %
5	15 D5 FAA	<i>Alistipes shahii</i>	99,85 %
6	5 D5 FAA SS	<i>Alistipes sp.</i>	100 %
7	5 D5 FAA	<i>Bacteroides capillosus</i>	96,98 %
8	12 FAA	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	99,46 %
9	9 D5 FAA	<i>Bacteroides eggerthii</i>	100 %
10	1 D6 FAA SS	<i>Bacteroides ovatus</i>	100 %
11	23 FAA	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	100 %
12	1 TSAB	<i>Bacteroides uniformis</i>	100 %
13	17 BHI	<i>Bacteroides vulgatus</i>	99,85 %
14	3 FAA SS AER.	<i>Bacillus circulans</i>	100 %
15	1 D5 FAA SS AER.	<i>Bacillus simplex</i>	98,70 %
16	1 D6 FAA	<i>Bifidobacterium longum</i>	100 %
17	18 D6 FAA SS	<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	100 %
18	8 FAA	<i>Blautia sp.</i>	99,15 %
19	4 TSA SS	<i>Blautia/Clostridium coccoides</i>	99,85 %
20	1 D6 FAA SS AER.	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	97,60 %
21	3 MRS SS	<i>Catabacter hongkongensis</i>	98,65 %
22	16 TSA SS	<i>Catabacter sp.</i>	99,05 %
23	10 TSAB	<i>Catenibacterium mitsuokai</i>	99,40 %
24	13 D6 FAA SS	<i>Clostridium aldenense 1</i>	92,04 %
25	21 D6 FAA SS	<i>Clostridium aldenense 2</i>	92,24 %
26	13 D5 FAA SS	<i>Clostridium asparagiforme</i>	94,37 %
27	3 D6 FAA SS	<i>Clostridium bolteae</i>	99,84 %
28	6 D5 FAA	<i>Clostridium celerecrescens</i>	94,48 %
29	13 D6 FAA	<i>Clostridium hathewayi 1</i>	92,19 %
30	21 FAA NB SS	<i>Clostridium hathewayi 2</i>	91,28 %
31	10 FAA	<i>Clostridium hathewayi 3</i>	92,99 %
32	11 FAA	<i>Clostridium hathewayi 4</i>	98,64 %
33	6 D6 FAA SS	<i>Clostridium hylemonae 1</i>	99,85 %
34	8 D5 FAA SS	<i>Clostridium hylemonae 2</i>	97,85 %
35	5 FAA SS	<i>Clostridium inocuum</i>	99,12 %
36	11 B D5 FAA SS	<i>Clostridium lavalense</i>	99,08 %
37	16 D5 FAA SS	<i>Clostridium leptum</i>	93,92 %
38	4 TSA	<i>Clostridium orbiscindens</i>	96,21 %
39	14 TSA	<i>Clostridium ramosum</i>	96,14 %
40	5 D6 FAA SS	<i>Clostridium scindens</i>	99,82 %
41	16 BHI SS	<i>Clostridium staminisolvens</i>	95,40 %
42	17 D5 FAA SS	<i>Clostridium sulfatireducens</i>	96,63 %
43	2 FAA SS	<i>Clostridium symbiosum</i>	99,83 %
44	16 BHI	<i>Clostridium thermocellum</i>	90,83 %
45	18 D5 FAA	<i>Clostridium sp. 1</i>	99,16 %
46	2 BHI SS	<i>Clostridium sp. 2</i>	97,16 %
47	20 D5 FAA	<i>Clostridium sp. 3</i>	95,51 %
48	16 D6 FAA SS	<i>Clostridium sp. 4</i>	98 %
49	9 D5 FAA SS	<i>Clostridium sp. 5</i>	97,88 %
50	5 TSA	<i>Clostridium sp. 6</i>	96,95 %
51	6 FAA	<i>Collinsella aerofaciens</i>	100 %
52	17 D5 FAA	<i>Coprococcus catus</i>	99,19 %
53	1 BHI	<i>Coprococcus comes</i>	99,70 %
54	13 FAA	<i>Coprococcus eutactus</i>	96,49 %
55	5 NA	<i>Dorea formicigenerans</i>	99,49 %

ES 2 662 793 T3

56	1 D5 FAA	<i>Dorea longicatena</i>	100 %
57	1 FAA SS AER.	<i>Escherichia coli</i>	100 %
58	5 TSAB	<i>Eubacterium bifforme</i>	98,76 %
59	11 NA SS	<i>Eubacterium callanderi</i>	98,08 %
60	19 FAA NB SS	<i>Eubacterium dolichum</i>	93,23 %
61	20 FAA	<i>Eubacterium eligens</i>	96,78 %
62	9 TSAB SS	<i>Eubacterium fissicatena</i>	97,67 %
63	1 BHI SS	<i>Eubacterium limosum</i>	99,25 %
64	5 D6 FAA	<i>Eubacterium rectale</i>	100 %
65	13 BHI	<i>Eubacterium siraeum</i>	93,57 %
66	8 MRS	<i>Eubacterium ventriosum</i>	97,37 %
67	22 D6 FAA	<i>Eubacterium xylanophilum 1</i>	97,39 %
68	15 FAA SS	<i>Eubacterium xylanophilum 2</i>	96,53 %
69	23 D6 FAA SS	<i>Eubacterium sp.</i>	94,31 %
70	5 FAA NB	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> <sup>b</sup>	100 %
71	24 FAA	<i>Gemmiger/ Subdoligranulum formicilis/ variable 1</i>	98,79 %
72	19 D5 FAA SS	<i>Gemmiger/ Subdoligranulum formicilis/ variable 2</i>	95,18 %
73	17 D6 FAA SS	<i>Holdemania filiformis</i>	97,51 %
74	1 FAA NB SS AER.	<i>Microbacterium schleiferi</i>	99,34 %
75	7 FAA NB SS AER.	<i>Micrococcus luteus</i>	97,04 %
76	21 D6 FAA	<i>Odoribacter splanchnicus</i>	100 %
77	24 D6 FAA SS	<i>Oscillibacter valericigenes</i>	95,16 %
78	6 FAA NB	<i>Oscillibacter sp.</i>	98,74 %
79	16 FAA	<i>Parabacteroides gordonii</i>	99,81 %
80	6 D6 FAA	<i>Parabacteroides merdae</i>	100 %
81	10 D5 FAA SS	<i>Parasutterella excrementihominis</i>	100 %
82	22 FAA	<i>Phascolarctobacterium sp.</i>	99,85 %
83	10 D5 FAA	<i>Roseburia faecalis 1</i>	99,84 %
84	9 D6 FAA	<i>Roseburia faecalis 2</i>	96,76 %
85	9A BHI	<i>Roseburia hominis</i>	99,04 %
86	17 TSA	<i>Roseburia intestinalis</i>	100 %
87	11 TSA	<i>Roseburia sp.</i>	95,07 %
88	23 D5 FAA	<i>Ruminococcus albus</i>	96,96 %
89	6 FAA NB SS	<i>Ruminococcus bromii 1</i>	100 %
90	17 FAA SS	<i>Ruminococcus bromii 2</i>	92,83 %
91	17 TSAB	<i>Ruminococcus lactaris</i>	94,46 %
92	2 FAA NB	<i>Ruminococcus luti</i>	98,91 %
93	15 TSA	<i>Ruminococcus obeum</i>	99,06 %
94	4 FAA	<i>Ruminococcus torques 1</i>	99,27 %
95	11 FAA	<i>Ruminococcus torques 2</i>	100 %
96	8 D6 FAA SS	<i>Ruminococcus torques 3</i>	96,47 %
97	9B D6 FAA SS	<i>Ruminococcus torques 4</i>	91,94 %
98	13 FAA NB	<i>Ruminococcus torques 5</i>	91,47 %
99	5 BHI	<i>Ruminococcus sp. 1</i>	94,32 %
100	11 FAA NB	<i>Ruminococcus sp. 2</i>	98,04 %
101	4 D6 FAA SS	<i>Ruminococcus sp. 3</i>	97,05 %
102	4 FAA SS AER.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99,82 %
103	1 FAA NB SS	<i>Streptococcus mitis</i>	100 %
104	11 FAA NB SS	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100 %
105	12 D6 FAA SS	<i>Synergistes sp.</i>	95,83 %
106	16 D5 FAA	<i>Turcibacter sanguinis</i>	100 %

<sup>a</sup> El % de ID para cada especie se determinó usando la base de datos del gen ARNr 16S, Green Genes. La longitud promedio de las secuencias utilizadas para obtener la identificación fue de 550 nucleótidos. (Interfaz Green Genes BLAST con respecto a la URL de datos de 16S: [http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-blast\\_interface.cgi](http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-blast_interface.cgi))

<sup>b</sup> La cepa *Faecalibacterium prausnitzii* 5 FAA NB requiere Oro líquido para el crecimiento. Se usó un volumen final del 3 % de Oro líquido producido a partir del quimiostato donde se cultivó la muestra fecal del donante se utilizó para complementar las placas de FAA. Se observó el crecimiento después de 48 horas.

<sup>c</sup> Varias cepas de la misma especie se representan por un número que sigue al nombre de la especie. Por ejemplo, *Clostridium aldenense* 1 y 2 son dos cepas diferentes de la misma especie. Las casillas sombreadas indican cepas que probablemente sean nuevas especies (y en algunos casos, géneros).

Tabla 3. Cepas bacterianas intestinales aisladas y purificadas de heces de donante en DEC-2.

Concordancia de la especie más cercana, inferida por la alineación de la secuencia de ARNr 16S con respecto a la base de datos GreenGenes*	
	<i>Acetobacterium sp.</i>
	<i>Acidaminococcus intestinalis</i>
	<i>Anaerostipes hadrus</i>
	<i>Atopobium minutum</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Bacteroides ovatus</i>
	<i>Bacteroides vulgatus</i>
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (2 cepas diferentes)
	<i>Bifidobacterium longum</i> (2 cepas diferentes)
	<i>Blautia coccooides</i>
	<i>Blautia producta</i>
	<i>Clostridium aldenense</i>
	<i>Clostridium citroniae</i>
	<i>Clostridium cocleatum</i>
	<i>Clostridium hathewayi</i>
	<i>Clostridium lactifermentans</i>
	<i>Clostridium orbiscindens</i>
	<i>Collinsella aerofaciens</i>
	<i>Dorea longicatena</i> (2 cepas diferentes)
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Eubacterium desmolans</i>
	<i>Eubacterium eligens</i>
	<i>Eubacterium fissicatena</i>
	<i>Eubacterium limosum</i>
	<i>Eubacterium rectale</i> (4 cepas diferentes)
	<i>Eubacterium sp.</i> (sin clasificar) (3 cepas diferentes)
	<i>Eubacterium ventriosum</i>
	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
	<i>Lachnospira pectinoshiza</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus paracasei</i>
	<i>Parabacteroides distasonis</i>
	<i>Raoultella sp.</i>
	<i>Roseburia faecalis</i>
	<i>Roseburia hominis</i>
	<i>Roseburia intestinalis</i>
	<i>Roseburia inulinivorans</i>
	<i>Ruminococcus torques</i>
	(2 cepas diferentes)
	<i>Ruminococcus obeum</i> (2 cepas diferentes)
	<i>Streptococcus mitis</i>
*La correspondencia de especie más cercana se infirió mediante la alineación de la secuencia de ARNr 16S con la base de datos GreenGenes; se ha de tener en cuenta que, en algunos casos, las secuencias del gen ARNr 16S no podrían resolver la identidad más allá del género, y que la correspondencia más cercana no infiere la especiación definitiva. Las casillas sombreadas indican cepas en DEC-2 que NO están en DEC-1.	

5 El Oro líquido puede almacenarse a 4 °C durante varias semanas seguidas sin perder su capacidad para soportar el crecimiento microbiano, lo que indica que la capacidad del Oro líquido para mantener o promover el crecimiento es estable y puede conservarse durante un período de tiempo prolongado. El Oro líquido también se puede congelar y conservar para usar en el futuro.

10 En una realización, se usa Oro líquido DEC-1 en los métodos proporcionados. En otra realización, se usa Oro líquido DEC-2 en los métodos proporcionados. En aún otra realización, se usa Oro líquido DEC-3 en los métodos proporcionados. En otra realización, se usa Oro líquido nativo en los métodos proporcionados. Debe entenderse que el Oro líquido puede producirse a partir del cultivo de muchas muestras fecales diferentes y/o combinaciones de las cepas intestinales humanas proporcionadas en el presente documento, y que pueden usarse dichos tipos de Oro líquido.

15 En una realización adicional, los métodos comprenden el uso de Oro líquido para soportar y/o potenciar el crecimiento de microbios, por ejemplo, microbios anaeróbicos intestinales humanos. En una realización, se usa Oro líquido para complementar el medio de cultivo de laboratorio estándar en un cultivo líquido, por ejemplo, en un

quimiostato. Por ejemplo, puede añadirse Oro líquido a un medio de cultivo antes de que comience el cultivo, o durante el cultivo de microbios. Como alternativa, se puede añadir Oro líquido a placas, por ejemplo, un medio sólido en una placa, tal como una placa Petri, para soportar o mejorar el crecimiento de microbios en medio sólido.

- 5 En una realización, el Oro líquido se fabrica cultivando comunidades bacterianas utilizando el medio de cultivo al que se hace referencia en el presente documento como "Medio 1", preparado como se indica a continuación:

El medio 1 se prepara en las siguientes etapas (para 2 l):

10 Mezcla 1: Los siguientes reactivos se disuelven en 1800 ml de agua destilada (ddH<sub>2</sub>O): agua de peptona, 4 g (Oxoid Limited); Extracto de levadura, 4 g (Oxoid Limited); NaHCO<sub>3</sub>, 4 g (Sigma); CaCl<sub>2</sub>, 0,02 g (Sigma); Pectina (de cítricos), 4 g (Sigma); xilano (de madera de haya), 4 g (Sigma); Arabinogalactano, 4 g (Sigma); Almidón (de trigo, sin modificar), 10 g (Sigma); Caseína, 6 g (Sigma); inulina (de tubérculos de Dahlia), 2 g (Sigma); NaCl, 0,2 g (Sigma). Se añade agua (ddH<sub>2</sub>O) a 1900 ml, ya que el volumen se reduce a 1800 ml después del tratamiento en autoclave. La mezcla se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 60 min y se deja enfriar durante una noche.

15 Mezcla 2: Los siguientes reactivos se disuelven en 100 ml de agua destilada (Mezcla 2A): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,08 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,08 g; MgSO<sub>4</sub>, 0,02 g; Hemina, 0,01 g; Menadiona, 0,002 g. Las sales biliares (1 g) se disuelven en 50 ml de agua destilada (Mezcla 2B). También se disuelve L-cisteína HCl (1 g) en 50 ml de agua destilada (Mezcla 2C). Después de que las Mezclas 2B y 2C se disuelven, se añaden a la Mezcla 2A dando como resultado la formación de un fino precipitado de color blanco. Este precipitado se disuelve entonces mediante la adición gota a gota de KOH 6 M hasta que se forma una solución de color marrón claro (Mezcla 2). Esta mezcla (200 ml de volumen total) se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0,22 µm.

25 Medio de cultivo ("Medio 1"): La mezcla 2 (0,2 l) se añade asépticamente a la mezcla 1 (1,8 l), para alcanzar el volumen final de 2 l. Para evitar una futura formación de espuma, se añaden asépticamente 5 ml de emulsión de silicona antiespumante B (J.T. Baker) a cada botella de medio de 2 l.

30 En una realización, se añade mucina al Medio 1 (para preparar "Medio 1 + mucina"). En esta realización, la mezcla 1 se prepara añadiendo 1600 ml de ddH<sub>2</sub>O antes del tratamiento en autoclave. La adición de mucina se prepara disolviendo 8 g de mucina (por ejemplo, del estómago porcino, tipo II) en 200 ml de ddH<sub>2</sub>O, y se trata en autoclave durante 20 minutos. La Mezcla 2 se prepara como se ha descrito anteriormente. Después del tratamiento en autoclave, la mezcla 2 (0,2 l) y la solución de mucina (0,2 l) se añaden asépticamente a la mezcla 1 (1,6 l), para alcanzar el volumen final de 2 l. De nuevo, se añaden asépticamente 5 ml de emulsión de silicona antiespumante B a cada botella de 2 l de medio.

35 En una realización, con el fin de producir Oro Líquido, se cultiva un sobrenadante de suspensión fecal al 10 % p/v (denominado en el presente documento como "inóculo al 10 %") en un quimiostato. En otra realización, con el fin de producir Oro Líquido, se cultiva un sobrenadante de suspensión fecal al 20 % p/v (denominado en el presente documento como "inóculo al 20 %") en un quimiostato. En otras realizaciones, se cultivan inóculos al 5-25 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o al 25 % en un quimiostato, por ejemplo, un sistema de quimiostato de una sola fase, para producir Oro líquido. Debe entenderse que puede usarse cualquier % de inóculo para inocular un recipiente de quimiostato para producir Oro líquido, siempre que haya una cantidad suficiente de muestra fecal para sembrar el recipiente, y la suspensión fecal resultante no sea demasiado espesa o viscosa para trabajar con ella.

45 En una realización, para producir Oro líquido, se usa un sistema de quimiostato donde el medio de crecimiento se suministra continuamente al recipiente del quimiostato a una velocidad de 400 ml/día (16,7 ml/hora) para proporcionar un tiempo de retención de 24 horas, un valor ajustado para imitar el tiempo de retención del intestino distal (Cummings, J. H. et al., Gut (1976), 17: 210-18). En otra realización, el medio de crecimiento se suministra continuamente al quimiostato a una velocidad de aproximadamente 148 ml/día (6,2 ml/hora) para dar un tiempo de retención de 65 horas. En una realización, el oro líquido se produce a partir de un quimiostato que tiene un tiempo de retención del sistema de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 28 horas, o aproximadamente 30 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 50 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 65 horas, o aproximadamente 70 horas.

55 Se indica en el presente documento que varias especies bacterianas nuevas del intestino humano se han cultivado mediante la suplementación de medio de cultivo con Oro líquido (por ejemplo, Oro líquido al 3 % v/v). Varias especies bacterianas se han aislado por primera vez utilizando los métodos proporcionados en el presente documento, incluido el uso de Oro líquido. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un método de cultivo de *Faecalibacterium prausnitzii*, donde el medio de crecimiento se complementa con Oro líquido. En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un método de cultivo de cepas que no se han aislado previamente, por ejemplo, *Clostridium aldenense* 1, *Clostridium aldenense* 2, *Clostridium hathewayi* 1, *Clostridium hathewayi* 2, *Clostridium hathewayi* 3, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus bromii* 2, *Ruminococcus torques* 4, *Ruminococcus torques* 5, *Clostridium cocleatum* (por ejemplo, *Clostridium cocleatum* 21 FAA1), *Eubacterium desmolans* (por ejemplo, *Eubacterium desmolans* 48FAA1), *Eubacterium limosum* 13LG, *Lachnospira pectinoshiza*, *Ruminococcus productus* (por ejemplo, *Ruminococcus productus* 27FM), *Ruminococcus obeum* (por ejemplo,

*Ruminococcus obeum* 11 FM1), *Blautia producta*, y/o *Clostridium thermocellum*, en donde el medio de crecimiento se complementa con Oro líquido.

5 Las condiciones de cultivo para cepas bacterianas ejemplares aisladas usando los métodos proporcionados en el presente documento se dan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Condiciones de cultivo para cepas anaerobias aisladas de una muestra fecal humana.**

Cepa	Especie más cercana	Morfología de la colonia	Medio de crecimiento utilizado para las preparaciones de heces sintéticas <sup>1</sup>	Tasa de crecimiento relativa <sup>2</sup>
18 FAA	<i>Eubacterium rectale</i>	Pequeña, color blanco/translúcida	FAA + DSB al 5 %	+++
10 FAA	<i>Dorea longicatena</i>	Pequeña/media, opaca, algo mucóide	FAA + DSB al 5 %	+++
42 FAA 1	<i>Dorea longicatena</i>	Media, opaca, picada	FAA + DSB al 5 %	+++
31 FAA 1	<i>Roseburia intestinalis</i>	Media, opaca	FAA + DSB al 5 % + LG al 3 %	+++
6 MRS	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	Media, de color blanco, pegajosa	FAA + DSB al 5 %	+++
1 FAA	<i>Eubacterium rectale</i>	Cabeza de alfiler, opaca/color blanco	FAA + DSB al 5 %	+++
27 FM	<i>Ruminococcus productus</i>	Pequeña, de color blanco, seca	FAA + DSB al 5 %	+
30 FAA	<i>Ruminococcus torques</i>	Pequeña, de color blanco, seca	FAA + DSB al 5 %	+++
2 MRS	<i>Ruminococcus obeum</i>	Media, color blanco/opaca, pegajosa	FAA + DSB al 5 %	+
6 FM 1	<i>Eubacterium rectale</i>	Media, color blanco/opaca, pegajosa	FAA + DSB al 5 % + LG al 3 %	+++
2 FAA	<i>Bifidobacterium longum</i>	Pequeña, de color pardo, translúcida, brillo metálico, pegajosa	FAA + DSB al 5 %	+++
39 FAA 1	<i>Roseburia faecalis</i>	Media, color blanco/opaca, picada	FAA + DSB al 5 % + LG al 3 %	+++
14 LG 2	<i>Acidaminococcus intestinalis</i>	Grande, de color blanco	FAA + DSB al 5 %	+++
5 FM	<i>Parabacteroides distasonis</i>	Pequeña, de color blanco, translúcida	FAA + DSB al 5 %	+++
21 FAA 1	<i>Clostridium cocleatum</i>	Media, de color blanco/opaca, muy picada/difícil de raspar, pegajosa	FAA + DSB al 5 %	+++
20 MRS 1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Alfiler, de color pardo/opaca, brillo ligeramente metálico, pegajosa	FAA + DSB al 5 %	+++
48 FAA 1	<i>Eubacterium desmolans</i>	Cabeza de alfiler, de color blanco/opaca, pegajosa	FAA + DSB al 5 %	+
5 MM 1	<i>Bacteroides ovatus</i>	Pequeña, color blanco/translúcida	FAA + DSB al 5 %	+++
4 FM 1	<i>Bifidobacterium longum</i>	Cabeza de alfiler, translúcida, de color amarillo, seca, picada, brillo metálico, pegajosa	FAA + DSB al 5 %	+++
11 FM 1	<i>Ruminococcus obeum</i>	Pequeña, de color blanco/opaca, translúcida	FAA + DSB al 5 %	++
F1 FAA 1	<i>Eubacterium eligens</i>	Cabeza de alfiler, de color rosa/púrpura/opaca	FAA + DSB al 5 % + LG al 3 %	+
25 MRS 1	<i>Lactobacillus casei</i>	Pequeña, color blanco/opaca, pegajosa	FAA + DSB al 5 %	+++
13 LG	<i>Eubacterium limosum</i>	Pequeña, de color blanquecino/opaca	FAA + DSB al 5 % + LG al 3 %	+++
9 FAA	<i>Ruminococcus torques</i>	Pequeña, de color blanco/opaca, translúcida	FAA + DSB al 5 %	+++

47 FAA	<i>Eubacterium ventriosum</i>	Pegajosa, pequeña	FAA + DSB al 5 %	+++
3 FM 2	<i>Collinsella aerofaciens</i>	Cabeza de alfiler, de color blanco/opaca, translúcida, seca	FAA + DSB al 5 %	+++
11 FAA 1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Pequeña, de color amarillo/opaca, mucosoide	FAA + DSB al 5 %	+++
34 FAA 1	<i>Lachnospira pectinoshiza</i>	Cabeza del alfiler, de color amarillo	FAA + DSB al 5 % + LG al 3 %	++
40 FAA	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Cabeza de alfiler, transparente	FAA + LG al 3 %	+++
29 FAA 1	<i>Eubacterium rectale</i>	Pequeña, de color blanco/opaca, translúcida	FAA + DSB al 5 %	+++

<sup>1</sup>FAA: Agar de anaerobios exigentes, disponible en el mercado como Lab90; DSB: Sangre de oveja desfibrinada, disponible en el mercado; LG: Oro líquido (*Liquid Gold*), un sobrenadante de efluente clarificado, filtrado de comunidades de quimiostato sembradas de comunidades fecales sanas, requeridas por una serie de cepas de heces sintéticas para un crecimiento óptimo.

<sup>2</sup>Tasa de crecimiento relativa; en promedio, las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C en condiciones anaerobias.

Como se usa en el presente documento, las bacterias "anaerobias" se refieren a bacterias que son facultativamente anaerobias, así como a bacterias estrictamente anaerobias.

- 5 Como se usa en el presente documento, "medio de cultivo estándar" se refiere a medios de cultivo comunes y/o disponibles en el mercado para microorganismos, tales como caldos de nutrientes y placas de agar, de los cuales se conocen muchas variaciones en la técnica. Los medios de cultivo estándar generalmente contienen al menos una fuente de carbono para el crecimiento bacteriano, por ejemplo, un azúcar tal como glucosa; diversas sales que se requieren para el crecimiento bacteriano, por ejemplo, magnesio, nitrógeno, fósforo y/o azufre; y agua. Los ejemplos
- 10 no limitantes de medios de cultivo estándar incluyen caldo de Lisogenia (LB), caldo A1, y medios de cultivo descritos en el presente documento. Los medios de cultivo estándar serán seleccionados por un experto en la técnica en base al conocimiento general común. Las expresiones "medio de cultivo estándar" y "medio de cultivo de laboratorio estándar" se usan indistintamente en el presente documento.
- 15 Como se usa en el presente documento, los aislados "aislado puro", "aislado único" y "aislado" se usan indistintamente para referirse a un cultivo que comprende una única especie o cepa bacteriana, por ejemplo, que se cultiva axénicamente, en aislamiento de otras especies o cepas bacterianas.

20 Para las cepas enumeradas en las tablas en el presente documento, la especie bacteriana más cercana se determinó usando las secuencias de longitud completa de ARNr 16S, que se alinearon con el servidor NAST (DeSantis, T.Z. Jr. et al., *Nucleic Acids Res.*, 34:W394-W399 (2006)) y después se clasificaron usando el servidor de clasificación GreenGenes (DeSantis, T.Z. Jr. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:5069-5072 (2006)), como se describe a continuación. Se utilizó el nombre más específico en la clasificación de GreenGenes y se indica la puntuación de probabilidad máxima de ADN para cada clasificación.

25

### Ejemplos

30 La presente invención se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan para ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma de ninguna manera.

35 A menos que se defina lo contrario, o el contexto indique claramente otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Quimiostatos de una sola fase e inoculación***

40 Se desarrolló un recipiente de quimiostato de una sola fase para modelar la microbiota intestinal distal humana mediante la modificación de un sistema de fermentación Multifors (Infors, Suiza, que se muestra en la Figura 1). La conversión de un sistema de fermentación en un quimiostato se logró bloqueando el condensador y burbujando gas nitrógeno a través del cultivo. La acumulación de presión forzó el desecho de un tubo de metal (anteriormente un tubo de muestreo) a una altura establecida y permitió el mantenimiento de un volumen de trabajo de 400 ml.

45

Durante toda la duración del experimento, los recipientes se mantuvieron anaerobios burbujando gas nitrógeno filtrado (Praxair) a través del cultivo. La temperatura (37 °C) y el pH (ajustado a 7,0; usualmente fluctuaba de

aproximadamente 6,9 a 7 en el cultivo) se controlaron automáticamente y se mantuvieron por el sistema operado por ordenador. El sistema mantuvo el pH del cultivo usando HCl al 5 % (v/v) (Sigma) y NaOH al 5 % (p/v) (Sigma). El medio de crecimiento se suministró continuamente al recipiente a una velocidad de 400 ml/día (16,7 ml/hora) para proporcionar un tiempo de retención de 24 horas, un valor ajustado para imitar el tiempo de retención del intestino distal (Cummings, J. H. et al., Gut (1976), 17: 210-18). Otro tiempo de retención de 65 horas (~148 ml/día, 6,2 ml/hora) también se ensayó para determinar el efecto del tiempo de retención en la composición de la comunidad del quimiostato.

Dado que el medio de crecimiento contenía componentes que no pueden sobrevivir a la esterilización mediante tratamiento en autoclave (véase a continuación), los recipientes se trataron en autoclave con 400 ml de ddH<sub>2</sub>O. Durante el tratamiento en autoclave, las tuberías de desecho se ajustaron para que el tubo de metal alcanzara el fondo del recipiente. Una vez que el recipiente se enfrió, se ajustó al resto de la unidad operada por ordenador, se burbujeó gas nitrógeno filtrado a través del agua para presurizar y drenar el recipiente. Después, el tubo de desecho se elevó al volumen de trabajo (400 ml) y se bombearon 300 ml de medio estéril al recipiente. El recipiente se dejó entonces en agitación, calentamiento y desgasificación durante una noche. Para verificar la contaminación dentro del recipiente, cada recipiente se muestreó asépticamente y se colocó en placas (tanto de forma aerobia como anaerobia) sobre agar de anaerobios exigentes (FAA) complementado con sangre de oveja desfibrinada al 5 %. Este procedimiento se repitió un día antes de la inoculación e inmediatamente antes de la inoculación para evitar la contaminación.

### **Recolección y preparación de inóculo fecal**

Las muestras fecales frescas se proporcionaron por una donante femenina sana (42 años de edad, sin antecedentes de uso de antibióticos en los 10 años anteriores a la donación de heces; "Donante 6") o por un donante masculino sano (43 años de edad, sin antecedentes de uso de antibióticos en los 6 años anteriores a la donación de heces; "Donante 5"). Otros donantes también proporcionaron muestras fecales (por ejemplo, Donante 1, Donante 2, etc.). Todos los donantes eran sujetos sanos de 38 a 43 años de edad sin antecedentes recientes de tratamiento con antibióticos. Se obtuvo la aprobación de la Junta de ética de investigación (REB) para la recolección y el uso de materia fecal en estos experimentos.

Para preparar el inóculo, se recogieron muestras de heces recientemente evacuadas y se colocaron inmediatamente en una cámara anaerobia (en una atmósfera de N<sub>2</sub> al 90 %, CO<sub>2</sub> al 5 % y H<sub>2</sub> al 5 %). Se preparó inmediatamente una suspensión fecal al 10 % (p/v) mediante maceración de 5 g de heces frescas en 50 ml de solución salina tamponada con fosfato anaerobia (PBS) durante 1 minuto usando un Stomacher (Tekmar Stomacher Lab Blender, fabricado por Seward). La suspensión fecal resultante se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm para eliminar grandes residuos de alimentos. El sobrenadante resultante se usó como inóculo para este estudio. El sobrenadante de suspensión fecal original al 10 % p/v se denomina en el presente documento como "inóculo al 10 %". También se comparó un inóculo al 10 % con un inóculo al 20 % (p/v) para determinar si existían diferencias entre estas dos concentraciones. El inóculo al 20 % (p/v) se preparó de la misma manera que el inóculo al 10 %, excepto que se añadieron 10 g de heces a 50 ml de PBS anaerobio antes de la homogeneización. De nuevo, el inóculo derivado del sobrenadante de suspensión fecal original al 20 % p/v se denomina en el presente documento como "inóculo al 20 %".

### **Proceso de inoculación**

Para dar un volumen de trabajo final de 400 ml, se añadieron 100 ml de inóculo al 10 % a los 300 ml de medio estéril en cada recipiente. Dado que el grosor del inóculo fecal dificultaba la siembra del recipiente a través del tapón usando una aguja, el inóculo se añadió al recipiente a través del tubo de desecho usando una jeringa. Inmediatamente después de la inoculación, los controles de pH se activaron de modo que el pH del recipiente se ajustó y mantuvo a un pH de aproximadamente 6,9 a 7,0. Durante las primeras 24 horas posteriores a la inoculación, las comunidades se cultivaron en cultivos discontinuos para permitir que la comunidad se ajustara de las condiciones *in vivo* a las condiciones *in vitro* y evitara el lavado del cultivo. Durante este período, los recipientes se calentaron, se desgasificaron y se agitaron con un ajuste de pH continuo. Después de este período de 24 horas, las bombas de alimentación se encendieron y los recipientes se usaron como quimiostatos. Se añadió continuamente medio de cultivo fresco y los residuos se eliminaron continuamente.

En el quimiostato, las condiciones de cultivo y el suministro de medios se mantuvieron constantes. El sistema de quimiostato generalmente se ajustó con un tiempo de retención de 24 horas para imitar el tiempo de tránsito del intestino distal.

### **Preparación del medio de crecimiento**

Se desarrolló un medio de crecimiento de cultivo para el quimiostato basado en el medio usado en estudios anteriores que intentaban imitar el intestino humano (Gibson, G.R. et al., Appl. Environ. Microbiol., 54(11):2750-5, 1988; Lesmes, U. et al., J. Agric. Food Chem., 56: 5415-5421, 2008). Debido a la gran cantidad de medio utilizado por cada recipiente, el medio se preparó en volúmenes de 2 l. El medio de cultivo se preparó en las siguientes



etapas (para 2 l):

**Mezcla 1:** Los siguientes reactivos se disolvieron en 1800 ml de agua destilada (ddH<sub>2</sub>O): agua de peptona, 4 g (Oxoid Limited); Extracto de levadura, 4 g (Oxoid Limited); NaHCO<sub>3</sub>, 4 g (Sigma); CaCl<sub>2</sub>, 0,02 g (Sigma); Pectina (de cítricos), 4 g (Sigma); xilano (de madera de haya), 4 g (Sigma); Arabinogalactano, 4 g (Sigma); Almidón (de trigo, sin modificar), 10 g (Sigma); Caseína, 6 g (Sigma); inulina (de tubérculos de Dahlia), 2 g (Sigma); NaCl, 0,2 g (Sigma). Se añadió agua (ddH<sub>2</sub>O) a 1900 ml, ya que el volumen se reduce a 1800 ml después del tratamiento en autoclave. La mezcla se esterilizó mediante tratamiento en autoclave a 121 °C durante 60 min y se dejó enfriar durante una noche.

**Mezcla 2:** Los siguientes reactivos (todos adquiridos en Sigma) se disolvieron en 100 ml de agua destilada (Mezcla 2A): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,08 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,08 g; MgSO<sub>4</sub>, 0,02 g; Hemina, 0,01 g; Menadiona, 0,002 g. Las sales biliares (1 g) se disolvieron en 50 ml de agua destilada (Mezcla 2B). También se disolvió L-cisteína HCl (1 g) en 50 ml de agua destilada (Mezcla 2C). Después de que las Mezclas 2B y 2C se disolvieran, se añadieron a la Mezcla 2A dando como resultado la formación de un fino precipitado de color blanco. Este precipitado se disolvió entonces mediante la adición gota a gota de KOH 6 M hasta que se formó una solución de color marrón claro (Mezcla 2). Esta mezcla (200 ml de volumen total) se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm.

**Medio de cultivo ("Medio 1"):** La mezcla 2 (0,2 l) se añadió asépticamente a la mezcla 1 (1,8 l), para alcanzar el volumen final de 2 l. Para evitar una futura formación de espuma, se añadieron asépticamente 5 ml de emulsión de silicona antiespumante B (J.T. Baker) a cada botella de medio de 2 l. El medio se almacenó a 4 °C hasta su uso durante un máximo de dos semanas. Se puso en placas un poco de medio en FAA (de forma aerobia y anaerobia) el día antes de añadirlo al quimiostato e inmediatamente después de quitar el quimiostato, para verificar la contaminación.

El medio se bombeó en cada recipiente usando una bomba peristáltica cuya velocidad está controlada por el sistema operado por ordenador. Para bombear medio desde las botellas al recipiente, las tapas de botellas de vidrio estándar GL-45 (VWR) tenían agujeros perforados en ellas para acomodar dos tubos metálicos de acero inoxidable. Cuando se preparó la Mezcla 1, la botella de medio tenía todos los tubos de silicona necesarios y filtros de 0,22 µm conectados (véase la Figura 1).

Cada recipiente se suministró de una botella de medio con un volumen de 2 l de medio. Dado que los tubos que suministraban el medio al recipiente también se cambiaron a medida que se cambiaba cada botella de medio, esto ayudó a evitar el retroceso de las bacterias del recipiente hacia el depósito de medio estéril. Cada botella de medio se puso en placas sobre FAA complementado y se cultivó tanto de forma aerobia como anaerobia antes de añadir cada botella al quimiostato y después de eliminar cada botella del quimiostato.

Se comparó el medio de cultivo (Medio 1) con un medio previamente descrito en la bibliografía (Walker, A.W. et al., Appl. Environ. Microbiol., 71(7): 3692-700, 2005), ya que el pH y el suministro peptídico puede alterar las poblaciones bacterianas y las relaciones de ácidos grasos de cadena corta dentro de las comunidades microbianas del colon humano. Este medio se preparó usando un método similar al utilizado para preparar este medio, solamente cambió la composición de las dos mezclas. El medio de quimiostato descrito en Walker et al. se preparó en las siguientes etapas (para 2 l):

**Mezcla 1:** Los siguientes reactivos se disolvieron en 1800 ml de agua destilada: agua de peptona, 12 g; NaHCO<sub>3</sub>, 6,4 g; pectina (de cítricos), 1,2 g; xilano (de haya), 1,2 g; arabinogalactano, 1,2 g; almidón (trigo, no modificado), 10 g; hidrolizado de caseína, 12 g; amilopectina, 1,2 g. Esta mezcla se esterilizó en un autoclave a 121 °C durante 60 minutos.

**Mezcla 2:** Se disolvió L-cisteína HCl (1 g) en 100 ml de agua destilada (Mezcla 2A). Las sales biliares (1 g) se disolvieron en 100 ml de agua destilada (Mezcla 2B). Se añadió la Mezcla 2B a la Mezcla 2A dando como resultado la formación de un precipitado de color blanco fino. El pH de la solución se ajustó entonces mediante la adición gota a gota de KOH 6 M hasta que se formó una solución transparente incolora. Esta mezcla (200 ml de volumen total) se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm.

**Medio de quimiostato:** La mezcla 2 (0,2 l) se añadió asépticamente a la mezcla 1 (1,8 l), para alcanzar el volumen final de 2 l. Para evitar la formación de espuma en el futuro, se añadieron asépticamente 5 ml de emulsión de silicona antiespumante B a cada botella de medio de 2 l. El medio se almacenó a 4 °C hasta su uso durante un máximo de dos semanas.

Para determinar si la adición de mucina al medio de cultivo (Medio 1) tenía un efecto sobre la composición y estructura de las comunidades sanas del intestino distal, se comparó un recipiente alimentado con el medio de cultivo (sin mucina) con dos recipientes alimentados con los medios de cultivo (que contienen mucina). El medio de quimiostato con mucina se preparó de manera similar al medio de cultivo sin mucina, con un par de cambios. En primer lugar, la mezcla 1 se preparó añadiendo 1600 ml de ddH<sub>2</sub>O antes del tratamiento en autoclave. La adición de mucina se preparó disolviendo 8 g de mucina (del estómago porcino, tipo II) en 200 ml de ddH<sub>2</sub>O, y se trató en autoclave durante 20 minutos. La Mezcla 2 se preparó como se ha descrito anteriormente. Después del tratamiento

en autoclave, la mezcla 2 (0,2 l) y la solución de mucina (0,2 l) se añadieron asépticamente a la mezcla 1 (1,6 l), para alcanzar el volumen final de 2 l. De nuevo, se añadieron asépticamente 5 ml de emulsión de silicona antiespumante B a cada botella de 2 l de medio. El medio se almacenó también a 4 °C hasta su uso durante un máximo de dos semanas.

5

### **Muestreo**

Se muestreó cada recipiente de quimiostato eliminando a diario 4 ml de cultivo a través del tapón usando una aguja y una jeringa estériles. Las muestras se transfirieron a dos tubos con tapón de rosca que se almacenaron a -80 °C para su archivo. Durante los días laborables, se añadieron 10 gotas de emulsión de silicona antiespumante B a través del tapón con una jeringa y una aguja a las 9 a.m. y 5 p.m. (20 gotas por día en total). Los fines de semana, se añadieron 20 gotas de antiespumante a cada recipiente aproximadamente a las 12:00 p.m. Esta cantidad de antiespumante añadido a cada recipiente a diario (junto con la cantidad de antiespumante presente en el medio) fue suficiente para evitar la formación de espuma en este sistema utilizando un tiempo de retención de 24 horas.

15

### **Extracción de ADN**

El ADN utilizado para el análisis por DGGE se extrajo usando un protocolo que implica una combinación de batido de perlas, el kit de ADN de heces Omega Bio-Tek E.Z.N.A.®, y el kit de purificación de ADN Promega Maxwell®16. La primera mitad del protocolo sigue a la revisión de junio de 2009 del protocolo del kit de ADN de heces E.Z.N.A.® con algunas alteraciones. Brevemente, se añadieron 200 µl de quimiostato líquido o muestra fecal, 300 µl de tampón SLX del kit E.Z.N.A., 10 µl de 20 mg/ml de proteinasa K (en CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM) y 200 mg de perlas de vidrio en un tubo con tapón de rosca y un batidor de perlas durante 4 x 45 segundos (3 minutos en total). Las muestras se incubaron entonces a 70 °C durante 10 minutos, 95 °C durante 5 minutos y sobre hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 100 µl de tampón P2 del kit E.Z.N.A. a cada tubo y se agitaron vorticialmente durante 30 segundos. Esto se siguió de incubación sobre hielo durante 5 minutos y centrifugación a 14500xg durante 5 minutos. Después, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadieron 200 µl de reactivo HTR del kit E.Z.N.A. a cada tubo usando puntas de perforación ancha. Después, las muestras se agitaron vorticialmente durante 10 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos. Después, los tubos se centrifugaron a 14500xg durante 2 minutos y el sobrenadante se transfirió a cartuchos Maxwell. El resto del protocolo de extracción de ADN se realizó como se describe en el protocolo del kit de purificación de ADN Maxwell®16 (Promega).

20

25

30

### **PCR y DGGE**

La región V3 (339-539 pb, numeración de *Escherichia coli*) del gen ARNr 16S se amplificó usando los cebadores HDA1 y HDA2-GC (Walter, J. et al., Appl. Environ. Microbiol., 66(1): 297-303, 2000). La mezcla maestra de PCR consistió en Tsg ADN polimerasa (Bio Basic) y tampón 1x Thermopol (con MgSO<sub>4</sub> 2 mM, NEB), usando ADN (extraído como se ha descrito anteriormente) como molde. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 92 °C durante 2 minutos (92 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 minuto) x 35; 72 °C durante 10 min. Se establecieron tres reacciones de PCR de 50 µl idénticas para cada muestra usando 2 µl de molde de ADN. Cada muestra se concentró usando el kit de purificación de productos de PCR de columna de centrifugación EZ-10 (Bio Basic) cargando las tres reacciones de PCR de cada muestra sobre la misma columna y eluyendo en 45 µl de agua de grado HPLC caliente. Una vez que se concentraron las reacciones de PCR, se añadieron a cada muestra 10 µl de colorante de carga de DGGE (0,05 g de azul de bromofenol en 10 ml de 1 x TAE).

35

40

45

Se usó una escalera de DGGE creada a partir de cinco cepas de laboratorio para normalizar el gel. Esta escalera consistió en reacciones de PCR de DGGE V3 de las cepas de laboratorio 1/2/53 (*Coprobacillus*), 30/1 A (*Enterococcaceae*), 5/2/43 FAA (*Veillonella*), 1/1/41 A1 FAA CT2 (*Peptostreptococcaceae*), y 7/6/55B FAA (*Propionibacterium*). El ADN de estas cepas se extrajo utilizando el método descrito por Strauss et al. (Strauss, J. et al., Anaerobe, 14(6): 301-9, 2008). Las reacciones de PCR utilizadas para generar los amplicones para construir la escalera se prepararon como se ha descrito anteriormente, excepto que se preparó 1 reacción de PCR por tinción. Las cinco reacciones de PCR diferentes se agruparon y se añadieron 62,5 µl de colorante de carga de DGGE a la mezcla.

50

El protocolo utilizado para el análisis de DGGE se desarrolló en base a un protocolo que usa el sistema DCode (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos) descrito por Muyzer et al. (Muyzer, G. et al., Antonie Van Leeuwenhoek, 73(1): 127-41, 1998). Se cargaron 40 µl de la mezcla de PCR/colorante en cada carril del gel. Los geles de poliacrilamida consistieron en poliacrilamida al 8 % (v/v) (37,5:1 de acrilamida/bisacrilamida) en 0,5x TAE (TAE es base Tris, ácido acético y tampón EDTA, fabricado usando la siguiente receta: Base tris [tris(hidroximetil)aminometano] (0,048 % p/v); ácido acético glacial (17,4 M) (0,011 % v/v), sal disódica de EDTA (0,0037 % p/v). Los amplicones se separaron usando un gradiente de desnaturalización del 30-55 %. La electroforesis se realizó en tampón TAE 0,5x a una temperatura constante de 60 °C durante 5 h a 120 V. Los geles se tñieron durante 10 minutos en una solución de bromuro de etidio (en TAE 1x, Sigma Aldrich) y se destñieron durante 10 minutos en ddH<sub>2</sub>O. Las imágenes se capturaron usando el sistema de documentación en gel SynGene G-Box y el software GeneSnap (versión 6.08.04). Los geles se normalizaron para la saturación mientras se capturaban las imágenes.

55

60

65

**Análisis estadístico de DGGE**

Las imágenes de gel de DGGE se analizaron usando el software Syngene GeneTools (versión 4.01.03, Perkin Elmer). El fondo de la imagen se restó mediante la resta del disco rodante con un radio de 30 píxeles. Los carriles se detectaron manualmente y se ajustaron en cada imagen de gel. Las bandas analizadas se detectaron tanto automática como manualmente para cada perfil.

Los perfiles se emparejaron utilizando el tipo de "perfil" en el menú de parámetros coincidentes con una tolerancia de ajuste del 1 %. Los dendrogramas se dibujaron utilizando el método de agrupamiento de pares no ponderados con la media aritmética (UPGMA). La comparación de perfiles dio como resultado una matriz de similitud generada automáticamente y un dendrograma. Los valores de índice de similitud varían de 0 a 1, indicando los valores de 0 que dos perfiles no tienen bandas en común, mientras que los valores de 1 indican que los dos perfiles tienen patrones de bandas idénticos. Los valores de similitud porcentual se calcularon multiplicando el valor del índice de similitud por 100.

Comparación de dos recipientes el día (x): La similitud de dos recipientes se determinó trazando el % de similitud de V(x) frente a V(y) frente al día en que se tomó la muestra. Este análisis se realizó para muestras tomadas cada dos días a partir del Día 0.

Dinámica de la comunidad: La dinámica de la comunidad representa los cambios dentro de una comunidad en un marco de tiempo fijo. El análisis de la ventana móvil se realizó trazando el % de similitud entre los puntos de muestreo consecutivos. En este caso, se elige trazar el Día (x-2) frente al Día (x). Se encuentra que este intervalo de tiempo fue adecuado y no hizo perder grandes fluctuaciones en la dinámica de la comunidad y estaba de acuerdo con la bibliografía anterior (Possemiers, S. et al., FEMS Microbiol. Ecol., 49(3): 495-507, 2004). Este análisis dio como resultado la generación de un gráfico que se usó para evaluar la estabilidad de la comunidad, así como para determinar cuánto tiempo tardó el recipiente en alcanzar el estado estable. En la Figura 13c se muestra un ejemplo de un gráfico de correlación de ventana móvil que ilustra la dinámica de la comunidad.

La tasa de cambio (At) puede calcularse entonces como 100 - el promedio de los puntos de datos de la curva de ventana móvil respectiva (Marzorati, M. et al., Environ. Microbiol., 10(6): 1571-81, 2008). Cuanto mayor sea el cambio entre los perfiles de los puntos de muestreo consecutivos, mayor será el valor de Δt. Sin embargo, dado que se observa un período de estabilización inicial a medida que la comunidad pasa de un entorno *in vivo* a uno *in vitro*, los valores pueden variar dependiendo del período elegido (Marzorati, M. et al., Environ. Microbiol., 10(6): 1571-81, 2008). De acuerdo con dos documentos de Wittebolle et al. (Marzorati, M. et al., Environ. Microbiol., 10(6): 1571-81, 2008; Wittebolle, L. et al., J. Appl. Microbiol., 107(2):385-94, 2009), un valor Δt bajo varía del 0-5 %, un valor medio varía del 5-15 %, y un valor alto es del 15 +% . El estado estable se alcanza una vez que la curva del gráfico permanece por encima del umbral establecido. Se consideró que estas comunidades de quimiostatos eran estables (en estado estable) una vez que se mantuvo un valor Δt bajo (0-5 %) por la comunidad.

**Índice de diversidad de Shannon**

El índice de Shannon es una medida matemática comúnmente utilizada de diversidad de la comunidad que tiene en cuenta tanto la riqueza de especies (número de especies presentes) como la uniformidad (abundancia relativa de especies). El índice de diversidad de Shannon (H') se calcula como se muestra a continuación (Marzorati, M. et al., Environ. Microbiol., 10(6): 1571-81, 2008):

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \ln p_i)$$

donde:

- H' = el valor del índice de diversidad de Shannon
- p<sub>i</sub> = la proporción de la i-ésima especie
- ln = el logaritmo natural de p<sub>i</sub>
- S = número total de especies en la comunidad (riqueza)
- Σ = suma de la especie 1 a la especie S.

El valor mínimo del índice de Shannon es cero, que es igual al valor de H' para una comunidad con una sola especie (es decir, un monocultivo sin diversidad). El valor H' aumenta a medida que la riqueza y la uniformidad de la comunidad aumentan. Debido a esto, un aumento en H' puede ser el resultado de un aumento en la riqueza de especies, un aumento en la uniformidad de las especies, o un aumento en ambos. Éste es un defecto en el índice y la razón por la cual se debe tener cuidado al usar esta medida de diversidad. Se ha encontrado que los valores H' varían de 1,5 (baja riqueza y uniformidad de especies) hasta 3,5 (alta uniformidad y riqueza de especies) en sistemas naturales (MacDonald, G.M., 2003, Biogeography: Space, Time and Life, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A. ,

pág. 409). Sin embargo, parece más importante usar el índice de Shannon para medir y rastrear cambios en la diversidad de las muestras en comparación con el inóculo fecal original (Gafan, G.P. et al., J. Clin. Microbiol., 43(8): 3971-8, 2005).

##### 5 **Riqueza ponderada por rango**

La riqueza ponderada por rango (Rr) es una medida de la riqueza de la comunidad que toma en cuenta el porcentaje de desnaturalizante necesario para describir la diversidad de la comunidad cuando se analizan los geles de DGGE (Marzorati, M. et al., Environ. Microbiol., 10(6):1571-81, 2008). Rr se calcula como se muestra a continuación:

$$10 \quad Rr = N^2 \times D_g$$

donde:

- Rr = Riqueza ponderada por rango
- N = número total de bandas en el patrón
- 15 -  $D_g$  = gradiente desnaturalizante comprendido entre la primera y la última banda del patrón.

Los valores bajos de Rr son inferiores a 10, los valores medios de Rr varían de 10 a 30, y los valores altos de Rr son superiores a 30 (Marzorati, M. et al., Environ. Microbiol., 10(6):1571-81, 2008).

##### 20 **Equidad de Shannon**

La uniformidad de la comunidad es el grado en que el número de individuos se divide en partes iguales entre las diferentes especies de la comunidad. La uniformidad de la comunidad se puede evaluar calculando la equidad de Shannon ( $E_H$ ; Marzorati, M. et al., Environ. Microbiol., 10(6):1571-81, 2008).  $E_H$  se calcula dividiendo el índice de Shannon ( $H'$ ) por  $H_{m\acute{a}x}$  (donde  $H_{m\acute{a}x}$  es  $\ln S$ ). Esto se muestra a continuación de la siguiente manera:

$$E_H = H'/H_{m\acute{a}x} = H'/\ln S$$

30 Los valores de  $E_H$  varían de 0 - 1, representando un valor de 0 la desigualdad completa de la comunidad y representando un valor de 1 la uniformidad completa de la comunidad. Los aumentos en la uniformidad dan como resultado un aumento en la diversidad de la comunidad (Pielou, E. C. 1975. Ecological diversity. Wiley, Nueva York).

##### **EJEMPLO 1. Umbral para el análisis por DGGE.**

35 Un estudio de Possemiers *et al.* (Possemiers, S. et al., FEMS Microbiol. Ecol., 49(3):495-507, 2004) establecieron un criterio de estabilidad umbral del 80 % de similitud (o 20 % de variabilidad) para estudios de DGGE basados en la variabilidad dentro del gel vista entre carriles de marcadores idénticos. Según este estudio, el umbral se puede usar junto con el análisis de correlación de ventana móvil para controlar la dinámica de la comunidad. Este enfoque nos permite examinar la similitud de un recipiente con el tiempo. El umbral de similitud del 80 % se puede utilizar entonces para determinar cuánto tiempo tarda un recipiente en elevarse por encima de este punto de corte y alcanzar el estado estable.

45 Para aplicar este umbral a estos estudios, se realizó un análisis similar en los carriles de marcadores de estos geles de DGGE. Se encontró un promedio de  $80,4 \pm 8,9$  % de similitud, o  $19,6 \pm 8,9$  % de variabilidad, entre estos carriles de marcadores. Dado que estos valores se corresponden bien con los valores utilizados en el estudio de Possemiers et al., también se utilizó un umbral del 80 % de similitud para nuestros análisis. En algunos casos, el individuo dentro de la variación del gel se usó como punto de corte.

50 En los Ejemplos a continuación, se analizó el proceso de colonización en dos recipientes idénticos para determinar si estos recipientes se pueden realizar en paralelo y aún mantener comunidades idénticas. También se compararon diferentes concentraciones de inóculos fecales, diferentes composiciones de medio, y diferentes tiempos de retención del sistema para optimizar el funcionamiento de este sistema de quimiostato.

##### 55 **EJEMPLO 2. Comparación del mismo donante a lo largo del tiempo.**

El patrón de DGGE de inóculos al 10 % del Donante 2 (una mujer sana de 38 años) durante un período de 8 meses se muestra en la Figura 2. Como se ve por inspección visual, la variación en los perfiles parece deberse a diferencias en el brillo de la banda, no en la aparición o desaparición de las bandas. Los inóculos aislados de este donante tenían un coeficiente de correlación promedio de  $76,9 \pm 8,7$  %. Se mostraron ligeras diferencias entre los perfiles en la Figura 2, donde las muestras mostraron similitudes ligeramente mayores dependiendo del momento de la recolección de la muestra. En general, la microbiota intestinal de este donante sano se mantuvo estable en el tiempo.

65 La microbiota intestinal de este donante mantuvo una gran diversidad a lo largo del tiempo, con un valor medio del índice de Shannon-Weaver de  $3,39 \pm 0,08$ . La microbiota del donante también mantuvo una riqueza promedio

ponderada por rango muy alta a  $776,5 \pm 27,7$ . Finalmente, la uniformidad de la comunidad se mantuvo estable a lo largo del tiempo, con un valor promedio de equidad de Shannon de  $0,82 \pm 0,02$ .

### EJEMPLO 3. Comparación de diferentes donantes.

5 Se usó DGGE para comparar inóculos fecales aislados de cuatro donantes sanos diferentes (de 38 a 43 años de edad sin antecedentes recientes de tratamiento con antibióticos) (Figura 3). Se encontró que la comunidad fecal de cada donante era diferente de las comunidades de otros individuos (como se esperaba, Tannock, G.W., Eur. J. Clin. Nutr., 56 Suppl. 4: S44-9, 2002). El coeficiente de correlación promedio entre los inóculos de diferentes donantes fue de  $74,4 \pm 8,4$  %.

10 La microbiota intestinal de los cuatro donantes tenía una alta diversidad, con un valor promedio del índice de Shannon-Weaver de  $3,42 \pm 0,04$ . La microbiota del donante también mantuvo una riqueza promedio ponderada por rango muy alta a  $585,3 \pm 26,2$ . La uniformidad de la comunidad entre los diferentes donantes fue bastante similar, con un valor promedio de equidad de Shannon de  $0,86 \pm 0,01$ .

15 También se usó DGGE para comparar dos comunidades diferentes, sembradas por muestras fecales de dos donantes sanos diferentes, cada uno de los cuales donó en al menos dos ocasiones distintas. El Donante 5 hizo dos donaciones, con aproximadamente 5 meses de diferencia: La "Realización 20" se inoculó el 28 de octubre de 2011, y la "Realización 22" se inoculó el 23 de marzo de 2012. El Donante 6 hizo dos donaciones con aproximadamente 6 meses de diferencia: La "Realización 16" se inoculó el 10 de febrero de 2011, y la "Realización 19" se inoculó el 3 de agosto de 2011. Se cuestionó cuán similares son los inóculos de los dos donantes diferentes entre sí; si se viera la misma pérdida de diversidad de cada donante; y cuán diferentes son los dos donantes el uno del otro.

20 Los resultados se muestran en las Figuras 10-13. La Figura 10 muestra que el inóculo fecal utilizado para sembrar los recipientes de quimiostato fue muy similar a la donación fecal inicial y no se alteró significativamente por el proceso de preparación del inóculo. La Figura 11 muestra que los perfiles de DGGE de los Donantes 5 y 6 fueron consistentes entre las donaciones. La Figura 12 muestra que, por DGGE, los inóculos fecales del mismo donante en dos ocasiones diferentes fueron más similares entre sí que los inóculos fecales del otro donante. Además, las comunidades de estado estable sembradas con heces del mismo donante fueron más similares entre sí entre las realizaciones de quimiostato que a las comunidades sembradas con heces de otro donante. La Figura 13 muestra que la uniformidad en dos recipientes con el mismo inóculo fue similar entre sí, estable en el tiempo, y similar a la del inóculo de partida.

### 35 EJEMPLO 4. Comparación del inóculo al 10 % contra el 20 %.

40 Se usó DGGE para evaluar si un inóculo al 10 % o al 20 % era más adecuado para sembrar un recipiente de quimiostato manteniendo una mayor diversidad (Figura 4). Las comparaciones dentro del grupo de los inóculos al 10 % dieron un coeficiente de correlación del 98,1 %, mientras que los inóculos al 20 % dieron un coeficiente de correlación del 98,4 %. Las comparaciones entre grupos de los inóculos al 10 % y al 20 % dieron un coeficiente de correlación promedio de  $97,9 \pm 0,7$  %. Con pocas diferencias entre los valores intra e intergrupales, se observaron pequeñas diferencias en las concentraciones de inóculos.

45 No hubo diferencias entre la diversidad de los inóculos al 10 % y al 20 %. Los valores del índice de Shannon-Weaver para los inóculos al 10 % y al 20 % fueron altos, con valores de 3,38 y 3,37, respectivamente. Además, los valores de riqueza ponderada por rango para los inóculos al 10 % y al 20 % fueron muy altos, con valores de 802,9 y 810,0, respectivamente. Tampoco hubo diferencias entre la uniformidad de los inóculos al 10 % y al 20 %. Los inóculos al 10 % y al 20 % tenían ambos valores de equidad de Shannon de 0,82.

50 Ambos inóculos fueron similares a las muestras fecales, con coeficientes de correlación del 86,4 % para los inóculos al 10 % y del 80,9 % para los inóculos al 20 %. Estos inóculos también fueron similares a los sedimentos respectivos formados durante la preparación de inóculos, con coeficientes de correlación del 73,7 % para el inóculo al 10 % y del 75,5 % para el inóculo al 20 % (Tabla 5).

55 **Tabla 5.** Coeficientes de correlación para el inóculo al 10 % y el inóculo al 20 %.

	Inóculo al 10 %	Inóculo al 20 %
Haces frente al inóculo	86,4	80,9
Inóculo frente al sedimento	73,7	75,5
Heces frente al sedimento	86,4	85,7

### EJEMPLO 5. Comparación de dos recipientes realizados en paralelo.

60 Se usó DGGE para controlar la composición, diversidad y dinámica de dos recipientes de quimiostato idénticos (V1 y V2). Cada recipiente se sembró con inóculos fecales del mismo donante sano para determinar si estos dos recipientes podían mantener comunidades idénticas.

5 Los inóculos utilizados para sembrar cada recipiente fueron muy similares entre sí e inmediatamente después de la inoculación, los coeficientes de correlación de las muestras tomadas de cada recipiente fueron del 91,3 %. La composición de cada recipiente varió entre sí los días 2-8, sin embargo, las comunidades dentro de cada recipiente se hicieron más similares entre sí los días 10-28, con un coeficiente de correlación promedio de  $94,7 \pm 2,0$  %.

10 GeneTools (software de análisis estadístico; Syngene) solamente tiene en cuenta la riqueza de especies al calcular sus índices de similitud. Ambos recipientes fueron similares al 95,6 % entre sí el día 10 según el análisis de GeneTools y, por lo tanto, compartieron la mayoría de sus bandas entre los perfiles. Sin embargo, los recipientes difieren entre sí en términos del brillo de estas bandas. Tras la inspección visual soportada por medidas de uniformidad, ambos recipientes mostraron comunidades idénticas en términos de patrones de bandas y brillo de banda el día 26.

15 Durante los 10 días iniciales del experimento, las comunidades en ambos recipientes fueron inestables y tenían valores de  $\Delta t$  altos como se determinó usando el análisis de ventana móvil (Figura 5). Entre los días 0-10, ambos recipientes tuvieron valores  $\Delta t$  altos similares, con promedios de  $25,1 \pm 13$  % para V1 y  $20,8 \pm 9,0$  % para V2 ( $p > 0,10$ ). Entre los días 24 y 28, V1 y V2 tuvieron dinámicas bajas similares, con valores  $\Delta t$  de  $1,6 \pm 0,2$  % para V1 y  $3,9 \pm 1,6$  % para V2 ( $p > 0,10$ ).

20 La diversidad de la comunidad fue muy alta durante todo el experimento, sin embargo, se observó una caída inicial entre los días 0 y 10, con valores del índice de Shannon-Weaver que cayeron de 3,38 a 2,93 para V1 y de 3,38 a 3,00 para V2. Esta caída se estabilizó el día 14, dando un valor promedio del índice de Shannon-Weaver de  $3,03 \pm 0,06$  para V1 y  $2,98 \pm 0,10$  para V2 entre los días 14 y 28 ( $p > 0,10$ ). La riqueza ponderada por rango de la comunidad también registró un descenso entre los días 0 a 10, con valores que cayeron de 578,6 a 341,7 para V1 y de 582,4 a 325,7 para V2. Al igual que la diversidad, la caída en los valores de riqueza ponderada por rango se igualaron el día 14, dando valores promedio de  $303,0 \pm 43,1$  para V1 y  $299,0 \pm 31,6$  para V2 entre los días 14 y 28 ( $p > 0,10$ ). También se observó un descenso en la uniformidad de la comunidad durante los 10 días iniciales del experimento. Los valores de equidad de Shannon cayeron ligeramente de 0,86 a 0,80 para V1 y de 0,86 a 0,82 para V2. Esta caída se estabilizó el día 14, dando valores promedio de  $0,83 \pm 0,01$  para V1 y  $0,82 \pm 0,02$  para V2 entre los días 14 y 28 ( $p > 0,10$ ) (Tabla 6).

35 Para determinar la importancia biológica de estas comunidades de estado estable, se compararon los perfiles de estos recipientes inmediatamente después de la inoculación con las muestras del estado estable (día 26), como se muestra en la Figura 5. Se encontró que V1 y V2 eran un 96,3 % similares entre sí inmediatamente después de la inoculación, y un 96,0 % similares entre sí 26 días después de la inoculación. Sin embargo, V1 el día 0 y V1 el día 26 fueron un 40,2 % similares entre sí, mientras que V2 el día 0 y V2 el día 26 fueron un 39,3 % similares entre sí.

**Tabla 6.** Comparación de dos comunidades cultivadas por separado con inóculos fecales del mismo donante sano, en el Recipiente n.º 1 (V1) y en el Recipiente n.º 2 (V2).

Parámetro	V1	V2	Periodo de tiempo (días x-y)	Resultado de la prueba t pareada
Dinámica (Dy)	$25,1 \pm 13$ %	$20,8 \pm 9,0$ %	0-10	$p > 0,10$
	$1,6 \pm 0,2$ %	$3,9 \pm 1,6$ %	24-28	$p > 0,10$
Índice de Shannon (H)	$3,03 \pm 0,06$	$2,98 \pm 0,10$	14-28	$p > 0,10$
Riqueza ponderada por rango (Rr)	$303,0 \pm 43,1$	$299,0 \pm 31,6$	14-28	$p > 0,10$
Equidad de Shannon (E <sub>H</sub> )	$0,83 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,02$	14-28	$p > 0,10$

40

#### EJEMPLO 6. Comparación de diferentes medios.

45 El laboratorio desarrolló una receta de medio de cultivo basada en otras dos recetas encontradas en la bibliografía, como se ha descrito anteriormente (Gibson, G.R., et al., Appl. Environ. Microbiol., 54(11): 2750-5, 1988; Lesmes, U. et al., J. Agric. Food Chem., 56: 5415-5421, 2008). Para comparar la eficacia de estos medios de cultivo (Medios 1), se sembraron dos recipientes con el mismo inóculo de un donante sano, pero se usaron estos medios para alimentar un recipiente (V1), mientras se usó la receta del medio por Walker et al., Appl. Environ. Microbiol. 71(7): 3692-700, 2005 para alimentar el otro recipiente (V6).

50 Los inóculos utilizados para sembrar cada recipiente fueron muy similares entre sí e inmediatamente después de la inoculación, los coeficientes de correlación de las muestras tomadas de cada recipiente fueron del 95,5 %. A lo largo del transcurso del experimento, los dos recipientes variaron entre sí en base a sus perfiles de DGGE, con valores de coeficiente de correlación que fluctuaron por encima y por debajo del umbral de similitud del 80 % entre los días 2 y

26 (Figura 6). Estos recipientes fueron solamente consistentemente similares entre sí entre los días 28 y 36, con un coeficiente de correlación promedio de  $88,9 \pm 3,1$  %.

Entre los días 28 y 36, ambos recipientes tuvieron dinámicas bajas similares a las que se determinaron usando la correlación de ventana móvil, con valores de  $\Delta t$  de  $4,4 \pm 2,1$  % para V1 y  $5,5 \pm 3,7$  % para V6 ( $p > 0,10$ ). El día 28, cuando V1 ya había alcanzado el estado estable, V1 y su inóculo compartían un coeficiente de correlación del 69,4 %, mientras que V6 y su inóculo compartían un coeficiente de correlación del 53,9 %. El día 36, cuando V6 alcanzó el estado estable, V1 y su inóculo compartían un coeficiente de correlación del 67,3 %, mientras que V6 y su inóculo compartían un coeficiente de correlación del 60,2 %.

La diversidad de las comunidades en ambos recipientes fue alta durante todo el experimento; sin embargo, se observó una caída inicial en la diversidad entre los días 0 y 10. Los valores del índice de Shannon-Weaver se redujeron de 3,54 a 2,84 para V1 y de 3,52 a 2,63 para V6 durante este período. Esta caída se estabilizó el día 14, dando valores promedio de  $3,02 \pm 0,06$  para V1 y  $2,92 \pm 0,10$  para V6 entre los días 14 y 36 ( $p < 0,05$ ). Los valores del índice de Shannon se volvieron similares entre los días 32 y 36, con valores promedio de  $2,96 \pm 0,01$  para V1 y  $3,04 \pm 0,07$  para V6 ( $p > 0,10$ ). Además, durante los primeros 10 días de esta realización, los valores de riqueza ponderada por rango disminuyeron en ambos recipientes. Estos valores cayeron de 625,2 a 365,5 para V1 y de 626,9 a 366,0 para V6. Esta caída se estabilizó el día 14, dando valores de riqueza ponderados por rango promedio de  $333,0 \pm 52,7$  para V1 y  $357,8 \pm 41,7$  para V6 entre los días 14 y 36 ( $p > 0,10$ ). También se observó una caída en la uniformidad de la comunidad entre los días 0 y 10 del experimento. Los valores de equidad de Shannon cayeron de 0,88 a 0,81 para V1 y de 0,88 a 0,75 para V6. Esta caída se estabilizó el día 14, dando valores promedio de  $0,85 \pm 0,01$  para V1 y  $0,83 \pm 0,02$  para V6 entre los días 14 y 36 ( $p < 0,05$ ) (Tabla 7).

**Tabla 7.** Comparación de comunidades en dos recipientes usando diferentes medios, Recipiente n.º 1 (V1, el medio de los inventores) y Recipiente n.º 6 (V6; medio de Walker et al., Appl. Environ. Microbiol. 71(7):3692-700, 2005).

Parámetro	V1	V6	Periodo de tiempo (Días x-y)	Resultado de la prueba t pareada
Dinámica (Dy)	$4,4 \pm 2,1$ %	$5,5 \pm 3,7$ %	28-36	$p > 0,10$
Índice de Shannon (H)	$3,02 \pm 0,06$	$2,92 \pm 0,10$	14-36	$p < 0,05$
Riqueza ponderada por rango (Rr)	$333,0 \pm 52,7$	$357,8 \pm 41,7$	14-36	$p > 0,10$
Equidad de Shannon (E <sub>H</sub> )	$0,85 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,02$	14-36	$p < 0,05$

**EJEMPLO 7. Comparación de dos tiempos de retención diferentes.**

Se gestionaron dos recipientes que modelaban el intestino distal en paralelo de una manera idéntica, excepto que el tiempo de retención para V1 se ajustó a 65 horas, mientras que el tiempo de retención para V2 se ajustó a 24 horas. En este experimento se ensayó si un mayor tiempo de retención permitiría a las bacterias de crecimiento más lento establecerse dentro del recipiente y, por lo tanto, de la comunidad, aumentando la diversidad de la comunidad.

Los inóculos utilizados para sembrar cada recipiente fueron muy similares entre sí e inmediatamente después de la inoculación, los coeficientes de correlación de las muestras tomadas de cada recipiente fueron del 96,7 %. Mientras que V1 y V2 estaban alcanzando un estado estable, variaban entre sí y para el día 14 el coeficiente de correlación entre V1 y V2 se redujo al 78,0 %.

La Figura 7 muestra cada recipiente en comparación con sus inóculos respectivos durante los días 0-10. Durante el período de 10 días que se mostró, V2 fue más similar a su inóculo que V1. V1 tuvo un coeficiente de correlación promedio de  $48,3 \pm 2,9$  % entre los días 4 y 10 mientras que V2 tuvo un coeficiente de correlación promedio de  $67,9 \pm 5,4$  % ( $p < 0,01$ ). Las comparaciones entre los inóculos y las muestras tomadas el día 10 mostraron que V2 mantenía una comunidad que era más similar a su inóculo, con un coeficiente de correlación del 75,7 % para V2 y solo del 50,5 % para V1.

Se observaron diferencias en la dinámica de la comunidad durante los primeros 16 días del experimento usando los dos tiempos de retención diferentes. Entre los días 10-16, V1 tenía un valor  $\Delta t$  de  $4,4 \pm 1,9$  % mientras que V2 tenía un  $\Delta t$  de  $9,9 \pm 6,5$  % ( $p > 0,10$ ). Si se hubiera permitido que el experimento se prolongara, se habría esperado ver una disminución en la dinámica de la comunidad a un valor más similar al de V1, como se analizó anteriormente.

Se observó una caída inicial en la diversidad de la comunidad entre los días 0 y 10 del experimento. Durante este período, los valores del índice de Shannon-Weaver cayeron de 3,44 a 3,06 para V1 y de 3,44 a 3,05 para V2. Estas caídas se estabilizaron el día 10 dando valores promedio de  $3,11 \pm 0,05$  para V1 y  $2,99 \pm 0,05$  para V2, entre los días 10 y 16 ( $p > 0,05$ ). También hubo una caída inicial en los valores de riqueza ponderada por rango para cada recipiente, con valores que cayeron de 636,5 a 614,5 para V1 y de 633,9 a 486,1 para V2 entre los días 0 y 10.

5 Durante el día 10, V1 y V2 comenzaron a tener valores de riqueza ponderada por rango promedio similares, con  $508,3 \pm 78,5$  para V1 y  $433,6 \pm 61,2$  para V2 entre los días 10 y 16 ( $p > 0,10$ ). Siguiendo el patrón observado en los otros experimentos, se observó un descenso en la uniformidad entre los días 0 y 10. Los valores de equidad de Shannon se redujeron de 0,86 a 0,77 para V1 y de 0,85 a 0,79 para V2. Esta caída se estabilizó el día 10, dando valores promedio de  $0,80 \pm 0,02$  para V1 y  $0,83 \pm 0,01$  para V2 entre los días 10 y 16 ( $p > 0,05$ ) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Comparación de comunidades en dos recipientes gestionadas con diferentes tiempos de retención, Recipiente n.º 1 (V1, tiempo de retención de 65 horas) y Recipiente n.º 2 (V2, tiempo de retención de 24 horas).

Parámetro	V1	V2	Periodo de tiempo (Días x-y)	Resultado de la prueba t pareada
Dinámica (Dy)	$4,4 \pm 1,9$ %	$9,7 \pm 5,3$	10-16	$p > 0,10$
Índice de Shannon (H)	$3,11 \pm 0,05$	$2,99 \pm 0,05$	10-16	$p > 0,05$
Riqueza ponderada por rango (Rr)	$508,3 \pm 78,5$	$433,6 \pm 61,2$	10-16	$p > 0,10$
Equidad de Shannon ( $E_H$ )	$0,80 \pm 0,02$	$0,83 \pm 0,01$	10-16	$p > 0,05$

10 **EJEMPLO 8. Efecto de la mucina en las comunidades intestinales.**

15 La mucina es una fuente de carbono importante para las comunidades microbianas del colon distal (Derrien, M. et al., Gut Microbes, 1(4):254-268, 2010). Para determinar si la adición de mucina a estos medios de cultivo permitirá desarrollar comunidades que son más diversas y más similares al material fecal de partida, se sembraron tres recipientes con el mismo inóculo de un donante sano. Un recipiente se alimentó usando el medio de cultivo sin mucina (V1), mientras que otros dos se alimentaron usando el medio de cultivo complementado con 4 g/l de mucina (V5 y V6).

20 Los inóculos utilizados para sembrar cada recipiente fueron muy similares entre sí e inmediatamente después de la inoculación, la similitud de las muestras tomadas de cada recipiente varió del 96,1 % al 98,1 % (Figura 8). El día 24, las comunidades en V5 y V6 compartieron una similitud del 92,4 %, las comunidades en V1 y V5 compartieron una similitud del 61,0 %, y las comunidades en V1 y V6 compartieron una similitud del 58,4 % (Figura 8).

25 Las comunidades de cada recipiente el día 24 también se compararon con las comunidades de cada recipiente en el día 0. Para V1, las comunidades el día 0 y el día 24 fueron similares al 56,5 %; para V5, las comunidades el día 0 y el día 24 fueron similares al 59,6 %; y para V6, las comunidades el día 0 y el día 24 fueron similares al 48,9 %.

30 La diversidad en cada recipiente cayó entre los días 0 y 24; sin embargo, hubo una mayor disminución en la diversidad en el recipiente sin mucina (V1) que en los recipientes con mucina (V5, V6), como se muestra en la Figura 8. El valor promedio del índice de Shannon-Weaver de los tres recipientes el día 0 fue de  $3,35 \pm 0,02$ . A los 24 días después de la inoculación, los valores del índice de Shannon-Weaver cayeron a 2,96 para V1, 3,08 para V5 y 3,13 para V6.

35 La riqueza en cada recipiente también disminuyó entre los días 0 y 24; sin embargo, hubo una disminución ligeramente mayor en la riqueza del recipiente sin mucina (V1) que en los recipientes con mucina (V5, V6), como se muestra en Figura 8. El valor promedio de riqueza ponderada por rango de los tres recipientes el día 0 fue de  $686,8 \pm 2,8$ . A los 24 días después de la inoculación, los valores de riqueza ponderada por rango se redujeron a 504,2 para V1, 526,8 para V5 y 526,2 para V6.

40 Finalmente, la uniformidad en cada recipiente cayó entre los días 0 y 24. Hubo una mayor disminución en la uniformidad en el recipiente sin mucina (V1) que en los recipientes con mucina (V5, V6), como se muestra en la Figura 8. El valor promedio del índice de equidad de Shannon de los tres recipientes el día 0 fue de  $0,84 \pm 0,01$ . A los 24 días después de la inoculación, los valores del índice de equidad de Shannon cayeron a 0,77 para V1, 0,80 para V5 y 0,81 para V6.

45 En resumen, se han desarrollado y caracterizado comunidades microbianas del colon distal humano que fueron estables, reproducibles y biológicamente significativas en un modelo de quimiostato de una sola fase del intestino. Se caracterizó completamente la diversidad, la estabilidad y la similitud de estas comunidades y también se caracterizaron las inoculaciones fecales a partir del material de partida para utilizarlas como punto de referencia al analizar las comunidades simuladas. Se mostró que las comunidades microbianas son fisiológicamente relevantes, teniendo las comunidades de estado estable puntos de partida reproducibles. Las comunidades *in vitro* imitan de cerca a las comunidades de la microbiota intestinal distal. También se compararon varios inóculos fecales del Donante 2 durante un período de 8 meses, y se encontró que la especie bacteriana predominante de este donante sano se mantuvo estable a lo largo del tiempo (no se muestra). Estos valores proporcionan un valor inicial con respecto al cual podemos comparar los valores de comunidad del quimiostato. Las comunidades de quimiostatos



microbianos mantuvieron valores similares de alta diversidad, riqueza y uniformidad.

5 Los resultados también muestran que se pueden desarrollar comunidades reproducibles en el modelo de quimiostato ya que este donante cumple con los criterios para donar (están sanos, sin antecedentes de antibióticos), ya que se puede recolectar una muestra de heces para su uso en futuros experimentos que compartirán perfiles similares a una muestra de materia fecal tomada en un momento anterior. Esto significa que se pueden establecer comunidades de estado estable similares que se puedan comparar entre las realizaciones de quimiostato utilizando comunidades microbianas complejas preparadas a partir de muestras de heces frescas.

10 La comparación de la comunidad fecal de cuatro donantes sanos diferentes mostró que cada donante tenía un perfil único (como se esperaba, Tannock G.W., Eur. J. Clin. Nutr., 56 Suppl 4:S44-9, 2002). Sin embargo, los cuatro perfiles mostraron valores de diversidad, riqueza y uniformidad similares. Esto sugiere que la microbiota fecal de diferentes individuos sanos comparte niveles similares de diversidad (según se evaluó por DGGE).

15 Se usó DGGE para evaluar si había una diferencia significativa entre los inóculos al 10 % y al 20 % utilizados para sembrar un recipiente de quimiostato en términos de estructura y diversidad de la comunidad. Basándose en el % de similitud, se encontraron diferencias similares dentro y entre los grupos para ambas concentraciones de inóculos. Ambas comunidades también tenían valores similares de diversidad, riqueza y uniformidad. Sin embargo, una diferencia obvia entre las dos concentraciones de inóculos es el espesor de los inóculos, ya que el inóculo al 20 % era mucho más grueso que el inóculo al 10 %. Esto hizo la inoculación con el inóculo al 20 % mucho más difícil. Esto, junto con el hecho de que los inóculos al 10 % y al 20 % fueron muy similares según lo evaluado por DGGE, lo que significó que se usó un inóculo al 10 % para todos los estudios futuros.

20 También se compararon las dos concentraciones de inóculos con el material fecal de partida para evaluar si el protocolo utilizado para preparar los inóculos podría haber alterado la estructura de la comunidad microbiana. Se encontró que tanto los inóculos al 10 % como al 20 % estaban compuestos de comunidades microbianas que eran representativas de las heces de partida. Este resultado muestra que el protocolo no hace que el inóculo varíe significativamente de las heces de las que se deriva, lo que lo convierte en un material de siembra relevante para simular la comunidad *in vivo* en el modelo de quimiostato. Las diferencias entre los inóculos fecales (el sobrenadante) y el sedimento formado después de la centrifugación de la suspensión fecal pueden deberse a bacterias adheridas a residuos de alimentos que no se separaron cuando se homogeneizaron. Dado que estas poblaciones probablemente representan nichos más especializados, no son representativas de las poblaciones lumbales generales de interés para estos estudios.

### 35 **EJEMPLO 9. Complemento del crecimiento microbiano utilizando Oro líquido.**

Se obtuvo Oro líquido por esterilización por filtración de una muestra de quimiostato sembrado de donante, como se ha descrito anteriormente. En resumen, la muestra se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró secuencialmente a través de filtros de jeringa de diferentes tamaños en el siguiente orden: 1,0 µm, 0,8 µm, 40 0,45 µm y finalmente 0,22 µm. Se requirió una filtración secuencial para permitir la eliminación de sedimentos, que obstruyen fácilmente los filtros. Se usó Oro líquido para complementar las placas de FAA hasta una concentración final del 3 %. Se han ensayado concentraciones del 1 %, 3 %, 5 % y del 10 %, y se ha encontrado que el 3 % es óptimo (no se muestra).

45 Se observó crecimiento usando placas de FAA complementadas con Oro líquido para *Faecalibacterium prausnitzii* y *Ruminococcus callidus* (ATCC27760). Para ambas de estas especies, no se observó crecimiento utilizando placas de FAA no complementadas. Las placas de FAA complementadas con Oro líquido produjeron ~30 colonias para *Ruminococcus callidus* y ~50 colonias para *F. prausnitzii* cuando se extrajeron de las reservas congeladas.

50 La cepa de *F. prausnitzii* utilizada aquí se aisló del Donante 5. Se usaron placas de Oro líquido complementadas con Oro líquido del Donante 5 para hacer cultivar la cepa a partir de reserva congelada. *R. callidus* se cultivó en placas complementadas con Oro líquido del Donante 5 y en placas complementadas con Oro líquido del Donante 6. Se observó crecimiento para ambos tipos de medios, pero las placas complementadas con Oro líquido con el Donante 5 produjeron más crecimiento (30 colonias frente a 5), lo que sugiere que existen diferencias relevantes para la mejora del crecimiento entre el Oro líquido de diferentes fuentes o donantes.

La Figura 14 muestra que el crecimiento de la cepa de *F. prausnitzii* aislada del Donante 5 se mejoró por la complementación de medio de cultivo con complemento de medio de Oro líquido del Donante 6. Las placas se inocularon con inóculos idénticos y se incubaron a 37 °C durante 3 días en condiciones anaerobias totales. Placa A: 60 Agar de anaerobios exigentes complementado con sangre de oveja desfibrinada al 5 % en solitario; Placa B: Agar de anaerobios exigentes complementado con sangre de oveja desfibrinada al 5 % y Oro líquido filtrado al 3 % (sin células) (del Donante 6). La Figura 14 muestra que el crecimiento se mejoró claramente mediante la adición de Oro líquido al medio a una concentración del 3 %.

65 Se alcanzó regularmente Oro líquido durante varios meses a 4 °C, sin una notable disminución de la eficacia, lo que indica que las cualidades de mejora del crecimiento del Oro líquido son estables.

En resumen, los ejemplos anteriores muestran que los métodos descritos en el presente documento proporcionan la preparación de comunidades estables y reproducibles, que pueden usarse, por ejemplo, para evaluar el efecto de un tratamiento sobre la composición y la estructura de la comunidad. Por ejemplo, un recipiente de "prueba" se puede operar en paralelo con un recipiente de "control". Gestionar dos recipientes idénticos en paralelo y garantizar que tengan comunidades idénticas de estado estable en el momento del tratamiento permite determinar que los cambios en la comunidad se deben al tratamiento, y no a los cambios de origen natural en la comunidad.

Como se ha descrito anteriormente, se controló la colonización de dos recipientes idénticos establecidos para imitar el colon distal durante 28 días después de la inoculación. Se usó DGGE para controlar la composición, la diversidad y la dinámica de dos recipientes de quimiostato idénticos (V1 y V2) sembrados con inóculo fecal idéntico de un donante sano. Se determinó que dos recipientes podrían gestionarse en paralelo y mantener comunidades idénticas.

Se usó la correlación de ventana móvil para crear perfiles de estabilidad representando el % de valores de similitud entre el día x y el día x-2 (Figuras 5, 7). Hubo un aumento en los valores de la tasa de cambio a medida que las comunidades pasaban de un entorno *in vivo* a uno *in vitro* (días 0-10). Durante este periodo hubo una caída inicial en la diversidad de la comunidad en ambos recipientes. Cuando se mira más de cerca a las comunidades analizando la riqueza y la uniformidad por separado, se observó que la caída en la diversidad estaba más influenciada por la caída en la riqueza que la caída en la uniformidad. Después del periodo de transición, las comunidades se estabilizaron y el índice de Shannon, la riqueza ponderada por rango y los valores de equidad de Shannon fueron idénticos y reflejaron una comunidad estable capaz de mantener una gran diversidad, riqueza y uniformidad.

Si bien los dos recipientes compartieron una composición de comunidad similar para el Día 10, no desarrollaron comunidades bacterianas idénticas que fueran similares tanto en términos de composición de especies como de abundancia hasta 26 días después de la inoculación. Ambas comunidades alcanzaron un estado estable ya que los valores de la tasa de cambio cayeron por debajo del 5 % el día 26 (se logró para ambos recipientes entre los días 24 y 28).

Tomados en conjunto, los resultados informados en el presente documento muestran que los recipientes de quimiostato de una sola fase se pueden sembrar con la misma comunidad fecal y producir comunidades estables, reproducibles y diversas que alcanzan un estado estable después de aproximadamente 26 días después de la inoculación. Además, el quimiostato de una sola fase fue capaz de desarrollar dos comunidades idénticas de estado estable que eran más similares entre sí que las comunidades desarrolladas en sistemas de quimiostato de múltiples fases (Van den Abbeele, P. et al., Appl. Environ. Microbiol., 76(15): 5237-46, 2010). En el modelo de quimiostato de una sola fase del intestino distal, se encontró que las comunidades desarrolladas en dos recipientes idénticos mostraron una correlación del 97,6 % el día 26. En este momento, el brillo de la banda en estos perfiles de DGGE era casi idéntico. En general, el modelo de quimiostato de una sola fase del intestino distal produjo comunidades más estables y reproducibles que las cultivadas previamente en quimiostatos de múltiples fases.

Se sabe que la composición de la microbiota intestinal varía dependiendo del segmento del intestino que se muestrea (Mai, V. y Morris, J.G. Jr., J. Nutr., 134(2):459-64, 2004; Marteau, P. et al., Appl. Environ. Microbiol., 67(10):4939-42, 2001). Se deben usar muestras de heces frescas para modelar las comunidades bacterianas del lumen intestinal distal ya que las bacterias fecales son más representativas de la microbiota luminal del intestino distal que de la microbiota de otros segmentos del intestino (Possemiers, S. et al., FEMS Microbiol. Ecol., 49(3):495-507, 2004). El modelado del intestino distal en un sistema de una sola fase refleja con mayor precisión el entorno *in vivo* para proporcionar resultados biológicamente más significativos.

Además, la diversidad microbiana y la composición de la comunidad dentro del intestino están influenciadas por varios factores físicos, bioquímicos y fisiológicos. Se debe asegurar que la comunidad simulada sea lo más similar posible a la comunidad *in vivo* si los resultados se van a extrapolar al huésped, por lo que es importante controlar e imitar estos factores lo más cerca posible al diseñar simuladores *in vitro*. Los controles de procesos controlados por ordenador de los modelos de quimiostato permiten que los parámetros experimentales, tales como el pH, la temperatura, la velocidad de alimentación y los niveles de oxígeno, sean controlados continuamente y ajustados automáticamente si ocurren desviaciones.

Como se ha descrito anteriormente, para determinar la eficacia de la receta de medio se configuraron dos recipientes de quimiostato: un recipiente alimentado con un medio preparado de acuerdo con la receta (V1), y otro recipiente alimentado con medio preparado de acuerdo con una receta publicada previamente (V6, Walker, et al., Appl. Environ. Microbiol., 71(7):3692-700, 2005). La comunidad en V1 fue más similar a su inóculo que la comunidad en V6, lo que significa que el recipiente alimentado con el medio de cultivo Medio 1 soportó una comunidad que era más representativa de la microbiota fecal que la comunidad soportada por el medio previamente publicado. Ambos recipientes compartieron dinámicas de la comunidad similares a lo largo del transcurso del experimento y valores de tasa de cambio similares entre los días 28 y 36. La diversidad y la uniformidad de la comunidad fueron mayores en V1 entre los días 14 y 36, sin embargo, ambos recipientes compartieron valores de riqueza ponderada por rango similares durante este periodo. Si bien ambos medios pueden soportar diversas comunidades que imitan a las del

intestino distal, la receta de medio soporta una comunidad que es más similar al inóculo. En base a estas observaciones, la receta de medio que se desarrolló proporciona un medio adecuado para cultivar una comunidad de quimiostato estable y diversa.

- 5 Como se ha descrito anteriormente, también se investigó si un mayor tiempo de retención permitiría que las bacterias de crecimiento más lento se establecieran dentro del recipiente durante el comienzo del experimento (y, por lo tanto, se establecieran dentro de la comunidad), aumentando la diversidad de la comunidad. Se hizo esto para asegurarse de que el tiempo de retención del sistema que se usó en ese momento (24 horas) no fuera lo suficientemente alto como para evitar que ciertas poblaciones de crecimiento lento sobrevivieran dentro del sistema.
- 10 Se establecieron dos recipientes de quimiostato con diferentes tiempos de retención (V1 y V2). V1 tenía un tiempo de retención más largo (65 horas), mientras que V2 tenía un tiempo de retención más corto, más relevante biológicamente (24 horas). El análisis de DGGE mostró que ambos recipientes desarrollaron diferentes comunidades a lo largo del tiempo (véase la Tabla 8). De estas dos comunidades, V2 con un tiempo de retención de 24 h desarrolló una comunidad que fue más similar a su inóculo que la comunidad desarrollada en V1. Ambos recipientes
- 15 tenían dinámicas de comunidad similares; sin embargo, la dinámica en V2 fue más variable. Ambos recipientes fueron similares entre sí en términos de diversidad, riqueza y uniformidad de la comunidad. En general, el aumento del tiempo de retención del valor biológicamente significativo de 24 horas a 65 horas dio como resultado una comunidad que era menos similar a su inóculo y no mantuvo un mayor nivel de diversidad.
- 20 También se comparó el proceso de colonización en tres recipientes de quimiostato: un recipiente alimentado con un medio sin mucina (V1), y dos recipientes idénticos alimentados con un medio complementado con mucina (V5 y V6). Si bien no se observaron diferencias entre los tres recipientes el día 0, el día 24, los recipientes complementados con mucina fueron similares entre sí, pero diferentes del recipiente que no se complementó con mucina. La adición de mucina al quimiostato dio como resultado un aumento en la diversidad, riqueza y uniformidad de la comunidad. La
- 25 adición de mucina también permitió el desarrollo de comunidades que eran más similares al inóculo que las comunidades sin mucina. Estos resultados muestran que podría ser ventajoso, en ciertas realizaciones, incluir mucina como parte de la receta del medio de cultivo.
- El análisis de muestras usando el índice de diversidad de Shannon, la riqueza ponderada por rango, y la equidad de Shannon en varios geles dio como resultado una variabilidad en los valores para las mismas muestras. Para corregir esto, se realizaron las mismas muestras al final de un gel y al comienzo del siguiente gel. Por ejemplo, si el primer gel contenía las muestras de los días 0 a 10, el siguiente gel contendría las muestras de los días 10- 20, y el siguiente gel contendría las muestras de los días 20-30, etc. Después, se añadieron o se restaron los valores calculados para los días superpuestos para corregir cualquier variación entre los geles. Si bien la variabilidad del
- 30 índice de diversidad de Shannon y los valores de equidad de Shannon fueron relativamente pequeños, se observó una mayor variación en los valores de riqueza ponderados por rango. Si bien la variabilidad entre geles es un inconveniente inherente del uso de DGGE, todavía proporciona estimaciones de la composición y estructura de la comunidad. También se pueden realizar análisis más detallados (como análisis metagenómicos).
- 35
- 40 En conclusión, se ha demostrado que el modelo de una sola fase del intestino distal humano soportó comunidades complejas que eran estables, reproducibles y diversas. También se presentan datos para respaldar los parámetros operativos optimizados, incluida la concentración de inóculo, la receta de medio, y el tiempo de retención del sistema.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un complemento de medio para cultivar bacterias anaerobias, en el que dicho método comprende las etapas de:

- 5 a) cultivar un ecosistema bacteriano diana en medio de cultivo en un quimiostato de fase única en condiciones de un tiempo de retención del sistema de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 horas, una temperatura de aproximadamente 37 °C, un pH de aproximadamente 6,9 a 7 y mantenimiento de las condiciones anaerobias en el quimiostato;
- 10 b) recoger el efluente del quimiostato; y
- c) filtrar el efluente a través de un filtro de 0,2 µm para eliminar las células bacterianas, a fin de producir el complemento de medio,

15 en el que el medio de cultivo comprende peptona al 0,4 % p/v; extracto de levadura al 0,4 % p/v; NaHCO<sub>3</sub> al 0,4 % p/v; pectina al 0,4 % p/v; xilano al 0,4 % p/v; Arabinogalactano al 0,4 % p/v; caseína al 0,6 % p/v; almidón de trigo no modificado al 1 % p/v; inulina al 0,2 % p/v; sales biliares al 0,1 % p/v; L-cisteína HCl al 0,1 % p/v; p/v CaCl<sub>2</sub> al 0,0002 %; NaCl al 0,0002 % p/v; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,0008 % p/v; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 0,0008 % p/v; MgSO<sub>4</sub> al 0,0002 % p/v; Hemina al 0,0001 % p/v; y menadiona al 0,00002 % p/v, y en el que el ecosistema bacteriano diana comprende:

20 (a) *Acidaminococcus intestinalis*, *Bacteroides ovatus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Blautia producta*, *Clostridium cocleatum*, *Collinsella aerofaciens*, *Dorea longicatena*, *Escherichia coli*, *Eubacterium desmolans*, *Eubacterium eligens*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium ventriosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospira pectinoshiza*, *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Parabacteroides distasonis*, *Raoultella sp.*, *Roseburia faecalis*, *Roseburia intestinalis*, *Ruminococcus torques*, *Ruminococcus obeum*, y *Streptococcus mitis*;

25 (b) *Acetobacterium sp.*, *Acidaminococcus intestinalis*, *Anaerostipes hadrus*, *Atopobium minutum*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides vulgatus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Blautia coccoides*, *Blautia producta*, *Clostridium aldenense*, *Clostridium citroniae*, *Clostridium cocleatum*, *Clostridium hathewayi*, *Clostridium lactatifermentans*, *Clostridium orbiscindens*, *Collinsella aerofaciens*, *Dorea longicatena*, *Escherichia coli*, *Eubacterium desmolans*, *Eubacterium eligens*, *Eubacterium fissicatena*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium sp.*, *Eubacterium ventriosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospira pectinoshiza*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Parabacteroides distasonis*, *Raoultella sp.*, *Roseburia faecalis*, *Roseburia hominis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus torques*, *Ruminococcus obeum*, y *Streptococcus mitis*;

30 (c) *Adlercreutzia equolifaciens*, *Akkermansia muciniphila*, *Alistipes finegoldii*, *Alistipes putredinis*, *Alistipes shahii*, *Alistipes sp.*, *Bacteroides capillosus*, *Bacteroides cellulosilyticus*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus simplex*, *Bifidobacterium longum*, *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia sp.*, *Blautia/Clostridium coccoides*, *Brevibacillus parabrevis*, *Catabacter hongkongensis*, *Catabacter sp.*, *Catenibacterium mitsuokai*, *Clostridium aldenense 1*, *Clostridium aldenense 2*, *Clostridium asparagiforme*, *Clostridium boltaee*, *Clostridium celerecrescens*, *Clostridium hathewayi 1*, *Clostridium hathewayi 2*, *Clostridium hathewayi 3*, *Clostridium hathewayi 4*, *Clostridium hylemonae 1*, *Clostridium hylemonae 2*, *Clostridium inocuum*, *Clostridium lavalense*, *Clostridium leptum*, *Clostridium orbiscindens*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium scindens*, *Clostridium staminisolvans*, *Clostridium sulfatireducens*, *Clostridium symbiosum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium sp. 1*, *Clostridium sp. 2*, *Clostridium sp. 3*, *Clostridium sp. 4*, *Clostridium sp. 5*, *Clostridium sp. 6*, *Collinsella aerofaciens*, *Coprococcus catus*, *Coprococcus comes*, *Coprococcus eutactus*, *Dorea formicigenerans*, *Dorea longicatena*, *Escherichia coli*, *Eubacterium bifforme*, *Eubacterium callanderi*, *Eubacterium dolichum*, *Eubacterium eligens*, *Eubacterium fissicatena*, *Eubacterium limosum*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium siraeum*, *Eubacterium ventriosum*, *Eubacterium xylanophilum 1*, *Eubacterium xylanophilum 2*, *Eubacterium sp.*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Gemmiger/ Subdoligranulum formicilis/variable 1*, *Gemmiger/ Subdoligranulum formicilis/variable 2*, *Holdemania filiformis*, *Microbacterium schleiferi*, *Micrococcus luteus*, *Odoribacter splanchnicus*, *Oscillibacter valericigenes*, *Oscillibacter sp.*, *Parabacteroides gordonii*, *Parabacteroides merdae*, *Parasutterella excrementihominis*, *Phascolarctobacterium sp.*, *Roseburia/faecalis 1*, *Roseburia faecalis 2*, *Roseburia hominis*, *Roseburia intestinalis*, *Roseburia sp.*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus bromii 1*, *Ruminococcus bromii 2*, *Ruminococcus lactaris*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus obeum*, *Ruminococcus torques 1*, *Ruminococcus torques 2*, *Ruminococcus torques 3*, *Ruminococcus torques 4*, *Ruminococcus torques 5*, *Ruminococcus sp. 1*, *Ruminococcus sp. 2*, *Ruminococcus sp. 3*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus thermophilus*, *Synergistes sp.*, y *Turcibacter sanguinis*; o

35 (d) una comunidad de cepas bacterianas que representa un enterotipo de intestino humano, en donde el enterotipo es el enterotipo *Bacteroides*, *Prevotella* o *Ruminococcus*.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

65 (i) una etapa para centrifugar el efluente a 14.000 rpm durante 10 minutos y recoger el sobrenadante antes de la etapa c), y en el que el sobrenadante del efluente se filtra a continuación en la etapa c); y/o

(ii) filtrar el efluente o el sobrenadante del efluente secuencialmente a través de un filtro de 1,0 µm, un filtro de 0,8 µm, y un filtro de 0,45 µm, antes de la filtración a través del filtro de 0,2 µm.

- 5 3. El método de la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo comprenden mucina.
4. El método de la reivindicación 3, en el que la mucina está presente en el medio de cultivo a una concentración de 4 g/l.
- 10 5. El método de la reivindicación 3, en el que la mucina está presente en el medio de cultivo a una concentración de aproximadamente el 1-10 %.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el quimostato tiene un tiempo de retención del sistema de 24 horas.
- 15 7. Un método para aislar bacterias anaerobias del intestino humano, que comprende:
- a) cultivar un ecosistema bacteriano diana como se define en la reivindicación 1 en un medio de cultivo como se define en la reivindicación 1 en las condiciones definidas en la reivindicación 1;
- 20 b) diluir el cultivo y colocarlo en placas sobre agar de anaerobios exigentes (FAA) complementado con el complemento de medio obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
- c) incubar las placas en una cámara anaerobia; y
- d) purificar colonias bacterianas anaerobias individuales cultivadas en la etapa (c).
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en el que el complemento de medio obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 se complementa con sangre de oveja desfibrinada.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la sangre de oveja desfibrinada está a una concentración final del 5 %.
- 30 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende además cultivar las colonias bacterianas anaerobias individuales purificadas de la etapa (d) en cultivo líquido en las condiciones definidas en la reivindicación 1.
- 35 11. El método de la reivindicación 10, en el que el complemento de medio se obtiene por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se usa para complementar el medio de cultivo de aproximadamente el 1 % v/v a aproximadamente el 10 % v/v, preferiblemente a aproximadamente el 3 % v/v de tal forma que se obtienen aislados de bacterias anaerobias.
- 40 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en el que:
- (i) la cámara anaerobia contiene una atmósfera de N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> o H<sub>2</sub>, o una mezcla de los mismos; y/o
- (ii) el ecosistema bacteriano diana cultivado en la etapa (a) es una muestra fecal humana, preferiblemente en el que la muestra fecal humana que se cultiva es un sobrenadante de suspensión fecal al 10 % p/v o un sobrenadante de suspensión fecal al 20 % p/v; y/o
- 45 (iv) la bacteria anaerobia obtenida es *Faecalibacterium prausnitzii* o *Ruminococcus callidus* (ATCC27760).

FIGURA 1

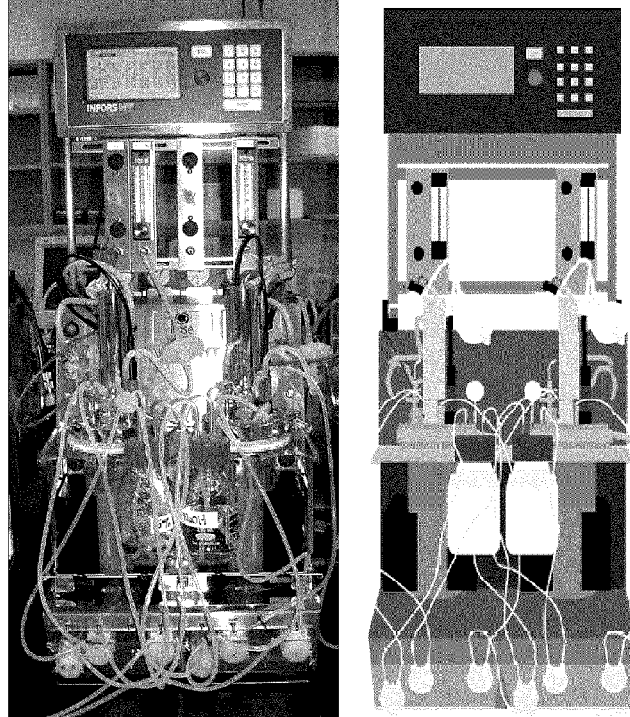


FIGURA 2

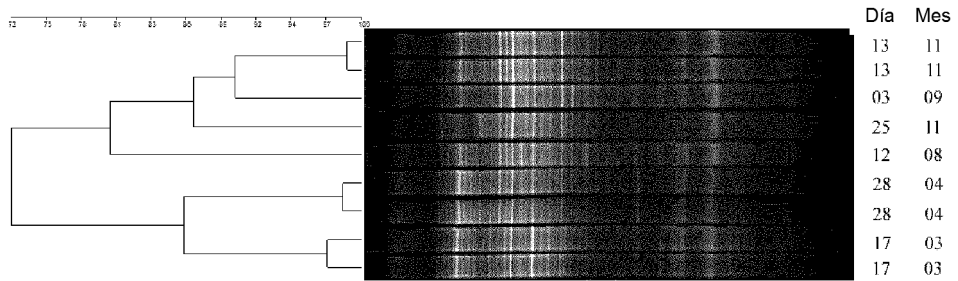


FIGURA 3

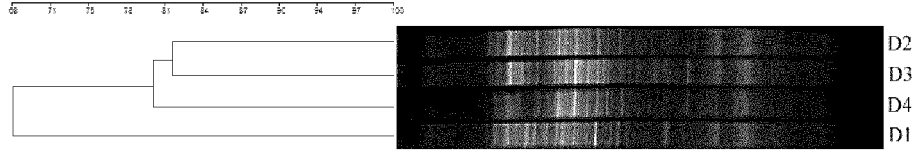




FIGURA 4

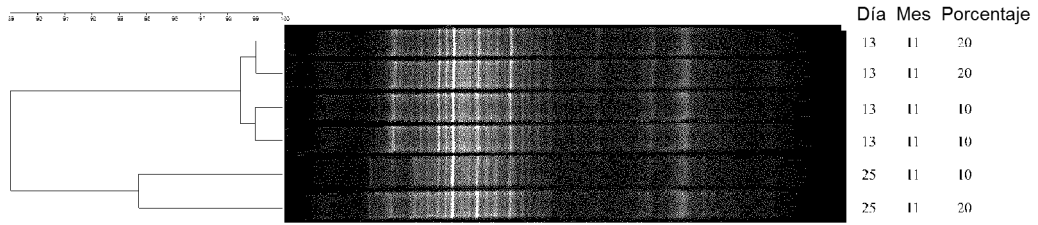
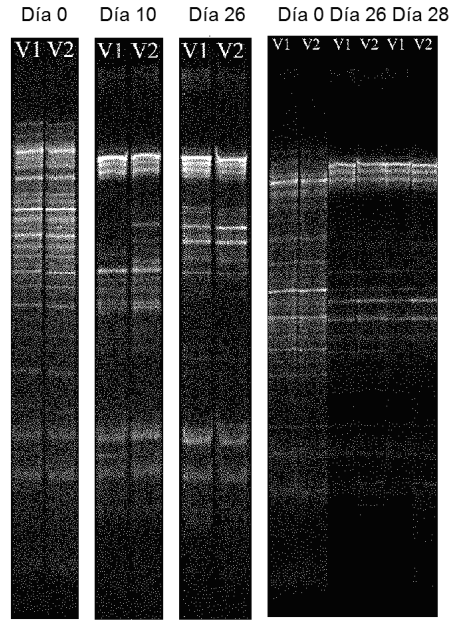


FIGURA 5

A



B

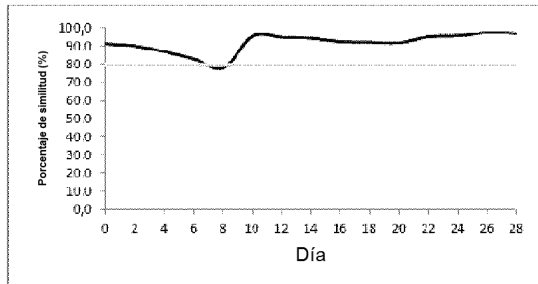
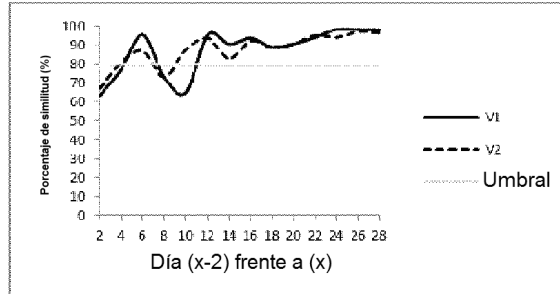
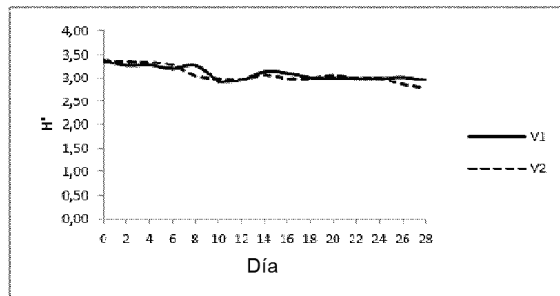


FIGURA 5 continuación

C



D



E

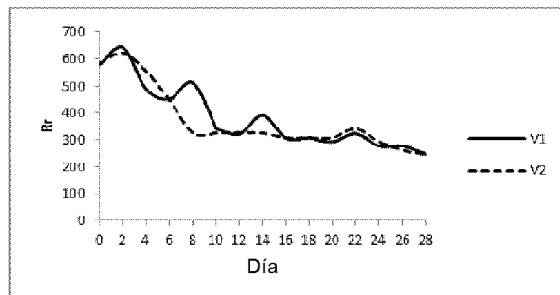


FIGURA 5 continuación

F

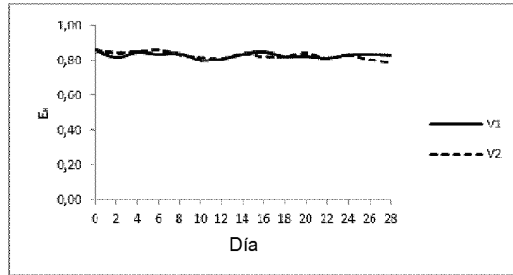
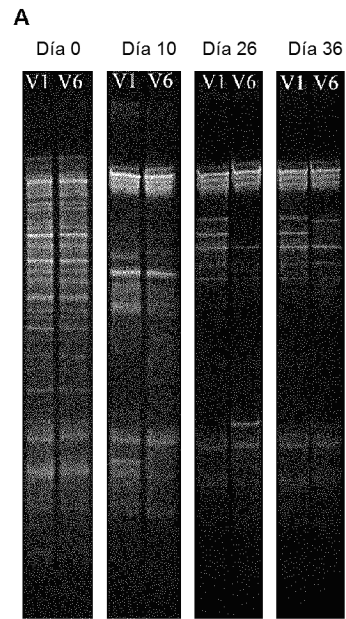


FIGURA 6



**B**

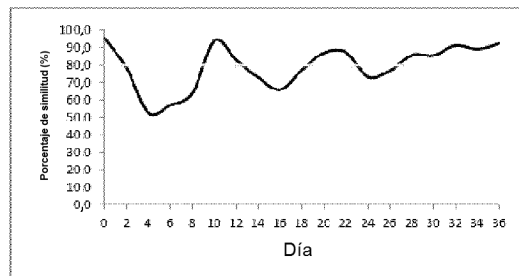
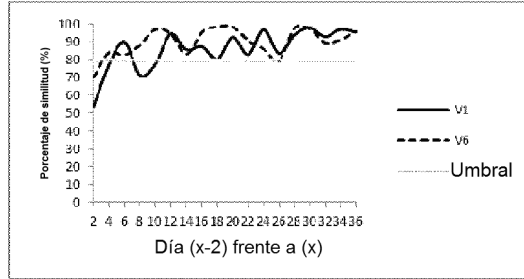
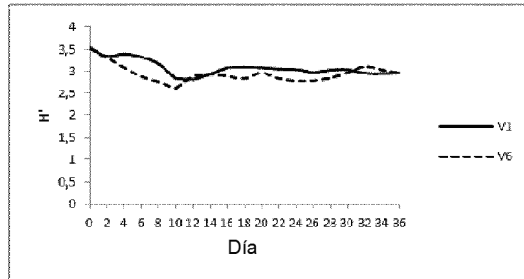


FIGURA 6 continuación

C



D



E

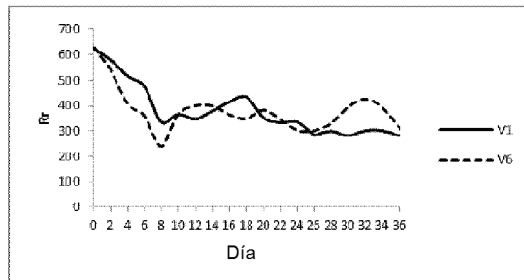


FIGURA 6 continuación

F

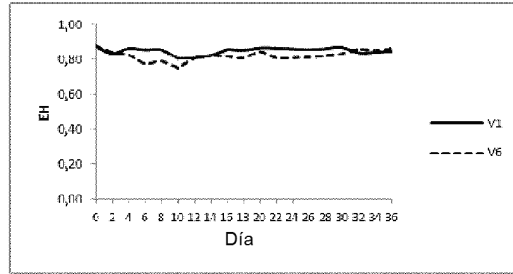
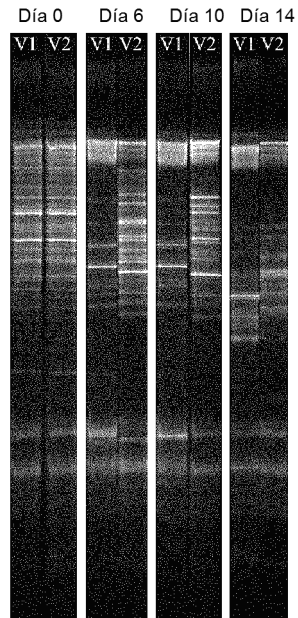


FIGURA 7

A



B

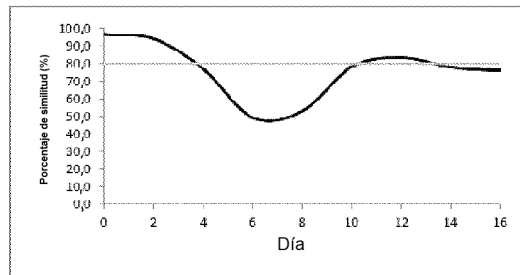
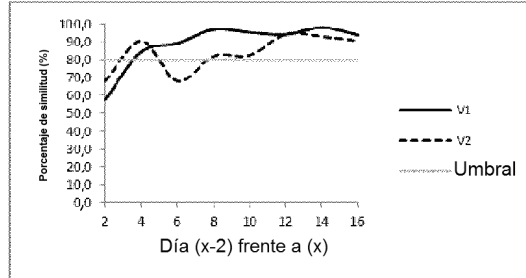


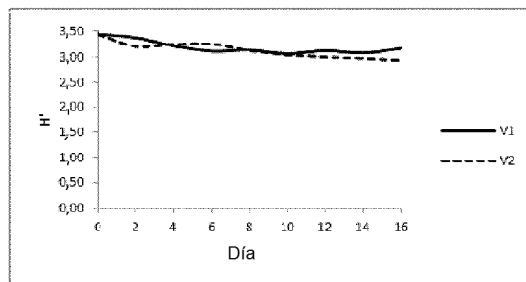


FIGURA 7 continuación

C



D



E

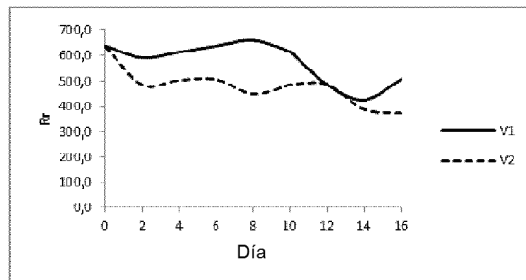


FIGURA 7 continuación

F

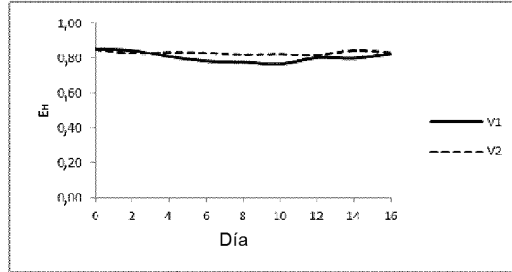
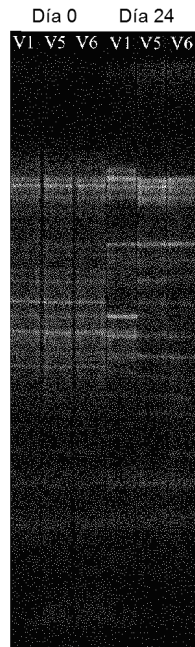


FIGURA 8

A



B

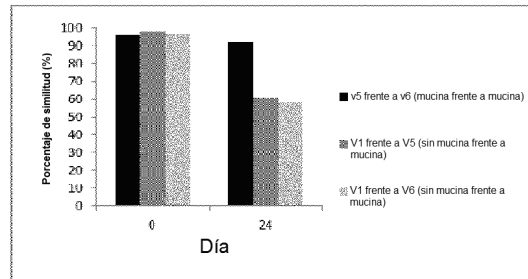
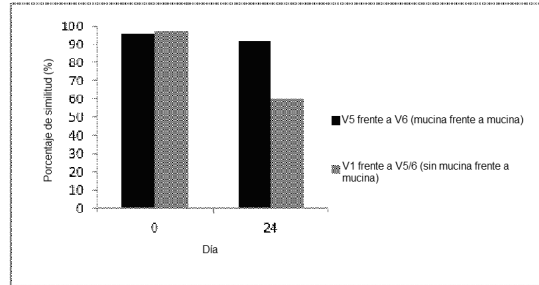
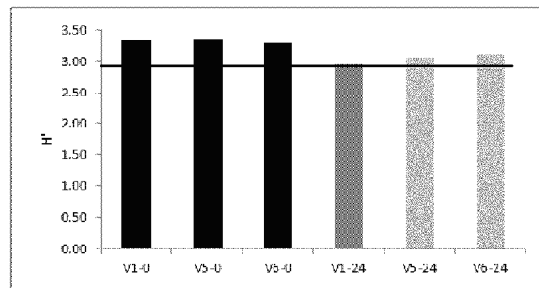


FIGURA 8 continuación

C



D



E

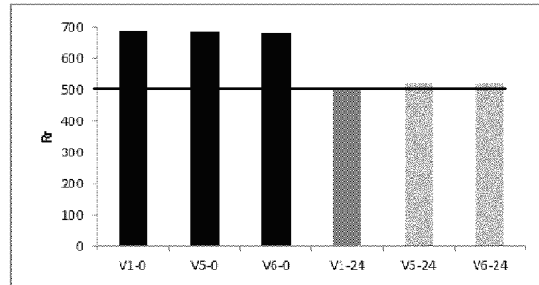


FIGURA 8 continuación

F

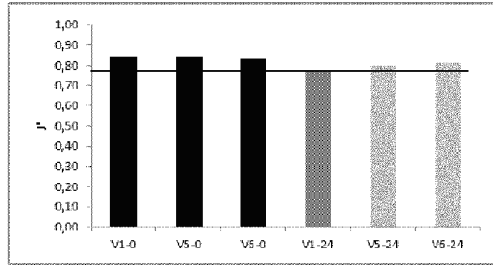


FIGURA 9

Medidas de la comunidad ecológica

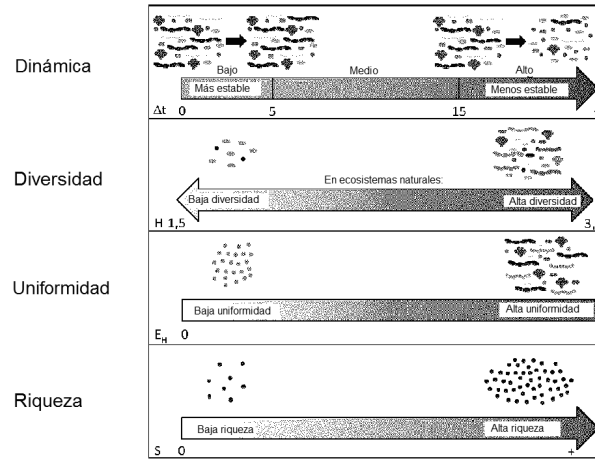


FIGURA 10

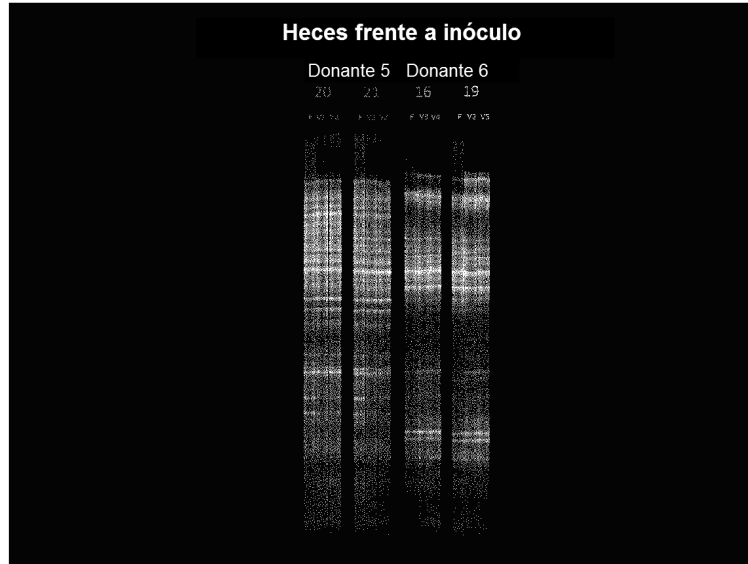


FIGURA 11





FIGURA 12

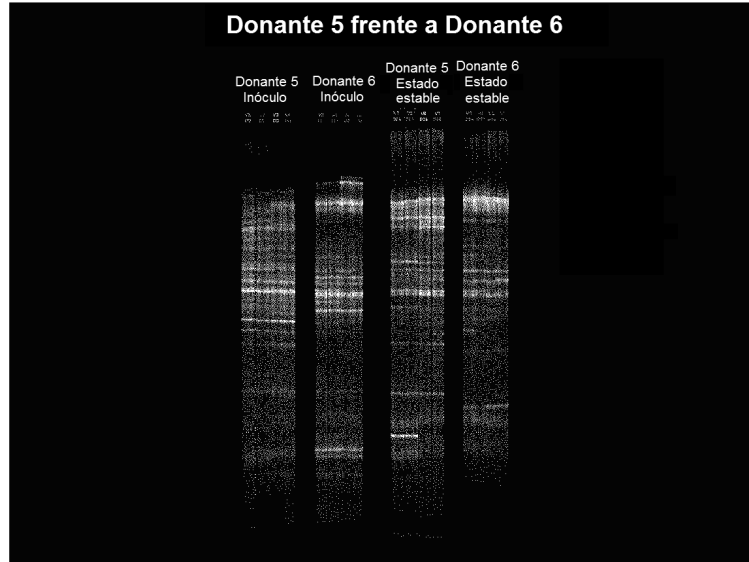
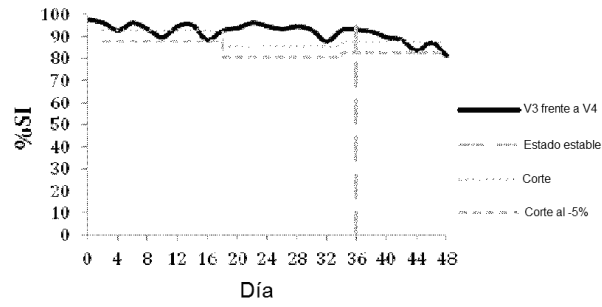
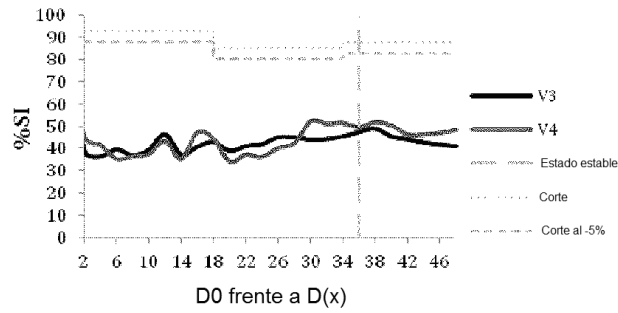


FIGURA 13

A



B



C

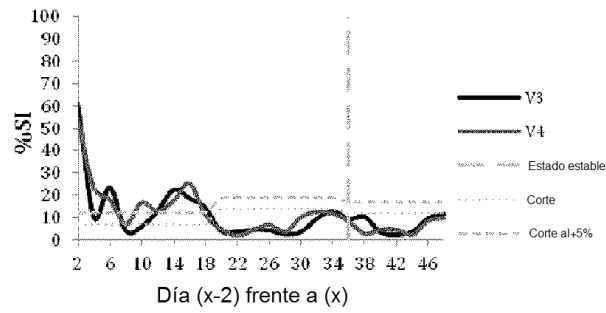


FIGURA 13 continuación

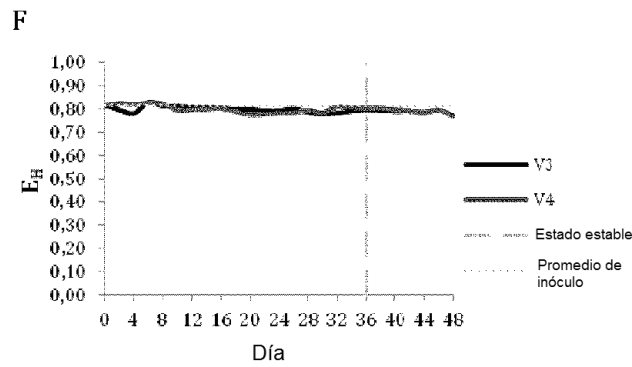
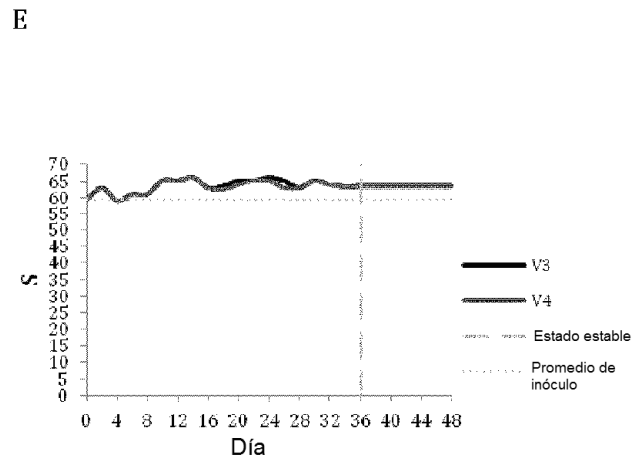
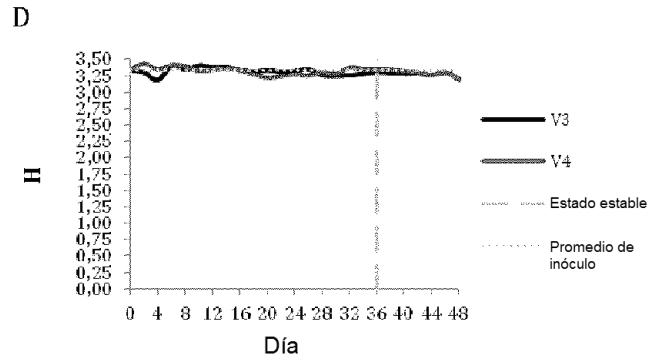


FIGURA 14

