



Revista Chilena de Nutrición

ISSN: 0716-1549

sochinut@tie.cl

Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y
Toxicología
Chile

Gotteland R., Martin; Garrido C., Daniel; Cruchet M., Sylvia
REGULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN VOLUNTARIOS SANOS MEDIANTE EL
CONSUMO DE UN PRODUCTO CON EL PROBIÓTICO Lactobacillus johnsonii La1
Revista Chilena de Nutrición, vol. 33, núm. 2, agosto, 2006
Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología
Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46914632009>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

ARTÍCULOS ORIGINALES

REGULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN VOLUNTARIOS SANOS MEDIANTE EL CONSUMO DE UN PRODUCTO CON EL PROBIÓTICO *Lactobacillus johnsonii La1*

REGULATION OF THE INTESTINAL MICROBIOTA OF HEALTHY VOLUNTEERS THROUGH THE INTAKE OF THE PROBIOTIC *Lactobacillus johnsonii La1*

Martin Gotteland R., Daniel Garrido C., Sylvia Cruchet M.

Laboratorio de Microbiología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile.

ABSTRACT

*A basic mechanism implicated in the human health-promoting properties of probiotics is their ability to maintain the homeostasis of the intestinal microbiota. This study evaluates how the ingestion of different amounts of the probiotic *Lactobacillus johnsonii La1* (*La1*) influences the main bacterial populations of the fecal microbiota. Eight asymptomatic volunteers participated in the study. After a basal period, they ingested 100 mL of a product containing 10⁸ *La1*/mL during the first week, 200 mL during the second week and 500 ml during the third week. Fecal samples were obtained at the end of each period and during the 2 weeks post-ingestion. *Lactobacilli* were determined by culture on MRS agar and *La1* colonies were confirmed by ERIC-PCR. The main populations of fecal bacteria were identified by fluorescent probes and flow cytometry. At baseline, 18.3% of the total fluorescent bacteria were *F. prauunitzii*, 13.2% *Bacteroides*, 2.05% *Bifidobacterium* and 0.95% *Lactobacillus*. Fecal excretion of *La1* increased during the ingestion period but it was cleared from the stools of the volunteers 2 weeks later. *La1* intake increased the populations of *Lactobacillus* ($p=0.056$) and *Bifidobacterium* ($p=0.067$), which are considered as beneficial for the host, while it decreased those of *F. prausnitzii* ($p=0.005$) a potentially pathogenic microorganism. These bacterial populations returned to their baseline levels during the post-ingestion period. The regular intake of a *La1*-containing product beneficially affects the homeostasis of the human fecal microbiota probably contributing to the health-promoting effects of this probiotic.*

Key Words: Probiotic, intestinal microbiota, functional foods.

RESUMEN

Uno de los principales mecanismos implicados en las propiedades saludables de los probióticos es su capacidad de mantener la homeostasis de la microbiota intestinal. Este

estudio evalúa cómo el consumo de distintas cantidades del probiótico *Lactobacillus johnsonii* La1 (La1) contribuye en la modulación de las principales poblaciones de la microbiota fecal. Ocho voluntarios asintomáticos participaron en el estudio. Después de un periodo basal, consumieron 100 mL de un producto que contenía 10^8 La1/mL durante la primera semana, 200 mL durante la segunda semana y 500 mL durante la tercera semana. Se obtuvieron muestras de deposición al final de cada uno de estos períodos y luego a los 7 y 14 días de haber terminado el consumo del producto. Las cantidades de lactobacilos excretados fueron determinadas por cultivo en agar MRS y las colonias de La1 fueron confirmadas por ERIC-PCR. Algunas de las principales poblaciones de bacterias fecales fueron evaluadas por hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH) y citometría de flujo. A nivel basal, 18.3% del número total de bacterias fluorescentes detectadas eran *F. prauunitzii*, 13.2% *Bacteroides*, 2.05% *Bifidobacterium* y 0.95% *Lactobacillus*. La excreción fecal de La1 aumentó durante el período de consumo pero desapareció después de 14 días de haber terminado el período de ingestión. El consumo de La1 aumentó las poblaciones de *Lactobacillus* ($p=0.056$) y *Bifidobacterium* ($p=0.067$) que son consideradas como beneficiosas para el huésped mientras que disminuyó aquella de *F. prausnitzii* ($p=0.005$), un microorganismo potencialmente patogénico. Las poblaciones bacterianas afectadas volvieron a sus niveles basales durante el período post-ingestión. Estos resultados indican que el consumo regular de La1 modula la homeostasis de la microbiota intestinal, lo cual contribuye probablemente a los efectos beneficiosos de este probiótico sobre la salud.

Palabras claves: Probióticos, microbiota intestinal, alimentos funcionales.

El auspiciador no tuvo un rol en el diseño del estudio, recolección de la información, análisis de los resultados, interpretación de la información o escritura del artículo. El autor del artículo tuvo acceso completo a toda la información del estudio y la responsabilidad final del envío a publicación del artículo.

INTRODUCCIÓN

La ingestión de probióticos se asocia con un amplio rango de beneficios para la salud del consumidor (1). Uno de los mecanismos que explica dichos beneficios es la regulación del equilibrio existente entre bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y aquellas potencialmente dañinas. Tales alteraciones de la microbiota han sido descritas en individuos tratados con fármacos como antibióticos o antiinflamatorios, y también en pacientes con enfermedad inflamatoria crónica del tubo digestivo, alergias y patologías auto-inmunes (2,3). Los probióticos han sido recientemente propuestos como una herramienta para el manejo dietario de dichas alteraciones (2-4). Sin embargo, aunque la regulación de la microbiota intestinal constituye teóricamente un aspecto básico del concepto de probiótico, pocos estudios han evaluado esta propiedad en humanos. Una de las cepas probióticas más ampliamente descrita y utilizada en la elaboración de productos probióticos es el *Lactobacillus johnsonii* La1 (La1). El genoma de esta bacteria ha sido recientemente descrito e indica que este probiótico está bien adaptado para sobrevivir y competir en el intestino delgado humano (5). Varios estudios muestran que La1 estimula la respuesta immune local y sistémica en humanos (6, 7), y que adhiere a líneas celulares intestinales in vitro mediante el ácido lipoteicoico (8). La1 también es capaz de liberar actividades antibacterianas contra varios patógenos gastrointestinales (9-11); por ejemplo, hemos mostrado recientemente que la ingestión regular de un producto que contiene La1 puede interferir con la colonización de *H. pylori* en niños (12), y que una mayor ingestión diaria de este producto resulta en un efecto más significativo contra este patógeno (13). En el caso particular de La1, no hay reportes de

cómo este probiótico afecta la microbiota intestinal en humanos ni tampoco con qué dosis se puede lograr este efecto regulador.

En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar en voluntarios sanos cómo el consumo de un producto con La1 afecta las principales poblaciones bacterianas de la microbiota intestinal.

SUJETOS Y MÉTODO

Sujetos, diseño y producto

Se reclutaron ocho voluntarios asintomáticos, 4 hombres y 4 mujeres (27.3 ± 7.6 años; rango [19-40 años]), sin antecedentes de patologías gastrointestinales, historial de tratamiento antibiótico, antiácido, laxantes o prokinéticos en los tres meses previos al inicio del estudio. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del INTA, y cada voluntario firmó una carta de consentimiento informado. Los voluntarios mantuvieron su dieta normal, pero se les pidió evitar el consumo de otros productos lácteos fermentados y probióticos durante toda la duración del estudio. Después de un periodo basal de cinco días, los voluntarios ingirieron diariamente una botella (100 ml) del producto con La1 durante la primera semana, dos botellas (200 ml) durante la segunda semana, y finalmente cinco botellas (500 mL) durante la tercera semana. Cada botella contenía 14.7 g de carbohidratos (93% sacarosa, 7% lactosa), 0.9 g de proteínas y 0.03 g de lípidos, aportando 63 Kcal. (Chamyto, Nestlé-Chile SA, Santiago, Chile); los recuentos realizados en el laboratorio mostraron que La1 estaba presente en el producto a concentración de 1×10^8 UFU/ml. Se registró durante el estudio la eventual aparición de sintomatología gastrointestinal derivada de la ingestión del producto. Muestras frescas de deposición fueron obtenidas a nivel basal antes de consumir el producto (día 0), al final de cada periodo de consumo (días 7, 14, y 21) y en los días 28 y 35 del periodo post-ingestión.

Análisis de lactobacilos y de La1 por cultivo

Cada muestra de deposición fue recolectada en frascos estériles y en condiciones de anaerobiosis a 4°C. Alrededor de un gramo de deposición se homogenizó en PBS estéril y luego se centrifugó a 300 g de manera de eliminar las partículas de mayor tamaño. Una aliquota del sobrenadante se diluyó en forma seriada, se sembró en agar MRS y se incubó por 48 horas a 37° en anaerobiosis para cuantificar los lactobacilli totales. Se detectó La1 mediante el aspecto morfológico de sus colonias; luego su identidad fue confirmada mediante ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences-PCR) (14).

Análisis de la microbiota por FISH y citometría de flujo

El estudio de la microbiota se realizó mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH) utilizando la sonda universal (Eub338) para detectar las bacterias totales y sondas específicas para detectar las poblaciones de *Bacteroides* (Bac303), *Lactobacillus/Enterococcus* (Lab158), *Fusobacterium* (Fprau645) y *Bifidobacterium* (Bif164) (15-19). Con este objetivo una aliquota de deposición previamente homogeneizada y fijada en formalina fue tratada con lisozima y luego incubada con las distintas sondas por 16 horas a 35° C. La detección de las bacterias hibridadas se realizó por citometría de flujo (FacsCalibur, Becton Dickinson). En cada muestra se contaron 100.000 eventos fluorescentes, los cuales fueron posteriormente analizados con el software WinMDI 2.8. Los resultados obtenidos para cada población

bacteriana se expresaron como porcentaje del total de bacteria detectado con la sonda EUB338.

Análisis estadísticos

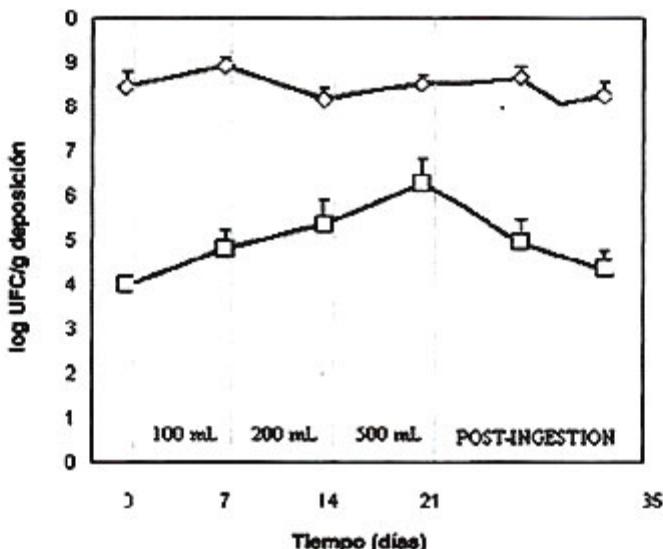
Las concentraciones de *Lactobacillus* totales y de La1 se expresaron como log (UFC o células) por gramo de deposición (promedio \pm SEM) y los resultados de FISH-citometría de flujo como porcentaje del total de eventos marcados con la sonda universal Eub338 (promedio \pm SEM). Los cambios cuantitativos observados en la población de *Lactobacillus* y de La1 a través del tiempo fueron analizados mediante análisis no paramétrico de varianzas de Friedman para muestras repetidas; en caso de significancia estadística, las diferencias fueron analizadas mediante el test de Wilcoxon. Para analizar los cambios de los porcentajes de las poblaciones bacterianas en el tiempo, se realizó primero una transformación angular de los valores obtenidos y luego se les aplicó el análisis de varianzas de Friedman para muestras repetidas.

RESULTADOS

Todos los voluntarios completaron el estudio y mostraron buena tolerancia al producto, reportando solamente un leve incremento en los ruidos intestinales durante la ingestión de cinco unidades del producto diarias.

Los niveles de *Lactobacillus* totales determinados por cultivo fueron de 8.44 ± 0.33 log UFC/g de deposición durante el periodo basal (figura 1). Se observaron cambios leves en la excreción de lactobacilli a lo largo del estudio, que afectaron principalmente los niveles post-ingestión (Figura 1, Friedman ANOVA: $X^2=18.4$; $p=0.049$). La cuantificación de lactobacilli total por FISH y citometría de flujo indica niveles básales (8.0 log células/g) similares a los observados anteriormente mediante cultivo; sin embargo no se observaron cambios entre los períodos de ingestión y post-ingestión con este método (Friedman ANOVA: $X^2=4.50$; $p=0.72$).

FIGURA 1

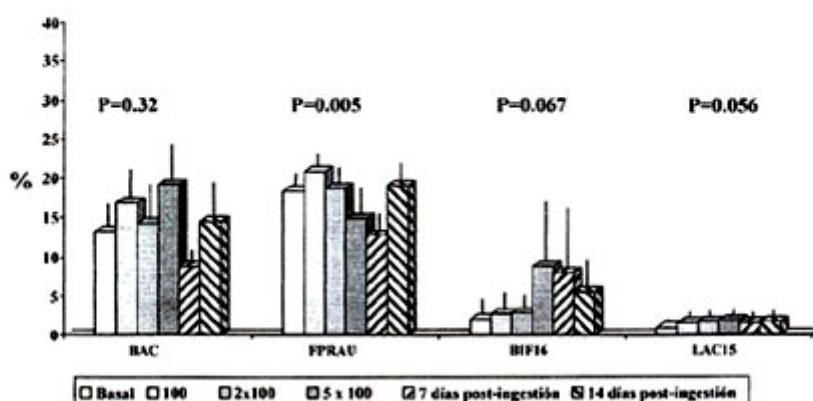
Excreción fecal de lactobacilli total (◊) y de La1 (□) en ocho voluntarios sanos durante los períodos basal, ingestión y post-ingestión

Como está indicado en la figura 1, no se detectó excreción fecal de La1 a nivel basal (< al límite de detección del método) y la ingestión de La1 resultó en la excreción de La1 en las deposiciones de todos los voluntarios. Las concentraciones fecales de La1 aumentaron regularmente con las cantidades del producto ingerido (Friedman ANOVA: $X^2=25.76$; $p<0.0025$), resultando en una concentración de 6.3 ± 0.53 log UFC La1/g al final del período de ingestión de 500 mL de producto. Finalizada la ingestión del producto, las concentraciones fecales de La1 disminuyeron regularmente hacia su completa desaparición. La1 fue encontrado en 7 de los 8 voluntarios siete días después de terminada la ingestión del producto y en solo un voluntario después de 14 días de haber terminado la ingestión del producto.

La figura 2 muestra las distintas poblaciones bacterianas fecales analizadas en el estudio. Se puede observar que las poblaciones de *F. prausnitzii* y de *Bacteroides/Prevotella* representaron respectivamente el 18.3% y 13.2% del total de bacterias detectadas por Eub338 y las de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* sólo el 2.04% y 0.89% de este total. Por lo tanto las 4 poblaciones bacterianas evaluadas en el estudio representaron alrededor del 35% del total de bacterias detectadas con Eub338.

FIGURA 2

Cambios en los porcentajes de las poblaciones fecales de *Bacteroides/Prevotella* (Bac303), *F. prausnitzii* (Fprau645), *Bifidobacterium* (Bif164) y *Lactobacillus/Enterococcus* (Lab158) determinado por FISH y citometría de flujo durante los períodos basal, de ingestión y post-ingestión (promedio ± SEM)



La figura 2 muestra como el consumo de La1 afecta a estas poblaciones bacterianas: el porcentaje de *F. prausnitzii* disminuye significativamente al final del período de ingestión y al principio del período post-ingestión, comparado con el nivel basal (Friedman ANOVA: $X^2=20.1$, $p=0.005$) mientras que los niveles de *Bifidobacterium* y de *Lactobacillus/Enterococcus* aumentaron (Friedman ANOVA: $X^2=13.2$, $p=0.067$ y $X^2=13.7$, $p=0.056$, respectivamente) y aquellos de bacteroides no fueron afectados por La1 (Friedman ANOVA: $X^2=7.08$, $p=0.42$).

DISCUSIÓN

A pesar de que La1 es un probiótico cuyos efectos sobre la salud están bien descritos, se sabe poco de su capacidad de regular otras poblaciones bacterianas de la microbiota. Nuestros resultados muestran que la ingestión de La1 aumenta las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* mientras que disminuye aquella de *F. prausnitzii*. Tal efecto se debe probablemente a la capacidad de La1 de sobrevivir durante su tránsito a lo largo del tracto gastrointestinal, como se ve reflejado por la excreción de La1 vivo en las deposiciones de los sujetos. Sin embargo, la presencia de La1 en el intestino es transitoria y una vez terminada la ingestión del producto, La1 se elimina rápidamente del intestino. Estos resultados confirman aquellos obtenidos con otros probióticos y que indican que, a pesar de su origen humano, los probióticos actúan como microorganismos alóctonos que solo transitan por el tracto gastrointestinal del huésped sin colonizarlo permanentemente, debido probablemente al efecto de barrera ejercido por la microbiota intestinal autóctona (20). Es interesante notar que paralelamente a la eliminación de La1, las poblaciones afectadas por su consumo generalmente tienden a volver a sus niveles basales. Esto sugiere que es necesaria una ingestión regular del probiótico para asegurar su capacidad de interactuar con la microbiota intestinal.

Comparado con otros estudios en humanos (20), detectamos altas concentraciones de lactobacilli en nuestros voluntarios ($>10^8/g$ de deposición) tanto por cultivo como por FISH y citometría de flujo. Es posible que esta importante población autóctona de lactobacilli compita

con el aporte exógeno de La1, lo cual explicaría porqué los niveles de La1 no fueron mayores a $10^7/g$ de deposición, considerando un consumo durante el último período de ingestión de 5×10^{10} UFC La1 diario.

El incremento en las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* puede ser favorecido por el descenso en la población de *Fusobacterium*, y tal vez de otras poblaciones no detectadas con las sondas utilizadas en este estudio. El incremento de las bifidobacterias durante los períodos de ingestión y post-ingestión es interesante y confirma recientes observaciones de nuestro grupo en niños que recibían una fórmula láctea suplementada con La1 por siete semanas (21). En estos niños, la ingestión de La1 incrementa los niveles de *Bifidobacterium* de un 5% a nivel basal a alrededor de un 20% al final del periodo de suplementación. En relación con el efecto de la ingestión de La1 sobre las poblaciones de bifidobacteria, es interesante señalar que este microorganismo posee las vías metabólicas necesarias para sintetizar y liberar fructanos en el lumen intestinal (5). Estas moléculas son reconocidas por actuar como prebióticos (21, 22), estimulando selectivamente el crecimiento de poblaciones autóctonas de *Bifidobacterium* en el colon, tal como observamos en nuestro estudio. Es probable que esta propiedad «prebiótica» no sea general a todas las especies de *Lactobacillus*, ya que por ejemplo, la ingestión regular de *L. rhamnosus* DR20, no se asocia con cambios en las poblaciones fecales de bifidobacteria en humanos (20). Observamos también que la ingestión de La1 resulta en una menor frecuencia de detección de *Fusobacterium*. Este fenómeno puede ser interesante para la salud del huésped ya que se ha mostrado que especies del género *Fusobacterium* aisladas de pacientes con colitis ulcerosa son capaces de inducir colitis en ratas, señalando a estos microorganismos como posibles agentes etiológicos en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas del intestino (23).

En conclusión, nuestros resultados muestran que la ingestión de un producto comercial suplementado con La1 modula la microbiota fecal en voluntarios humanos sanos, aumentando los niveles de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y disminuyendo los niveles de *Fusobacterium*, una especie potencialmente patogénica. También confirman que La1 no coloniza permanentemente el tracto gastrointestinal por lo cual una ingestión regular del probiótico es necesaria para conseguir sus efectos funcionales. Estas observaciones sugieren que la regulación de la microbiota intestinal podría ser un factor importante para explicar los efectos beneficiosos de La1 sobre la salud del consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jenkins B, Holsten S, Bengmark S, Martindale R Probiotics: a practical review of their role in specific clinical scenarios. *Nutr Clin Pract* 2005; 20: 262-70.
2. Kalliomaki, M., Isolauri, E. Role of intestinal flora in the development of allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003, 3, 15-20.
3. Kanauchi, O., Mitsuyama, K., Araki, Y., Andoh, A. Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003, 9, 333-346.
4. Hatakka, K., Martio, J., Korpeila, M., et al. Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis—a pilot study. *Scand J Rheumatol* 2003, 32, 211-215.

5. Pridmore, R.D., Berger, B., Desiere, F., et al. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 2512-2517.
6. Haller, D., Blum, S., Bode, et al. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets. *Infect Immun*. 2000; 68: 752-759.
7. Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E.J., von der Weid, T. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infect Immun*. 2003; 71: 428-436.
8. Granato D, Perotti F, Masserey I, et al. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(3):1071-7.
9. Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35: 483-489.
10. Bernet-Camard, M.F., Lievin, V., Brassart, D., et al. The human *Lactobacillus acidophilus* strain La1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63:2747-2753.
11. Neeser, J.R., Granato, D., Rouvet, et al. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology* 2000; 10: 1193-1199.
12. Cruchet, S., Obregon, M.C., Salazar, G., et al. Effect of the ingestion of a dietary product containing *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in children. *Nutrition*. 2003; 19: 716-721.
13. Gotteland, M., Cruchet, S. Suppressive effect of frequent ingestion of *Lactobacillus johnsonii* La1 on *Helicobacter pylori* colonization in asymptomatic volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:1317-1319.
14. Ventura, M., Zink, R. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 217: 141-154.
15. Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., et al. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 1996; 142,1097:1106.
16. Harmsen, H.J.M., Elfferich, P., Schut, F., Welling, G.W. A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in fecal samples by fluorescent in situ hybridization. *Microb Ecol Health Dis* 1999; 11: 3-12.
17. Franks, A.H., Harmsen, H.J., Raangs, G.C., et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3336-3345.

18. Suau, A., Rochet, V., Sghir, A., et al. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst Appl Microbiol* 2001; 24:139-145.
19. Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., et al. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:3069-3075.
20. Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J., et al. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2578-2588.
21. Brunser, O., Figueroa, G., Gotteland, M., et al. Effects of probiotic or prebiotic supplemented milk formulae on fecal microflora composition of infants. *Asia Pac J Clin Nutr* (en prensa)
22. Gibson, G.R. Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *Br J Nutr* 1998; 80: S209-12.
23. Ohkusa, T., Okayasu, I., Ogihara, T., et al. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 2003;52:79-83.
24. Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995;59:143-169.
25. Wallner, G., Amann, R., Beisker, W. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 1993;14:136-143.

Dirigir la correspondencia a:

Profesor Martin Gotteland
Laboratorio de Microbiología
INTA, Universidad de Chile
El Líbano 5524, Macul
Santiago, Chile
Teléfono: 9781471
Fax: 221 4030
Email: mgottela@inta.cl

Agradecimientos: Se agradece a Rebecca Montalva por los análisis de citometría de flujo y a Paola Torres por los análisis de FISH. Financiado por Nestlé Chile, Fondecyt 1010673 y ECOS C01S03.

Este trabajo fue recibido el 13 de Diciembre de 2005 y aceptado para ser publicado el 19 de Junio de 2006.