



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Aislamiento e identificación mediante el uso de pruebas bioquímicas de
bacterias ácido lácticas del tracto digestivo de ratas (*Rattus norvegicus*)**

TESIS QUE
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

OSCAR MOLINA GALICIA

ASESORA:

DRA. ESPERANZA GARCÍA LÓPEZ

COASESORA:

DRA. CYNTHIA GONZÁLEZ RUÍZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Aislamiento e identificación mediante el uso de pruebas bioquímicas de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo de ratas (Rattus norvegicus)

Que presenta el pasante: OSCAR MOLINA GALICIA
Con número de cuenta: 30319811-8 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de julio de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Crisóforo Mercado Márquez	
VOCAL	Q.F.B. Juana Alicia Alquicira Camacho	
SECRETARIO	Dra. Esperanza García López	
1er. SUPLENTE	Dr. Hugo Ramírez Álvarez	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Edna Maribel Legaspi Nuevo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm*

Agradecimientos.

A mis asesoras, las doctoras Esperanza García L. y Cynthia González R. por su incesante apoyo e interés durante la realización de este trabajo, así también a la doctora Maricela Leal H. y al CENID de Microbiología del INIFAP y todo el personal que me proporcionó recursos, tiempo y experiencia, a todos ustedes les doy mi agradecimiento y respeto infinitos.

A los que ya no están, mi padre Florencio Molina y abuelita María Castillo que a pesar de no poder estar a mi lado compartiendo este logro, los hago partícipes porque sus enseñanzas y cariño los llevaré siempre conmigo.

A mi madre María Silvia Galicia y hermanas Ana Lilia Molina y Claudia Itzel Molina quienes a pesar de todos los sinsabores salieron adelante y me impulsaron a este logro, todo lo que soy se los debo a ustedes. A mi tío Jacinto Galicia quien es y será como un padre para mí, gracias a su perseverancia, sus consejos y su paciencia, fue y será el mejor ejemplo de vida.

Areli Rodríguez quien ha estado a mi lado desde el comienzo de este viaje gracias por aparecer en mi mundo gris y llenarlo de color.

Finalmente quiero agradecer a todos aquellos que me dieron su confianza y me abrieron las puertas de sus vidas y corazón; MVZ's Claudia Enríquez, Roberto Carlos Figueroa, Nohemí Montes de Oca, Víctor Balboa y a mi jefe Daniel Catalán porque a los maestros no se les encuentra solo en las aulas. A mi coach Marco Antonio Sánchez (borrego) que cuando me encontraba perdido sus palabras y determinación me regresaron al camino correcto. Y finalmente a mis amigos José Luis Muciño, Juan Ángel Hernández, Iñaki Vicente y Ana Lissett Nativitas quienes entre bromas, juegos y peleas nos acompañamos y nutrimos ese anhelo de ser mejores cada día.

Qué gran libro se
podría escribir con lo que se
sabe. ¡Otro mucho mayor se
escribiría con lo que no se
sabe!

Julio Verne (1828-1905).

Índice.

Resumen	1
1. Introducción.	2
1.1 Antecedentes.	2
1.1.2 Promotores del crecimiento.	2
1.1.3 Probióticos y alimentos funcionales.	4
1.1.4 Función de los probióticos.	7
1.2 Productos para la alimentación animal.	12
1.3 Bacterias ÁcidoLácticas.	13
1.3.1 Género <i>Lactobacillus</i> .	15
1.3.1.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	19
1.3.2 Género <i>Aerococcus</i> .	21
1.4 Identificación bacteriana por características bioquímicas.	22
1.4.1 Pruebas enzimáticas rápidas.	22
1.4.2 El sistema de identificación microbiana comercial.	24
1.4.2.1 Sistema API 50 CHL®.	24
1.5 La rata de vida libre como modelo biológico.	27
2. Justificación.	29
2.1 La investigación de la microbiota de animales de vida libre y el efecto de su medio ambiente.	29
3. Hipótesis.	31
4. Objetivo general.	31
5. Objetivos particulares.	31

6. Metodología.	32
6.1 Animales y sitio de estudio.	33
6.1.2 Selección y recolección de muestras.	33
6.2 Obtención y selección de microorganismos.	33
6.2.1 Aislamiento y purificación de los microorganismos.	34
6.3 Pruebas bioquímicas.	35
6.3.1 Prueba de catalasa.	35
6.3.2 Prueba de oxidasa.	35
6.3.3 Prueba bioquímica API 50 CHL®.	35
7. Resultados.	37
7.1 Crecimiento en medio líquido MRS.	37
7.2 Crecimiento en agar MRS.	37
7.3 Registro de cepas purificadas.	39
7.4 Identificación bioquímica con test API 50 CHL®.	40
8. Discusión.	43
9. Conclusiones.	48
9.1. Perspectivas a futuro.	48
10. Bibliografía.	49

Índice de figuras y tablas.

Imágenes

Imagen 1 Vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).	18
Imagen 2 Ejemplo de % de identificación con taxones de referencia.	25
Imagen 3 Ejemplo de perfil típico.	25
Imagen 4 Aspecto de capsulas en prueba API 50 CHL®.	27
Imagen 5 Diagrama de decisión en la metodología de aislamiento de BAL.	32
Imagen 6 Crecimiento bacteriano en microtubos.	37
Imagen 7 Morfología macroscópica y microscópica de colonias aisladas.	38

Tablas

Tabla 1 Principales BAL con potencial probiótico.	9
Tabla 2 Principales bacteriocinas estudiadas en la industria pecuaria.	12
Tabla 3 Principales productos probióticos y su uso en la industria pecuaria	13
Tabla 4 Principales fuentes de obtención de BAL	30
Tabla 5 Características y origen de cepas aisladas.	39
Tabla 6 Identificación bioquímica con API 50 CHL® de cepas aisladas.	40
Tabla 7 Cepas identificadas.	41

Resumen.

Se capturaron 2 ratas *Rattus norvegicus* en las inmediaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y en una planta de embutidos. Los animales se caracterizaron y registraron para posteriormente realizar eutanasia de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 las muestras del tracto gastrointestinal (TGI) obtenidas de los especímenes fueron colocadas en medio líquido de Man Rogosa Saphre (MRS) y posteriormente sembradas, separadas y purificadas mediante la técnica de sembrado por agotamiento en agar MRS en condiciones microaerófilas utilizando un sistema gas pack e incubando en una estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas, las cepas aisladas fueron probadas con técnicas enzimáticas rápidas catalasa y oxidasa, las cepas que resultaron negativas a ambas pruebas fueron teñidas con tinción de Gram. Las cepas Gram positivas fueron separadas identificadas y reproducidas para posterior manejo. Una vez obtenidas las cepas se sembraron en tubos cónicos de 15ml y se incubaron en condiciones microaerófilas 48 horas a 37°C, el sedimento obtenido fue centrifugado a 10 000 rpm, el pellet resultante fue probado con el kit comercial API 50 CHL®. De las 112 cepas probadas se identificaron 8 cepas como potenciales BAL pertenecientes a 2 especies *L. acidophilus* y *A. viridans* encontradas en intestino grueso e intestino delgado. Es necesario realizar estudios posteriores como secuenciación genética y pruebas secundarias de función probiótica a estas cepas, para así determinar su capacidad probiótica.

I. Introducción

I.1 Antecedentes.

I.1.2 Promotores del crecimiento

En la actualidad se han prohibido en muchos países y es tendencia en otros tantos, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la industria pecuaria. Por lo que se está investigando la posibilidad de utilizar aditivos alternativos en lugar de antibióticos. Los probióticos son una de estas alternativas (Mercenier, Pavan, & Pot , 2003). El desarrollo de nuevos alimentos funcionales que contienen microorganismos probióticos, tales como bifidobacterias y bacterias ácido lácticas (BAL) representa un área creciente de la industria alimentaria y tiene especial interés en el campo de la nutrición, debido a sus favorables propiedades para la salud humana y animal (Saxelin , 2008).

Desde el descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1928 y la generalización de su uso en la década de los 40's, los antibióticos ha jugado un rol incomparable en la preservación, control y tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y animales. También es sabido que el uso de antibióticos en la alimentación animal es una vía importante para el aumento de la eficacia de los alimentos, promoviendo el crecimiento del animal y mejorando la calidad de los productos de origen pecuario. Por lo tanto, el uso de antibióticos ha sido una muy efectiva herramienta para asegurar el desarrollo de la ganadería intensiva y la industria pecuaria a gran escala. Sin embargo, el uso indiscriminado de los mismos ha aumentado el desarrollo de resistencia bacteriana (Aarestrup F., y otros, 1998).

Los antibióticos han sido clasificados en base a el efecto que tienen sobre las estructuras moleculares en las bacterias como la pared celular, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, metabolismo del ácido fólico, entre otros. Estos antibióticos han sido utilizados para tratar enfermedades infecciosas en humanos y animales. Por lo regular estos, siguen los mismos mecanismos de acción sobre las bacterias en ambos huéspedes. La interacción entre el humano y los animales

brinda una variedad de problemas y preocupaciones que coinciden con la transferencia de resistencia bacteriana y sus factores de virulencia entre ambas especies. Esta situación en la medicina veterinaria y humana puede influir en la pérdida de efectividad terapéutica de los antibióticos (Stanton T., 2013).

Por ejemplo, en el caso de los cerdos, estudios recientes han demostrado que el uso de antibióticos como promotores del crecimiento se ha correlacionado con una disminución en la actividad de la hidrolasa de las sales biliares, la cual es una enzima producida por bacterias intestinales, que ejerce un impacto negativo en la digestión y utilización de las grasas en el huésped, y por lo tanto, una mala conversión alimenticia (Lin, 2014).

Recientemente, el Programa Integral Canadiense para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (CIPARS) por sus siglas en inglés, informó de una posible asociación entre la *Salmonella enterica* serovariedad heidelberg resistente al ceftiofur aislada de carne de ave en venta al por menor y la incidencia de las infecciones por *Salmonella heidelberg* resistente al ceftiofur en los seres humanos a lo largo de Canadá (Moussa S. & Malouin, 2014).

El uso indiscriminado de antibióticos en México es muy común en el tratamiento de infecciones bacterianas. Uno de los principales problemas que esto ocasiona es la generación de resistencia bacteriana. Un ejemplo de esta situación lo demuestran estudios realizados en 1979, donde menos del 1% de las cepas aisladas de *Salmonella sp.*, en cerdos eran resistentes a las penicilinas. Sin embargo, para 1996 las cepas de *Salmonella sp.*, aisladas resistentes a las penicilinas aumentaron en un 38% (García G., Pérez M., Díaz C., & Acedo F., 2004). En cuanto a promotores de crecimiento, es de suma importancia seguir investigando alternativas con respecto al uso de antibióticos. Un tipo de alimento funcional que permita tener un efecto benéfico para la salud sería, suplementar con probióticos la alimentación animal.

I.1.3 Probióticos y alimentos funcionales

Los profesionales de la salud reconocen cada vez más los efectos favorables de los probióticos sobre la salud y la nutrición humana y animal. Estudios científicos recientes sobre las propiedades y funcionalidad de microorganismos vivos en los alimentos, sugieren que los probióticos desempeñan un importante papel en las funciones inmunitaria, digestiva, respiratoria y que podrían tener un efecto significativo en el alivio de las enfermedades infecciosas (FAO, 2006).

Los alimentos funcionales son definidos como todos los productos cuyo objetivo es contribuir con un bienestar fisiológico y que también generan un equilibrio nutricional y microbiano (García G., Pérez M., Díaz C., & Acedo F., 2004).

De estos hay 2 tipos:

- a) Proveen alguna función biológica.
- b) Disminuyen el riesgo de enfermedades.

La microbiota intestinal de los diferentes organismos juega un papel importante en el estado de salud de los individuos. Los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal pueden ser tanto inocuos como patógenos. Con la ingesta de alimentos adicionados con microorganismos favorecedores para el organismo (probióticos), se puede mantener y restaurar un estado favorable de salud. Muchas especies bacterianas han sido identificadas en el tracto gastrointestinal de los vertebrados. En el intestino grueso se han aislado de 400 a 500 diferentes especies bacterianas (García G., Pérez M., Díaz C., & Acedo F., 2004).

El consumo de alimentos fermentados se ha llevado a cabo desde tiempos ancestrales ignorando sus beneficios. A principios del siglo XIX, Metchnikoff propuso la existencia de una fuerte asociación entre la salud y el consumo de alimentos fermentados. De acuerdo con esta observación se ha desarrollado el concepto de alimentos funcionales (García G., Pérez M., Díaz C., & Acedo F., 2004).

Los alimentos funcionales son una alternativa profiláctica para obtener y mantener una salud favorable en humanos y animales. En la industria porcina por ejemplo, es de gran importancia dado que uno de los principales problemas son las infecciones gastrointestinales originadas por bacterias como *E. coli* k88, que es una de las causas más comunes de infección en cerdos (García G., Pérez M., Díaz C., & Acedo F., 2004).

El término **probiótico** es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar a las bacterias que tienen efectos favorables para los seres humanos y animales. La observación original de la función positiva desempeñada por algunas bacterias se atribuye a Eli Metchnikoff, ruso galardonado con el premio Nobel por sus trabajos en el Instituto Pasteur a comienzos del siglo pasado, el afirmó que "La dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos, hacen posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles" (Metchnikoff, 1907).

El pediatra francés Henry Tissier en 1906, observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de Y, estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en los niños sanos. Sugirió entonces la idea de administrar dichas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana (Tisser, 1906).

Las obras de Metchnikoff y Tissier, fueron las primeras en las que se hicieron propuestas científicas con respecto a la utilización probiótica de bacterias, aun cuando la palabra "probiótico" se acuñó hasta 1960, para designar las sustancias producidas por microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos (Lilly D. & Stillwell R., 1965). Fuller en 1989, con objeto de resaltar el carácter probiótico de los microbios los redefinió como "suplemento dietético", el cual es elaborado a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped, mejorando su equilibrio intestinal. Havenaar y Huis in 't Veld en 1992,

propusieron una definición muy similar: "monocultivo o cultivo mixto viable de bacterias, que cuando se aplica a animales o seres humanos afecta beneficiosamente al huésped mejora las propiedades de la flora autóctona". Una definición más reciente, aunque probablemente no sea la última, es la siguiente: "microorganismos vivos, que cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables" (Guarner & Schaafsma G., 1998).

Salminen *et al* (1998) definieron a los probióticos como "agente microbiano variable que al utilizarse en el hombre o en animales aporta efectos benéficos, mejorando el balance de la microbiota intestinal (Caballero C., 2014).

El uso de probióticos para la reducción de patógenos transmitidos por los alimentos en el ganado sigue demostrando resultados favorables en la industria de bovinos para carne. Varias cepas de probióticos demuestran beneficios para la salud sistémica en el ganado y evitan en contagio y enfermedad con cepas de *Escherichia coli* hemorrágica en el ganado (Randhawa, Brashears M., McMahon K., Fokar, & Karunasena, 2010).

En la industria porcina, que es considerada una de las actividades más importantes dentro de la cadena de producción de alimentos. Hoy en día, la eficacia de los suplementos de antibióticos profilácticos en los animales de granja es muy controvertida, ya que el uso indiscriminado de antibióticos resultó en un aumento de la aparición de resistencia a los antibióticos en algunas bacterias intestinales, como *Salmonella sp.*, y *Campylobacter sp.*, que colonizan el tracto intestinal de los cerdos en diferentes etapas. Una de las alternativas propuestas a la administración de suplementos de antibióticos consiste en la administración de probióticos. En lechones lactantes, *Lactobacillus reuteri*, *L. ruminis*, *L. salivarius*, *L. amylovorus*, *L. mucosae*, *Streptococcus bovis* y *Enterococcus faecalis*. Son los organismos encontrados con mayor frecuencia (Bolado & Acedo F., 2009).

Los probióticos se han utilizado en la actualidad como un método eco-amigable y sustentable en muchos ámbitos de la producción pecuaria, destacando en la acuicultura, porcicultura y la avicultura, por mencionar algunas.

Los probióticos han sido utilizados alrededor del mundo y han incrementado su popularidad. La tendencia de consumo de los probióticos está asociada con el aumento de la conciencia de la salud, y la disponibilidad de los probióticos en forma de suplementos dietéticos. El mercado de los productos probióticos ha generado 15.9 billones de dólares en 2008 y se calculó un crecimiento hasta los 28.8 billones para el 2015. El factor que más ha facilitado el crecimiento del mercado de los probióticos son los componentes de sus fórmulas y el conocimiento científico de los beneficios proporcionados (Min-Tze, 2011).

Los probióticos ya se usan ampliamente en Europa y en algunas partes de Asia, aunque están ganando rápidamente popularidad en el mundo, particularmente en los Estados Unidos. Europa representa el sector más grande y con más rápido crecimiento en el mercado. En adición Alemania y el Reino Unido representan aproximadamente el 45% del mercado total. Japón en el segundo mayor mercado y se espera que tenga un crecimiento moderado (Min-Tze, 2011).

I.1.4 Función de los probióticos

Los probióticos se definen como un cultivo puro o mezcla de microorganismo vivos, bacterias o levaduras, los cuales pueden tener alguna o varias de las siguientes funciones: reducir la colonización de patógenos, disminuir o suprimir la producción de factores de virulencia, estimular la respuesta inmunológica (producción y secreción de factores antiinflamatorios), producir compuestos con actividad antimicrobiana y antiviral en el intestino, bronquios, aparato genitourinario y glándula mamaria, es decir, que pueden tener efecto principalmente sobre las mucosas. Dichos agentes probióticos, se adhieren a la pared intestinal y proliferan en el mismo. Los probióticos pueden actuar mediante la reducción o prevención de infecciones por agentes patógenos, aumento su número como microflora intestinal, compitiendo con agentes patógenos por los nutrientes y, por lo tanto, reduciendo la carga de bacterias dañinas mediante la producción de sustancias inhibitoras como bacteriocinas y ácidos orgánicos, permitiendo así una buena digestión mediante la producción de enzimas y estimulando al sistema inmune local (Cutting S., 2011).

Fundamentalmente, los efectos de los probióticos pueden dividirse en 2 tipos; directos mediante sus componentes celulares, esta contribución se da por la interacción entre los componentes celulares de BAL entre el sistema inmune mediado por las células presentadoras de antígeno presentes en el intestino (efectos biogénicos) e indirectos mediante la modulación de la microbiota intestinal, que contribuyen a la generación o estabilización del balance en la microbiota intestinal (efectos probióticos). Los efectos de los probióticos pueden ser duales, las células probióticas vivas tienen una influencia sobre la microbiota gastrointestinal y tienen un efecto inmunomodulador, por otro lado, los componentes de las células muertas pueden tener un efecto inmunomodulador debido a la respuesta inflamatoria (Heping & Yimin , 2014). En la producción animal intensiva se utilizan actualmente los probióticos como promotores del crecimiento. Estos productos son aditivos zootécnicos formados por microorganismos vivos que benefician al hospedero y por ende, influyen en sus rendimientos productivos. Entre los microorganismos que más se emplean para la elaboración de estos aditivos, se encuentran los cultivos microbianos puros, fundamentalmente de bacterias ácido lácticas y levaduras, y los cultivos mixtos. La mayoría de las cepas microbianas utilizadas como probióticos provienen del contenido gastrointestinal de diferentes especies animales y de sus heces (García, y otros, 2008).

Varios investigadores han podido comprobar los efectos benéficos de los probióticos reportando sus efectos nutricionales, su antagonismo contra patógenos y su acción de inmunomodulación. Esta actividad la desarrollan a través de la interacción de los probióticos con el tejido linfoide, favoreciendo la maduración del sistema inmune (Cebra J., Periwal S., Lee , Lee , & Shroff K., 1998). Por otra parte, se ha reportado que algunas cepas tienen la capacidad de incrementar la inmunidad innata, por medio de la estimulación de la actividad fagocítica. Asimismo, se ha documentado que pueden producir inmunoglobulinas A, es decir, estimulan también la inmunidad adquirida o específica. Adicionalmente, se tienen evidencias de que los probióticos pueden inhibir procesos patológicos como reacciones de hipersensibilidad o reducción de alergias, interviniendo sobre la inmunidad celular y humoral. Recientemente, se ha investigado sobre la acción de algunas bacterias en

la desconjugación de sales biliares, postulándose que estas podrían estimular el catabolismo del colesterol, disminuyendo la colesterolemia (Caballero C., 2014). El tracto gastrointestinal de los mamíferos en general posee una amplia diversidad de colonias bacterianas. En humanos comprende más de 1000 especies diferentes (O'Hara A. & Shanahan, 2006). En circunstancias normales las bacterias comensales son esenciales y activas en la salud ya que ejercen un efecto acondicionador y protector de la estructura intestinal, así como también favorecen la homeostasis. Las bacterias protegen contra infecciones, y activamente intercambian señales de desarrollo y de regulación con el huésped, que permiten integrar la inmunidad de la mucosa (O'Mahony, y otros, 2009).

Los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son los géneros comúnmente empleados para la producción de probióticos como se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Principales Bacterias Ácido Lácticas con potencial probiótico.

<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. ciferum</i>
<i>B. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i>
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	<i>L. brevis</i>		<i>L. mesenteroides</i>
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>		
<i>B. thermophilum</i>	<i>L. crispatus</i>		
	<i>L. farmicinis</i>		
	<i>L. fermentum</i>		
	<i>L. murinus</i>		
	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>		
	<i>L. reuteri</i>		
	<i>L. rhamnosus</i>		
	<i>L. salivarius</i>		

Bacterias ácido lácticas (BAL) utilizadas como probióticos en la industria pecuaria mencionadas por genero bacteriano. * Tomada de (Caballero C., 2014)

Durante fermentaciones lácticas las bacterias ácido lácticas (BAL) producen varios compuestos como ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Lindgren S. & Dobrogosz W., 1990).

Los productos finales tanto de homofermentación como heterofermentación de las bacterias ácido lácticas incluyen ácidos orgánicos como el ácido láctico, acético y propiónico, haciendo su ambiente de crecimiento desfavorable para el crecimiento de muchos patógenos. La producción de ácidos orgánicos por las bacterias probióticas disminuye el pH intestinal, y por lo tanto, se inhibe el crecimiento de patógenos. Estos ácidos orgánicos incrementan los movimientos peristálticos, lo que de manera indirecta remueve los patógenos acelerando la velocidad con la que atraviesan el intestino. Se ha reportado que los ácidos grasos de cadena corta como el ácido acético y el ácido láctico poseen una alta actividad antimicrobiana. Estos ácidos pueden atravesar la membrana externa de las células por mecanismos de difusión y llevar protones al interior. El flujo de protones hacia el interior induce la acidificación del citoplasma y disipa el potencial de la membrana. Esto trae como consecuencia la pérdida de la fuerza motriz generada por los protones e inhibe el transporte de sustratos provocando la muerte de la célula (Figueroa G., 2007).

Además de los ácidos orgánicos producidos por las BAL, se produce diacetilo que se genera del exceso de piruvato derivado del citrato (Daeschel A., 1989). El diacetilo es una dicetona no polar, volátil con un aroma mantecoso fuerte. Se ha reportado que estas sustancias químicas inhiben el crecimiento de bacterias Gram negativas por inactivación del uso de arginina a través de la reacción entre diacetilo con la proteína de unión a arginina (Jay J., Rivers G., & Boisvet W., 1983).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es producido por las BAL en presencia de oxígeno a consecuencia de la acción de la flavoprotein oxidasa o NADH peroxidasa. El efecto antimicrobiano de H_2O_2 puede resultar de la oxidación de grupos sulfhidrilo que causa desnaturalización de enzimas y la peroxidación de lípidos de la membrana, aumentando así la permeabilidad de la membrana que puede ser letal

a organismos competidores. El H_2O_2 también puede ser un precursor para la producción de radicales libres bactericidas como superóxido y radical hidroxilo, que pueden dañar el ADN microbiano. Se ha reportado que son producidos en cantidades suficientes por algunos lactobacilos para inhibir *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Proteus sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphilococcus aureus*, y *Salmonella typhimurium* (Heping & Yimin , 2014).

El término bacteriocina se usa para describir compuestos antimicrobianos sintetizados en el ribosoma bacteriano que son producidas por muchas especies bacterianas diferentes, incluyendo numerosos miembros de BAL (Jack R., Tagg J., & Ray , 1995).

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas bactericidas que generalmente son activadas frente a especies emparentadas íntimamente con el organismo que las produce. La producción de bacteriocinas por parte de las BAL ha sido estudiada exitosamente en los últimos años y han sido descritas varias de ellas (N. & E., 1995).

Algunas bacteriocinas producidas por BAL tales como la nisina, no sólo inhiben especies estrechamente relacionadas, sino que también son eficaces contra una amplia gama de patógenos transmitidos en los alimentos y muchos otros microorganismos Gram positivos causantes del deterioro en los mismos (Jack R., Tagg J., & Ray , 1995).

La nisina es la única bacteriocina con aplicación práctica en la industria alimentaria hasta la fecha. Producida por ciertas cepas de *Lactococcus lactis*, se descubrió cuando una cepa productora de nisina causaba problemas en la fabricación de queso mediante la inhibición de algunos cultivos iniciadores. La nisina se encuentra disponible comercialmente y se ha utilizado como conservante de alimentos en el Reino Unido y otros países desde principios de la década de 1950, aunque no fue aprobado para su uso en los Estados Unidos hasta 1988 (R. Adams & O. Moss, 2008). En la Tabla 2. se presentan algunas de las principales bacteriocinas producidas por BAL.

Tabla 2. Principales bacteriocinas estudiadas en la industria pecuaria.

Bacteriocina	Especies que la producen	Bacterias inhibidas
Nisina	<i>L. lactis subsp. lactis</i>	Gram positivas
Lacticina 3147	<i>L. lactis subsp. lactis</i>	Gram positivas
Lacticina 481	<i>L. lactis subsp. lactis</i>	Gram positivas
Lactococcina B	<i>L. lactis subsp. cremoris</i>	Lactobacilos
Enterococcinas A y B	<i>E. faecium</i>	<i>Listeria</i> y otras Gram positivas
Lactocina 705	<i>L. casei</i>	<i>Listeria</i> , BAL y <i>Streptococcus</i>
Lactacina B	<i>L. acidophilus</i>	Lactobacilos, <i>L. lactis</i>
Lacticina F	<i>L. acidophilus</i>	Lactobacilos y Enterococos
Sakacina	<i>L. sakei</i>	Lactobacilos estrechamente relacionados, <i>Listeria</i>
Pediocina AcH	<i>P. acidilactici</i>	<i>Listeria</i> , BAL, otras Gram positivas
Mesentericina Y105	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Listeria</i> , <i>Leuconostoc</i> , Lactobacilos

(Caballero C. 2014).

1.2 Productos para la alimentación animal.

Las compañías de alimentación animal e investigadores han buscado productos alternativos y estrategias que ayuden a mantener la salud del tracto gastrointestinal previniendo o reduciendo daños causados por agentes patógenos. En la Tabla 3, se presentan los principales productos utilizados como promotores de crecimiento alternativos en la alimentación animal.

Tabla 3. Principales productos probióticos y su uso en la industria pecuaria

Cultivo probiótico	Aplicación
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Promotores del crecimiento para cerdos y aves de postura.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Aves, ganado de carne y acuicultura.
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>	Ganado porcino, ovino, caprino, aves y equinos
<i>Enterococcus faecium</i>	Ganado bovino y otros rumiantes, animales recién nacidos y en crecimiento

(Min-Tze Liong, 2011)

I.3 Bacterias Ácido Lácticas.

Las bacterias ácido lácticas no tienen significancia taxonómica alguna, aunque mediante técnicas serológicas y catalogación del ARN ribosómico de 16S se ha demostrado que desde el punto de vista filogenético, las BAL están emparentadas y comparten varias características comunes (N. & E., 1995); van desde organismos con forma de bacilos o cocos, no esporuladas, Gram positivas, generalmente catalasa negativa, microaerófilas y ácido tolerantes, hasta estrictamente anaerobias que residen en diversos hábitats. Algunas captan el oxígeno por mediación de las oxidasas de la flavoproteína, oxidación que se utiliza para producir peróxido de hidrógeno y/o para oxidar de nuevo el NADH producido durante la deshidrogenación de los azúcares (N. & E., 1995). Estas se encuentran en las cavidades humanas y animales como en el tracto gastrointestinal, cavidad oral, tracto respiratorio y cavidad vaginal, así como también se han encontrado en un amplio número de nichos naturales como plantas, lácteos procesados, carne y vegetales (Heping & Yimin , 2014).

Mucho del conocimiento de la microbiota intestinal proviene de estudios en humanos. Microbiológicamente, el tracto gastrointestinal (TGI) puede tener en términos generales tres principales regiones: el estómago, intestino delgado e intestino grueso. En términos de población microbiana, el estómago contiene una menor población bacteriana; anaerobios facultativos como *Lactobacillus*, *Streptococcus* y levaduras están presentes en más o menos 10^3 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro debido al bajo pH que presenta. El intestino delgado tiene la mayor carga bacteriana que consiste en anaerobios facultativos, como *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Enterobacter* también anaerobios como *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., y *Clostridium* a niveles de 10^4 a 10^8 UFC/ml. la región mayormente colonizada es el colon que contiene 10^{11} - 10^{12} UFC/ml. (Rastal, 2003)

Condiciones de fermentación tales como la temperatura, pH, los tipos de medios de crecimiento, el oxígeno y el tipo de neutralizador, tienen un gran efecto sobre la actividad de crecimiento de las BAL. Entre estos, los tipos de medios de cultivo utilizados juegan un papel importante en el crecimiento. Varios medios de crecimiento para las BAL tales como el medio MRS, M-17, el medio de Elliker, leche descremada, suero de leche y permeados, han sido ampliamente utilizados (Oh, Rheem , Sim, Kim , & Baek, 1995).

Históricamente las bacterias ácido lácticas son definidas como una familia ubicua y heterogénea de microorganismos que pueden fermentar varios nutrientes principalmente azúcares, resultando esto en la producción de ácido láctico (Heping & Yimin , 2014).

Las bacterias ácido lácticas poseen una amplia gama de aplicaciones industriales que van desde cultivos iniciadores en la industria láctea a los probióticos en los suplementos dietéticos y agentes de bioconversión (Heping & Yimin , 2014).

Poseen propiedades antimicrobianas debido a su capacidad para reducir el pH intestinal. Recientemente se demostró que pueden permeabilizar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, destruyendo el lipopolisacárido y

ocasionando la pérdida de viabilidad de las mismas (Kuipers, Gribe , & Kok , 2002). También poseen un relativo amplio espectro, para inhibir la proliferación de muchas bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, contaminante de cremas sintéticas, huevos, alimentos salados como los jamones, alimentos para ganado, queso y leche, *Bacillus cereus* en arroz y leche causante de gastroenteritis y Gram negativas como *Salmonella sp* que contamina diferentes alimentos como leche, frijoles, papas, manzanas las cuales pueden causar disentería (Knchana & Ramanathan, 2008).

Los géneros más importantes de BAL son *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Weissella sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Tetragenococcus sp.* y *Bifidobacterium sp.* (FAO, 2006).

I.3.1 Genero *Lactobacillus*

Los lactobacilos fueron las primeras bacterias ácido lácticas identificadas como microorganismos que tienen efectos benéficos para la salud. Crecer en todos los hábitats que contengan azúcares fermentables, productos hidrolizados de proteínas, vitaminas, factores de crecimiento y de oxígeno. Además, por ser buenos productores de ácido láctico (hasta un 2.7%) y en ocasiones sustancias antimicrobianas, tienden a dominar numéricamente y limitar o impedir el desarrollo de microorganismos patógenos (Sarpe M., 1981).

La clasificación de los lactobacilos se basa en el metabolismo de carbohidratos:

- Los lactobacilos **Homofermentativos**: tienen como metabolito primario el ácido láctico producto de la fermentación de hexosas y únicamente pequeñas cantidades de ácido acético, CO₂ e indicios de otros productos. Estos microorganismos pueden ser termófilos, donde su cultivo se logra a 45°C y comprende las siguientes especies: *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*; o mesófilos, donde su cultivo es posible a 15°C, tales como: *L. casei* y *L. plantarum* (Caballero C., 2014).

- Los lactobacilos **Heterofermentativos**: fermentan hexosas casi exclusivamente al ácido láctico hasta ácido acético, CO₂, etanol y otros productos volátiles como alcohol, bajo ciertas limitantes de glucosa como: *L. fermenti*, el cual es capaz de crecer a temperaturas elevadas (45°C) siendo así considerado termófilo y los mesófilos tienen una temperatura óptima de crecimiento de entre 15 a 35°C y dentro de esta clasificación está el *L. brevis* (Caballero C., 2014).

El género *Lactobacillus* consiste en alrededor de 60 especies y subespecies basados en datos filogenéticos. Ecológicamente los lactobacilos están asociados con materiales de fermentación, leche y productos lácteos, carne y sus subproductos, la cavidad oral, el tracto respiratorio, tracto digestivo y la vagina, tanto en humanos como en animales. El taxón es un grupo heterogéneo compuesto por especies con una relativa amplia elasticidad en cuanto a sus variables fisiológicas (Nigatu, Ahrné, & Molin, 2000).

El género *Lactobacillus* consiste en bacilos Gram negativos, no esporulados usualmente inmóviles y ocasionalmente reductores de nitrato. Son catalasa negativos cuando crecen en ambientes nutricionales complejos como carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ácidos grasos, esteroides, sales y vitaminas. Las células varían entre bacilos largos y delgados, algunas veces varillas cortas, frecuentemente corineformes, con forma de cocos y usualmente formación de cadenas y estas son comúnmente regulares con una longitud de 0.5-1.2 X 1.0-10.0 µm. Para su crecimiento, el rango de temperatura varía entre los 2°C y 50°C y su rango de pH es entre 3 y 8. Su temperatura óptima de crecimiento es usualmente de 30°C a 40°C y un pH de 5.5 a 6.2 (Salvetti, Fondi, Fani, Torriani, & Felis G., 2013). Las colonias sembradas en agar por lo general son pequeñas (2-5 mm) con orillas redondeadas, convexas, suaves y comúnmente opacas y sin pigmento, en raras ocasiones pueden tener un pigmento rojizo o amarillento; algunas especies forman colonias rugosas. En medio líquido generalmente el sedimento es suave y

homogéneo, rara vez es granular. Los lactobacilos no producen un aroma característico creciendo en medios comunes. Cuando crecen en alimentos producen numerosos compuestos volátiles que contribuyen a generar el aroma característico de los alimentos fermentados como el diacetilo, ácido acético, acetaldehído; que son derivados del metabolismo de carbohidratos. Y otros compuestos como el cresol, escatol y benzaldehído derivado del catabolismo de aminoácidos (Paul, y otros, 2009).

Los lactobacilos no solamente requieren carbohidratos como fuente de energía y carbono, también requieren nucleótidos, aminoácidos y vitaminas, además salvo algunas especies, requieren de ácido pantoténico y nicotínico; la tiamina es únicamente necesaria para el crecimiento de los lactobacilos heterofermentativos. Los lactobacilos generalmente fermentan la glucosa por la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o por la vía de la glicólisis. También pueden ser homofermentativos produciendo más del 85% de ácido láctico a partir de una molécula de glucosa, o heterofermentativos produciendo ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético en concentraciones equimolares (Salvetti, Fondi, Fani, Torriani, & Felis G., 2013).

La Glucólisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), es la vía por la cual las especies denominadas homofermentativas; con disponibilidad de glucosa, de factores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos y precursores de ácidos nucleicos y cantidad de oxígeno limitada, metabolizan las hexosas. Convirtiendo una molécula de glucosa en dos moles de ácido láctico y dos moles de ATP (Caballero C., 2014). En esta ruta la enzima clave es la fructosa 1´6-difosfato aldolasa, por medio de la cual la molécula de glucosa antes de ser escindida por la enzima aldolasa, es fosforilada e isomerizada a gliceraldehido-3-fosfato. A continuación, este es convertido en piruvato que durante su conversión se produce ATP por fosforilación a nivel del sustrato de 2 sitios para dar un producto total de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa fermentada. Con el fin de regenerar el NAD⁺ consumido en la oxidación del gliceraldehido-3-fosfato, el piruvato es reducido a lactato utilizando NADH. (N. & E., 1995) A este grupo pertenecen las cepas *L. acidophilus*,

L. gasseri, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. leichmanii*, *L. salivarius* y *L. jensenii*. Estas especies son incapaces de fermentar las pentosas o el gluconato. También se incluyen los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus pentosaceus* (Caballero C., 2014). En la imagen 1 se ejemplifica la vía EMP.

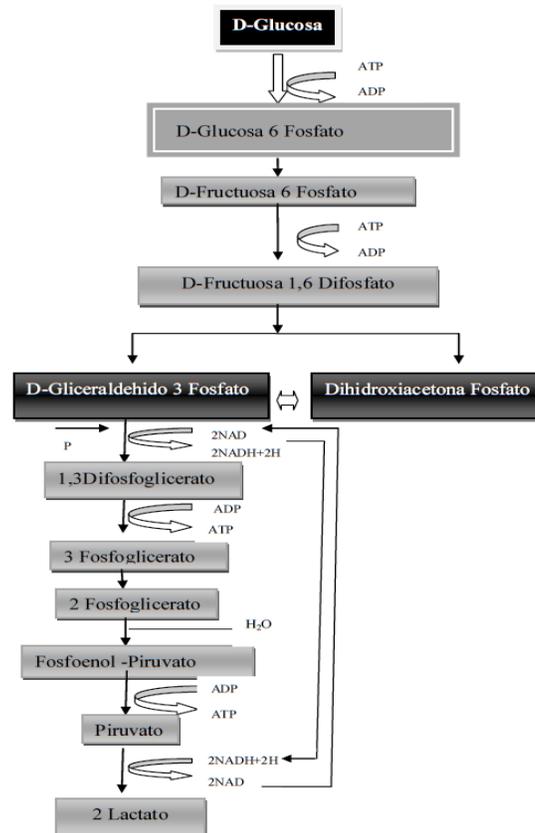


Imagen 1. Vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) la principal vía metabólica que utilizan las BAL. (Caballero C., 2014)

El género *Lactobacillus*, junto al género *Paralactobacillus* y *Pediococcus*, pertenecen a la familia Lactobacillaceae y al orden Lactobacillales en el grupo de los Firmicutes (Heping & Yimin , 2014).

A pesar de que las especies de los géneros *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* están estrechamente relacionadas, ellas pueden ser descritas por separado. Utilizando el análisis de las secuencias del gen ARN 16s, la filogenia de las BAL ha revelado algunas relaciones entre sí (Heping & Yimin , 2014).

En 1896, el género fue descrito por primera vez por Beijernick (1901), y la especie fue *Lactobacillus delbrueckii*. El género *Lactobacillus* es el más grande y diverso de las bacterias ácido lácticas, actualmente comprende 158 especies validadas, 7 de estas se componen de 18 subespecies en total (Heping & Yimin , 2014).

Estos lactobacilos pueden encontrarse en diversos hábitats, que se pueden clasificar en 8 distintos nichos de acuerdo con el recurso de aislamiento; plantas (aislado de plantas o asociado a productos de fermentación de las plantas), masas fermentadas, cárnicos, lácteos, vinos, tracto gastroentérico de animales (aislado de tracto de animales o humanos, incluyendo saliva o heces), otras cepas en humanos y animales excluyendo las aisladas en tracto gastrointestinal y del medio ambiente en general. (Heping & Yimin , 2014).

1.3.1.2 *Lactobacillus acidophilus*

Este organismo, cultivado por primera vez por Moro en 1900 a partir de heces de lactante, ha sido aislado del intestino de casi todos los mamíferos, muchos vertebrados y algunos invertebrados. Su cantidad se incrementa en el intestino cuando aumenta el contenido de carbohidratos en la dieta; pueden ser predominantes cuando se ingiere una dieta láctea (Ibarra D., 2013).

L. acidophilus se considera en términos generales benéfico, ya que produce vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, acidolfina, lactocidina y bacteriocina (Ibarra D., 2013).

Aislamiento:

- Cavidad oral, tracto gastrointestinal y tracto genitourinario de los mamíferos.
- Presencia dominante en intestino delgado.
- Presente en leche, carne, pescado y cereales.

Identificación bacteriana:

- Bacilos Gram positivos con puntas redondeadas.
- Reacción negativa a la prueba de catalasa.
- No esporulados.
- Inmóvil o con motilidad negativa.

Morfología:

- Estos bacilos se presentan comúnmente en pares o formando cadenas cortas. No tienen citocromos. Las colonias en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Su crecimiento en medio líquido, aunque sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; da lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas en la superficie del líquido. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso. Muchos cultivos muestran una forma diplobacilar característica (agrupadas de dos en dos), a menudo reniforme. Frecuentemente los cultivos viejos muestran considerable pleomorfismo. Las cadenas largas, las formas filamentosas y las formas en manzana no son raras. Las colonias generalmente pequeñas, pueden variar en su forma: de la opaca, redonda y lisa a la aplanada, traslúcida e irregular, frecuentemente con aspecto de cristal.

Clasificación según su exposición al oxígeno:

- Son aero-tolerantes, aunque pueden crecer en presencia de O₂ no pueden utilizarlo, sino que obtiene energía exclusivamente por fermentación. Se

conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% hasta 10%) puede estimular el desarrollo, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos.

Crecimiento según su pH:

- Ácido-tolerante; crece fácilmente en medios mucho más ácidos, a un pH inicial de 4.5 – 6.5 y con un pH óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.0, deteniendo su crecimiento a pH de 3.6 a 4.0.

Crecimiento según su temperatura:

- Crecimiento entre 35 a 40°C, aunque puede ocurrir un crecimiento a 45°C. los llamados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no pueden crecer por debajo de 15°C.

Fermentación de azúcares:

- Utiliza la lactosa y la metaboliza formando ácido láctico como producto principal.

Factores que afectan su viabilidad:

- Puede ser eliminado por exceso de calor, humedad o la luz solar directa, es por ello que debe conservarse en refrigeración.

1.3.2 Género *Aerococcus*

El género *Aerococcus* fue clasificado en 1953 por Williams para acomodar a algunas especies de bacterias Gram-positivas, microaerofílicas y catalasa negativas (algunas pueden ser pseudo catalasa positivas). Estos organismos con forma de cocos se diferencian del género *Streptococcus* primariamente por su arreglo celular. El género *Aerococcus* ha sido encontrado en un amplio rango de ambientes incluyendo aire, polvo, vegetación, carnes encurtidas, suelo, tracto respiratorio de

humanos y recursos marinos. Por mucho tiempo este género comprendió solo una especie *Aerococcus viridans*; sin embargo, más recientemente se han catalogado 6 especies *A. christensenii*, *A. sanguinicola*, *A. suis*, *A. urinae*, *A. urinaehominis* y *A. viridans* (Heping & Yimin , 2014).

I.4 Identificación bacteriana por características bioquímicas

El primer paso en la identificación de bacterias es la evaluación fenotípica del crecimiento de la colonia. En muchos casos, la morfología de la colonia como color, forma, tamaño, reacción hemolítica y características del crecimiento en varios medios selectivos y diferenciales, pueden colocar a un organismo en una familia, género e inclusive en un mismo nivel entre especies. De hecho, la evaluación de la habilidad de un organismo para crecer en diversos medios *in vitro* junto con sus necesidades de oxígeno y su morfología en una tinción Gram, así como, unas cuantas pruebas rápidas como catalasa, oxidasa, coagulasa, e indol a menudo ofrecen una identificación preliminar para muchos géneros clínicamente significativos (Tang & Stratton W., 2012).

La identificación bioquímica se puede clasificar en 2 grupos: los sistemas convencionales de identificación bacteriana y los sistemas comerciales. Los esquemas de identificación por diferentes laboratorios no son uniformes en parte debido a la disponibilidad de numerosas opciones, variada complejidad de los ensayos de laboratorio, el volumen y la experiencia del personal técnico, así como de los costos. En general la mayoría de los laboratorios se basan en una combinación de ambos sistemas de identificación (Tang & Stratton W., 2012).

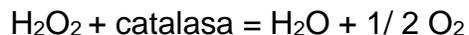
I.4.1 Pruebas enzimáticas rápidas

Estas son un grupo de pruebas que detectan la presencia o ausencia de una enzima o una reacción bioquímica en particular, realizada en segundos o en minutos. Estas pruebas son baratas, fáciles de realizar y regularmente proveen importante información inicial que es usada para determinar los pasos subsecuentes en el esquema de identificación bacteriana. Estas pruebas son parte

importante de ambos tipos de pruebas convencionales y comerciales. Además, pueden ser utilizadas para una identificación presuntiva de ciertos organismos de un género o especie (Tang & Stratton W., 2012).

a) Prueba de catalasa.

La catalasa es una enzima presente en el sistema enzimático del citocromo, es responsable de la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) formado durante la respiración aerobia. Todos los organismos que usan el sistema del citocromo para su respiración serán positivos a la prueba de catalasa. Aquellos organismos que utilicen una vía diferente no producirán reacción (Tang & Stratton W., 2012).



Una prueba positiva genera un rápido burbujeo causado por la separación de O₂ del H₂O₂ en presencia de la catalasa. Una prueba negativa marcará la ausencia de burbujeo (Tang & Stratton W., 2012).

b) Prueba de oxidasa

La prueba de oxidasa se basa en la producción de la enzima oxidasa indofenol por organismos que contienen citocromo C. La Indofenol oxidasa, en presencia de oxígeno atmosférico oxida un tinte redox (N, N, N, N-tetrametil-p-fenilendiamina diclorhidrato) para formar un compuesto púrpura oscuro, indofenol (Tang & Stratton W., 2012).

Las colonias que crecen en medios selectivos o medios diferenciales pueden trasladar el indicador y por lo tanto causar resultados inexactos. Las colonias cultivadas en medios que contienen alta concentración de glucosa, no se pueden utilizar para la determinación de oxidasa, ya que la fermentación inhibe la actividad de indofenol oxidasa resultando en falsos negativos (Tang & Stratton W., 2012).

I.4.2 El sistema de identificación microbiana comercial

Es la columna vertebral de la identificación microbiana en los laboratorios de microbiología clínica. Proporciona una ventaja sobre los sistemas convencionales de identificación, al requerir poco espacio de almacenamiento y tener una vida útil más larga, de respuesta rápida, de “bajo costo”, control de calidad estandarizada y facilidad de uso (Tang & Stratton W., 2012).

Estos sistemas requieren la inoculación simultánea y la incubación de una serie de reacciones bioquímicas miniaturizadas, que se basan en la detección de enzimas bacterianas o productos celulares que no requieren el crecimiento microbiano y tienen tiempo de respuesta rápido (2-4 h) o basada en la actividad metabólica que requiere el crecimiento microbiano y varias horas de la incubación durante la noche. En cualquier caso, los resultados finales enzimáticos o bioquímicos se combinan, y usando el teorema de Bayer o con la ayuda de un programa de ordenador se determina la identidad del organismo de interés (Tang & Stratton W., 2012).

La mayoría de los sistemas metabólicos de identificación comercial automatizados están basados también en incorporar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Tang & Stratton W., 2012).

En su mayoría estos sistemas tienen una extensa base de datos. Ellos son rápidos, preciso, y tienen significativamente un mejor tiempo de respuesta para la identificación y antibiograma de los organismos comunes.

I.4.2.1 Sistema API 50 CHL®

Los sistemas de identificación API, BioMerieux Inc., consisten en una serie de micro-cápsulas en una tira de plástico que contiene sustratos deshidratados para la demostración de la actividad enzimática o la fermentación de hidratos de carbono. Dependiendo del tipo de organismo y la tira API utilizada, puede o no requerir el crecimiento microbiano. Los sistemas API son manuales (Tang & Stratton W., 2012).

Para identificar un organismo, los perfiles obtenidos han de ser comparados con los perfiles de los organismos emparentados o taxones de la base de datos. Calculando para el perfil obtenido:

Su proximidad relativa a los diferentes taxones de la base de datos (porcentaje de identificación, %id). De esta forma se determina si el perfil obtenido está próximo a un taxón. La imagen 2 permite visualizar la manera en que son determinados los taxones más cercanos a la muestra problema o perfil "X".

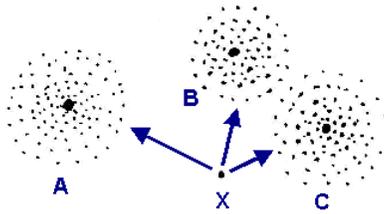


imagen 1. ejemplo de porcentaje de identificación contra taxones de referencia (Api web 2016)

El taxón más típico es el que no tenga pruebas en contra de la identificación, en relación al porcentaje mostrado en la base de datos para el taxón en cuestión como se muestra en la imagen 3.

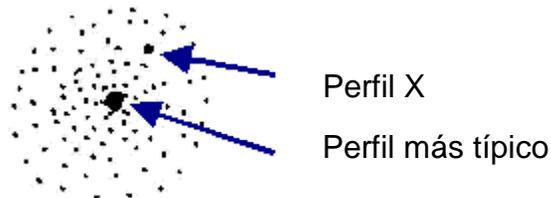


Imagen 2. Si la muestra es cercana al perfil más típico su identificación es más confiable (Api web 2016)

Criterios de identificación

- Identificación en el taxón: se ha seleccionado un solo taxón
- Identificación a nivel de género: se han seleccionado 2, 3 o 4 taxones pertenecientes al mismo género.
- Baja discriminación: se han seleccionado 2, 3 o 4 taxones pertenecientes a diferentes géneros.
- La identificación es "no fiable" si la suma de %id propuestos es inferior a 80.0.

- El perfil es "dudoso" si entre las selecciones propuestas figura un taxón con una o varias pruebas en contra (ejemplo, con una frecuencia de 0 o 100%). Esto puede deberse a perfiles atípicos o a un error de lectura o código.

- El perfil es "inaceptable" si el número de selecciones propuestas es 0, todas las frecuencias brutas son inferiores a un valor umbral. El perfil se aleja de todos los taxones de la base de datos.

El perfil puede estar acompañado de la siguiente información:

Pruebas en contra de la identificación

Las pruebas en contra, si las hay, seguidas del porcentaje de positividad (ej. prueba con una frecuencia de la reacción observada < 0.25).

Pruebas complementarias

En caso de identificación a nivel de especie, de género o baja discriminación, se proponen pruebas complementarias para completar la identificación. Estas pruebas están extraídas de la literatura.

Notas Comentarios asociados con especies. Esta nota aparece si la especie es identificada como elección significativa (API web, 2016).



Imagen 4. Aspecto de las cúpulas en la prueba comercial API 50 CHL. a la derecha se pueden observar los colores que interpretan la prueba como positiva y a la izquierda se identifican los colores de la prueba negativa (Api web 2016)

1.5 La rata de vida libre como modelo biológico.

La rata de laboratorio es la forma domesticada de la especie *Rattus norvegicus* o rata noruega marrón. Aunque el género *Rattus* contiene 66 especies, las más conocidas especies de *Rattus rattus* o rata negra y la *Rattus norvegicus* o rata noruega. Las dos especies difieren considerablemente en su hábitat, comportamiento y ecología (Patrick & Villano S., 2012).

Los usos de las ratas silvestres en la investigación biomédica se extienden generalmente en el espectro de síndromes de enfermedades humanas y animales, incluyendo la oncología, virología, parasitología y enfermedades metabólicas.

Hay también un aspecto importante en las ratas silvestres al estudiar cómo su proximidad con la vida cotidiana de los humanos y sus actividades, sus impactos a la humanidad, la transmisión de enfermedades zoonóticas tales como hantavirus, fiebres hemorrágicas virales y bacterianas. Las ratas silvestres son los reservorios de varias enfermedades mortales que afectan a la salud humana y animal. Por lo tanto, el control de plagas y la contaminación del medio ambiente son una parte significativa de muchas revisiones de la literatura sobre las ratas silvestres (Sharp & Villano S., 2012).

La rata de Noruega en general es capaz de sobrevivir en una amplia variedad de hábitats y condiciones climáticas. Las especies se benefician en gran medida de la presencia de los seres humanos y pueden vivir en edificios, zonas agrícolas, sistemas de alcantarillado y en los vertederos. En la naturaleza, sin embargo, prefiere vivir en madrigueras que normalmente se encuentra cerca del agua. El éxito mundial de la rata de Noruega se debe en parte al hecho de que la especie es omnívora, que tiene una notable capacidad para equilibrar su ingesta de nutrientes en una amplia gama de condiciones de alimentación (Sharp & Villano S., 2012).

Los estudios que han comparado los comportamientos neofóbicos y exploratorios de ratas silvestres y domesticadas han encontrado que la cepa

silvestre es mucho más neofóbica que la rata domesticada; de hecho, esta última es a menudo considerada como neofílica.

Se ha argumentado que el proceso de domesticación de alguna manera ha debilitado respuestas neofóbicas naturales de la rata de laboratorio. Sin embargo, las especies de roedores salvajes que no son comensales también muestran sólo neofobia débil hacia los nuevos alimentos y objetos que sugiere que el aumento de las reacciones de *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus* pueden haber evolucionado como respuesta a control humano intenso. Cualquiera que sea la razón de las diferencias, es evidente que las conclusiones sobre el comportamiento de ratas silvestres hacia los nuevos alimentos y objetos, no deben derivar únicamente de los estudios de ratas de laboratorio (Inglis I., y otros, 1996).

Se ha sugerido que la aparición de la neofobia alimentaria fue influenciada por los intentos humanos de erradicar a las ratas del entorno humano. Las especies de ratas que debido a la actividad humana tienen independencia en su dieta, no han estado expuestas a medidas de control poblacional, tales como venenos, no presentan reacciones neofóbicas a nuevos alimentos. Además, la neofobia alimenticia no parece producirse en ratas que habitan en vertederos, donde el medio ambiente está sujeto a cambios constantes y novedad (Modlinska & Stryjek, 2016).

2. Justificación.

El uso cotidiano de la rata como animal de experimentación en un ambiente controlado, ha permitido conocer diversos aspectos de estos individuos, entre los que se encuentra la microbiota intestinal. Sin embargo, en la mayoría de los estudios enfocados a la especie *Rattus norvegicus* en su ambiente natural, están enfocados al impacto económico, ambiental y epidemiológico (Lobos, Ferres, & Palma R., 2005). Por lo tanto, es importante valorar los efectos que pudiera tener el medio ambiente sobre la población de BAL en el tracto gastrointestinal de animales sometidos a condiciones altamente demandantes como son el hábitat de las ratas de vida libre contra las condiciones controladas que tiene un laboratorio de investigación.

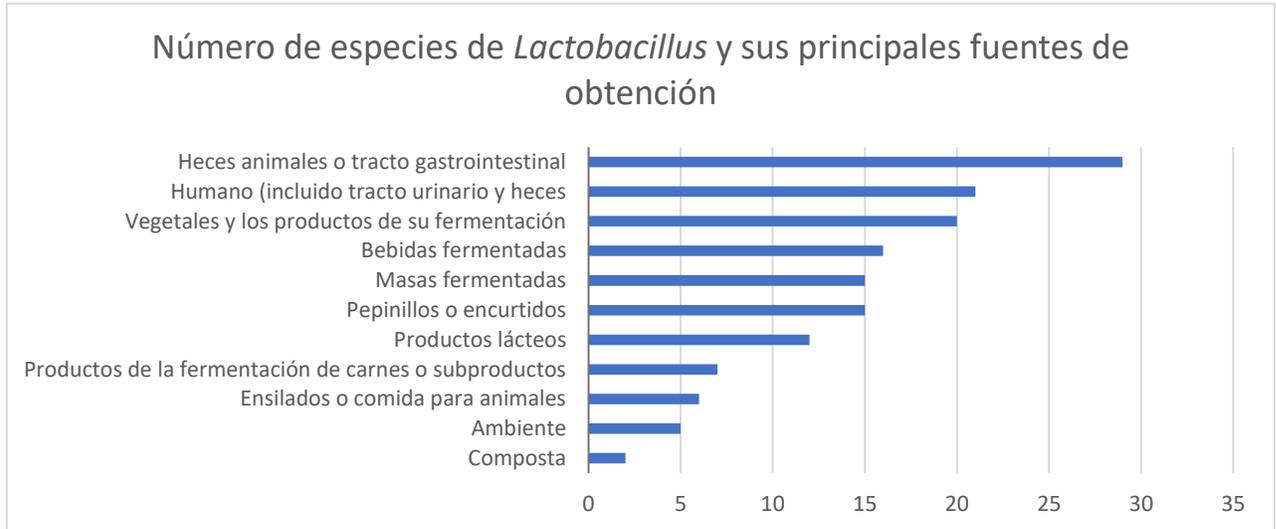
Dada la estructura social de las ratas, los hábitats que han colonizado en los asentamientos humanos y su exposición a ciertos agentes medioambientales y patógenos como *E. coli.*, *Salmonella sp.* entre otras, han generado resistencia a lo largo de la exposición prolongada de esta especie a su entorno. Se ha observado una mayor resistencia en las ratas silvestres que en las ratas comúnmente utilizadas en la investigación, debido posiblemente a que los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal de las ratas de vida libre estén adaptados a un medio agreste, produciendo sustancias que limiten o impidan el crecimiento de agentes patógenos y por ende favorezcan una adecuada homeostasis en los huéspedes. Permitiendo así, el desarrollo de nuevos agentes probióticos que beneficien a la industria pecuaria en su búsqueda de alternativas eficaces y costeables para reducir las enfermedades y por lo tanto el uso de antibióticos, en la producción de proteína de origen animal de calidad.

2.1 La investigación de la microbiota de animales de vida libre y el efecto del medio ambiente.

Hasta la fecha se han aislado y validado en publicaciones 154 especies de *Lactobacillus* de diferentes fuentes. La mayoría de estas especies se pueden clasificar dentro de 11 fuentes mayores (Heping & Yimin , 2014). La generalidad de

las especies que son aisladas, se obtienen del tracto gastrointestinal y heces de animales y humanos como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Principales fuentes de obtención de BAL.



La principal fuente de BAL proviene de TGI de los animales tomado de (Heping & Yimin , 2014)

La microbiota intestinal en los mamíferos y el rol en la evolución y ecología es un área de reciente interés. En diversos estudios se ha comparado a los animales nacidos en vida libre y en cautiverio encontrando diferencias significativas en la composición de la microbiota de estos (Kohl & Dearing, 2014).

En la actualidad se han prohibido en muchos países y es tendencia en otros tantos, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la industria pecuaria y el tratamiento de enfermedades. Por lo que se está investigando la posibilidad de utilizar aditivos alternativos en lugar de antibióticos. Los probióticos son una de estas alternativas (Mercenier, Pavan, & Pot , 2003).

3. Hipótesis.

Debido a las condiciones sanitarias y etológicas de las ratas de vida libre, si se aíslan bacterias ácido lácticas de su tracto digestivo entonces, se obtendrán BAL con potencial probiótico.

4. Objetivo general.

Aislar e identificar BAL de tracto gastrointestinal de *Rattus norvegicus* de vida libre y caracterizar microorganismos con potencial probiótico.

5. Objetivos particulares.

- Recolectar especímenes de *Rattus norvegicus* en las inmediaciones de asentamientos humanos e instalaciones donde se procesan alimentos de origen pecuario.
- Aislar e identificar BAL del tracto gastrointestinal de ratas de vida libre a través del sistema de identificación bacteriológica API 50 CHL[®].
- Comparar mediante pruebas bioquímicas las características metabólicas de BAL.
- Identificar BAL con potencial probiótico en bases de datos de referencia.
- Realizar una investigación documental sobre las BAL con potencial probiótico, para así poder comparar los resultados obtenidos.

6. Metodología

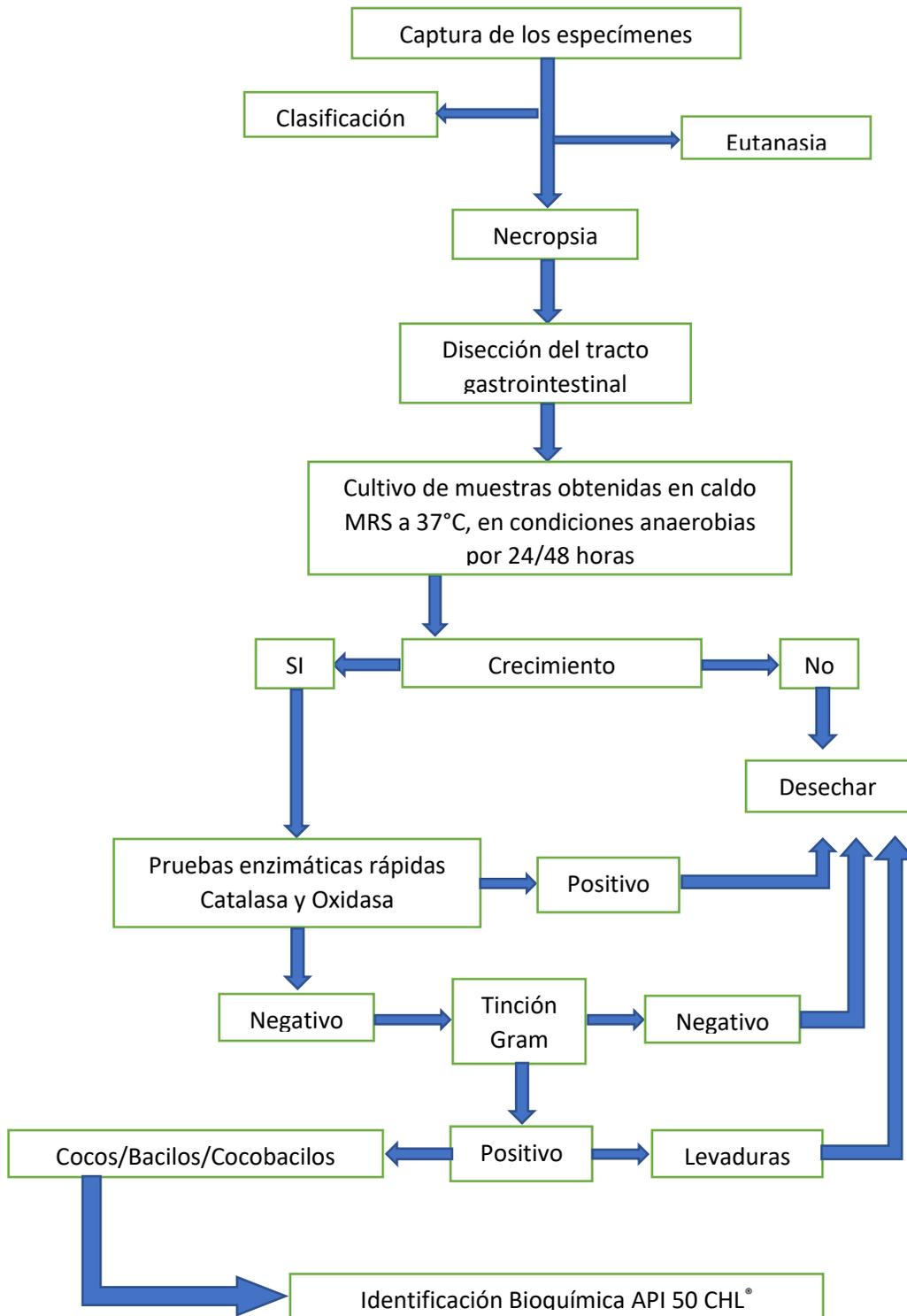


Imagen 5. Diagrama de decisión en la metodología de aislamiento e identificación bioquímica de BAL

6.1 Animales y sitio de estudio.

Se capturaron 2 ratas colocando jaulas trampa de 320 mm x 210 mm x 130 mm, ubicadas en las inmediaciones de asentamientos humanos. Una de éstas se colocó fuera del taller de lácteos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y la otra en una planta de embutidos particular. Dichas jaulas permanecieron en el sitio de recolección por 24 hrs. aproximadamente.

Una vez capturadas las ratas fueron colocadas en jaulas individuales, para evitar estrés. Se registró el sexo, peso, tamaño y se especificó el sitio donde fueron capturadas. Finalmente se aplicó la eutanasia a ambos animales, colocándolas en una cámara con CO₂, de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

6.1.2 Selección y recolección de muestras.

A las ratas se les realizó la técnica de necropsia para exponer y extraer el tracto digestivo, obteniendo así, las muestras del mismo desde el esófago hasta el recto.

Posteriormente, se cortaron porciones de aproximadamente 2 cm de largo de todo el largo del tracto digestivo, pinzando ambos extremos para evitar que entrara aire a la luz del mismo. Inmediatamente después, las porciones obtenidas fueron colocadas en tubos cónicos de 15 ml con caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) los cuales se incubaron a una temperatura de 37°C en una estufa bacteriológica bajo un ambiente microaerófilico con gas pack de liberación de CO₂ durante 48-72 hrs (Vázquez , Lopretti , & Zunino, 2007).

6.2 Obtención y selección de microorganismos.

Una vez concluido el periodo de incubación, se inculó el sedimento de los tubos Falcon® en cajas de Petri con Agar MRS mediante una técnica de sembrado por agotamiento en un ambiente microaerófilico a una temperatura de 37°C durante 48 hrs (Souza M., y otros, 2007).

Después de ese periodo se reportaron las características morfológicas de las colonias presentes en las cajas de Petri (medida de la colonia, forma, borde, elevación de la colonia, consistencia, textura, superficie y pigmentación).

Para preservar los cultivos, éstos se inocularon en un tubo Eppendorf con medio líquido MRS hasta su crecimiento y posteriormente se agregó glicerol en una proporción 50:50 para su conservación en congelación.

6.2.1 Aislamiento y purificación de los microorganismos.

A cada una de las colonias aisladas se les realizó una tinción de Gram para establecer el fenotipo. Posteriormente las cepas fueron aisladas tanto en medio líquido (Caldo MRS) como en cajas de Petri con medio MRS en un ambiente microaerófilico durante 48 hrs, a una temperatura de 37°C hasta lograr un solo tipo de colonia por placa (Souza M., y otros, 2007).

Tinción de Gram

Se inoculó una pequeña cantidad de la colonia sobre una gota de agua estéril puesta en el portaobjetos, posteriormente fue esparcida y pasada por la llama del mechero hasta fijar la muestra.

- Se fijó el frotis a través del fuego de un mechero.
- Se cubrió la superficie del frotis con una solución de cristal violeta durante un minuto y posteriormente se lavó con agua destilada.
- Se cubrió el frotis con solución de yodo lugól durante un minuto, posteriormente se lavó con agua corriente.
- El frotis fue decolorado con alcohol acetona hasta ya no observar ningún color en el frotis, inmediatamente se lavó con agua corriente.
- Se utilizó en el frotis colorante de safranina manteniendo por 30 segundos para posteriormente lavarlo con agua corriente.
- Se examinó el frotis al microscopio.

6.3 Pruebas bioquímicas.

6.3.1 Prueba rápida catalasa.

Para realizar la prueba, de una cepa previamente purificada, se tomó una colonia con un palillo de madera estéril y se colocó en un portaobjetos, posteriormente se aplicó una gota de agua oxigenada a 10 volúmenes de oxígeno directamente en la colonia y se documentó si ésta producía burbujeo o no; descartando las muestras que fueron positivas a la prueba.

6.3.2 Prueba rápida de oxidasa

Se tomó una colonia con un palillo de madera estéril, a continuación, la muestra se colocó en la punta de papel filtro de la tira reactiva (Becton, Dickinson and Company®). El papel filtro impregnado con el reactivo se dejó secar por completo; la prueba se realizó mediante la colocación de una asada de la siembra de bacterias de una placa no selectiva sobre el papel utilizando un asa de platino o aplicador de madera y luego se examinó el papel para observar o no el desarrollo de un color violeta o morado inmediatamente o hasta 30 segundos después (reacción positiva).

Si no hubo cambio de color o hay un ligero cambio de color de un rosa claro / violeta claro después de 30 segundos, se indicó un resultado negativo.

Las asas de acero, asas de nicromo o de alambre que contienen hierro pueden dar una reacción falsa positiva y reacciones de organismos oxidasa positivos débiles, por ejemplo, *Pasteurella* puede ser inexacta.

6.3.3 Prueba bioquímica API 50 CHL®.

Una vez purificada la colonia y realizadas las pruebas enzimáticas rápidas se sembró en 10 ml de medio líquido MRS el cual fue incubado a 37°C durante 24 hrs. El sedimento de estos cultivos fue centrifugado a 10,000 rpm durante 5 min; la pastilla resultante, se resuspendió en medio de transporte API 50 CHL®

La bacteria en solución se colocó en cada uno de los 50 pocillos de la tira API 50 CHL[®] conforme a las recomendaciones del fabricante y se cubrió con aceite mineral estéril. Después 48 hrs. de incubación, los resultados fueron interpretados en la base de datos proporcionado por el fabricante y con la información obtenida se analizaron los resultados.

7. Resultados.

Se obtuvieron 112 muestras a partir de diferentes porciones del tracto gastrointestinal de dos ratas de vida libre. A éstas se les asignó un número consecutivo, registrando su origen. Una vez purificadas las muestras se realizaron las tipificaciones morfológicas respectivas, tinciones de Gram y pruebas enzimáticas rápidas, descartando así, las cepas que no cumplían con las pruebas especificadas.

Una vez finalizado el procedimiento experimental, se determinó la presencia de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) en el tracto digestivo de los animales de experimentación.

7.1 Crecimiento en medio líquido MRS.

Al cabo de 24 hrs de incubación en microtubos de 1.5ml se observó una marcada turbidez en el fondo de los mismos, como se observa en la imagen 6, lo cual indicó crecimiento bacteriano.

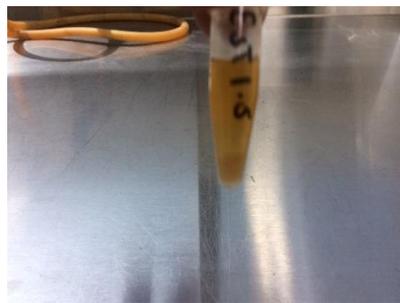


Imagen 6. Crecimiento bacteriano en el fondo de un microtubo, de aproximadamente 5 mm

7.2 Crecimiento en agar MRS.

Una vez sembradas en las cajas de Petri y pasando 24 hrs. de la incubación se pudo observar el crecimiento y determinar mediante la morfología de la colonia las siguientes características relevantes.

Colonias blancas con apariencia de cristal, pequeñas de aproximadamente 1-3 mm de diámetro, con bordes lisos, bien definidos y una superficie convexa.

A la tinción de Gram se observaron bacilos cortos y algunos cocobacilos Gram positivos agrupados en pares o cadenas cortas.

La imagen 7 ilustra los tipos de crecimiento bacteriano macro y microscópicamente.

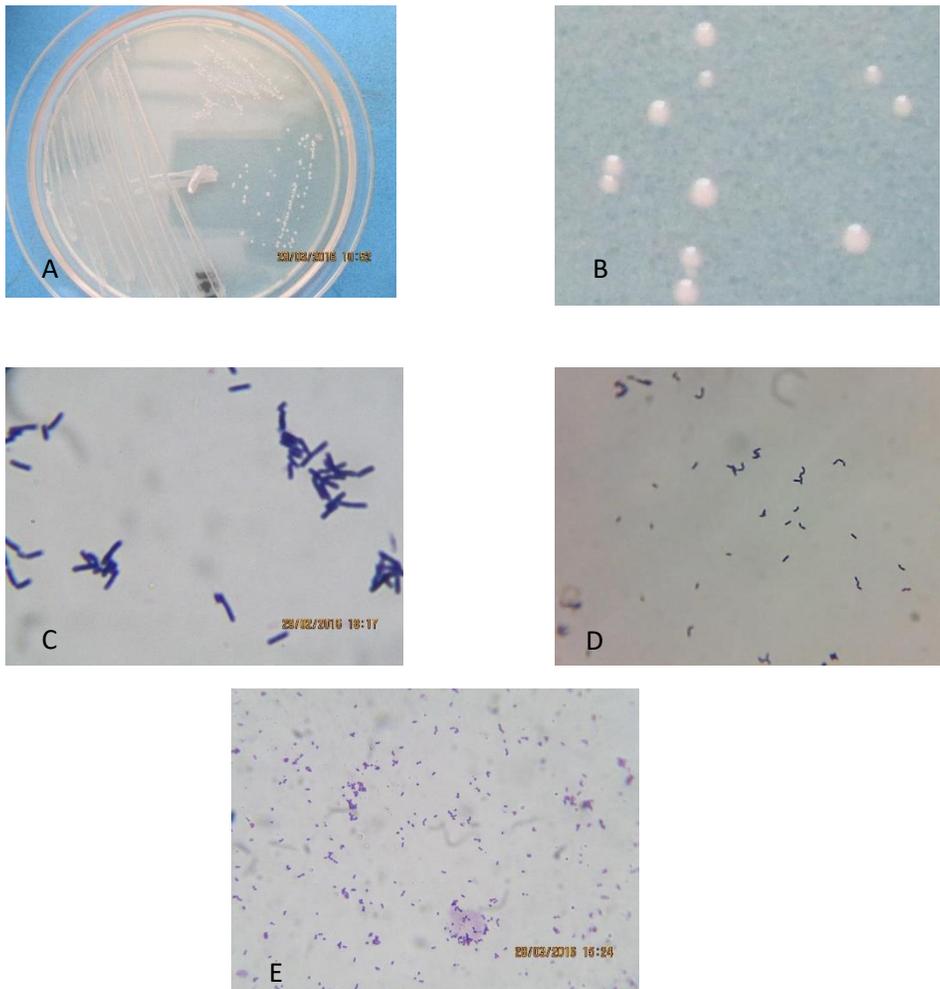


Imagen 7. Morfología macroscópica y microscópica de las colonias aisladas.

A: Las colonias se observan pequeñas de aproximadamente 3mm de diámetro, redondas y de bordes uniformes. B: Se observa apariencia macroscópica de colonias. Estructuras redondas, blancas de textura suave y uniforme, convexas. C: se observan bacilos cortos con apariencia de "letras chinas" característica de algunas cepas de *Lactobacillus*. D: Se aprecian bacilos cortos y pequeños con una apariencia ligeramente curvada, muy pocos de ellos agrupados. E: Pocas colonias observadas se aprecian con forma de cocos agrupados generalmente en pares o cadenas cortas.

7.3 Registro de las cepas purificadas

Del total de 112 muestras se separaron y aislaron 8 muestras con potencial a ser identificadas mediante el sistema API 50 CHL[®] que corresponden al 7.1% de las muestras aisladas.

A continuación, en la tabla 4 se describen las características principales de las cepas aisladas.

Tabla 5. Se describen las principales características y origen de las cepas consideradas para su identificación bioquímica.

NÚMERO DE CEPA	ORIGEN DE LA CEPA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	PRUEBA DE CATALASA	PRUEBA DE OXIDASA	MORFOLOGÍA DE LA COLONIA
33	Intestino delgado	Bacilos cortos en cadenas cortas	Negativo	Negativo	Colonia redonda blanca pequeña con bordes lisos y superficie convexa
38	Intestino delgado	Cocobacilos abundantes agrupados en pares	Negativo	Negativo	Colonia redonda color crema pequeña con bordes lisos y superficie convexa
45	Intestino grueso	Bacilos en cadenas cortas	Negativo	Negativo	Colonia redonda blanca pequeña con bordes lisos y superficie convexa
74	Intestino grueso	Bacilos agrupados en pares	Negativo	Negativo	Colonia redonda blanca pequeña con bordes lisos y superficie convexa
76	Intestino grueso	Bacilos cortos en cadenas cortas y agrupados en pares	Negativo	Negativo	Colonia redonda blanca pequeña con bordes lisos y superficie convexa
77	Intestino grueso	Bacilos cortos agrupados en pares	Negativo	Negativo	Colonia redonda blanca pequeña con bordes lisos y superficie convexa
78	Intestino grueso	Bacilos agrupados en pares	Negativo	Negativo	Colonia redonda blanca pequeña con bordes lisos y superficie convexa
98	Intestino grueso	Bacilos agrupados en pares	Negativo	Negativo	Colonia redonda blanca pequeña con bordes lisos y superficie convexa

7.4 Identificación bioquímica con test comercial API 50 CHL®

Una vez registradas las muestras se procedió a realizar las pruebas bioquímicas con la prueba comercial, tras la incubación de 48 horas se obtuvieron los siguientes resultados comparándolos con la base de datos y la bibliografía.

Tabla 6. Identificación bioquímica de las diferentes cepas pudiendo observar algunas similitudes en varias pruebas como D-Glucosa, D-Fructosa, D-celobiosa y D-Sacarosa.

Azúcar	Cepa numero							
	33	38	45	74	76	77	78	98
Control negativo	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	+	-	+	-	-	-	-
Eritritol	+	+	-	-	-	-	-	-
D-Arabinosa	-	+	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	+	-	+	-	+	-	+	+
D-Ribosa	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-βD-Xilopiranosida	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactosa	+	+	-	+	-	-	-	-
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mamnosa	+	+	+	+	+	+	+	-
L-Sorbosa	+	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Manitol	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	+	-	-	-	-	-	-	-
Metil-αD-Manopiranosida	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-αD-Glucopiranosida	+	-	-	-	-	-	-	-
N-acetil Glucosamina	-	+	-	+	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutina	+	-	-	-	-	-	-	-
Esculina citrato férrico	-	+	-	-	+	+	+	-
Salicina	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltosa	+	+	+	+	+	-	+	-
D-Lactosa	-	+	-	+	-	-	-	-
D-Melibiosa	+	-	-	-	-	-	-	-

D-Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalosa	-	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitosa	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinosa	+	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	+	+	+	+	-	-	+	-
Glicógeno	-	+	-	-	+	+	+	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiosa	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Turanosa	-	+	-	+	-	-	-	-
D-Lixosa	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Tagatosa	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucosa	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitól	+	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato potásico	-	+	+	-	+	+	-	-
2-Cetogluconato potásico	+	-	-	-	-	-	-	-
5-Cetogluconato potásico	+	-	-	-	-	-	-	-

Una vez comparados los resultados de la lectura de las muestras con la base de datos API web[®] se pudo determinar la siguiente información mostrada en tabla 6.

Tabla 7. Porcentaje de identificación destacando que todas las cepas consideradas se identificaron con una precisión adecuada para fines diagnósticos

No. de cepa	Taxón significativo	Porcentaje de identificación
33	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	Buena identificación en el género 83.6 %
38	<i>Aerococcus viridans</i>	Excelente identificación 99.9 %
45	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	Identificación aceptable 81.8 %
74	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	Buena identificación 98.1 %
76	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	Buena identificación 97.9 %
77	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	Identificación aceptable 81.8 %
78	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	Buena identificación 99.0 %
98	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	Buena identificación 99.6 %

- 7 de las 8 muestras (33,45,74,76,77,78,98) es decir el 87.5 %. Fueron identificados como *L. acidophilus* con una identificación de valor diagnóstico.
- 1 muestra (38) es decir el 12.5 %. Fue *A. viridans* con una identificación muy cercana al 100 %.
- *A. viridans* ha sido hallado solamente en intestino delgado.
- El 25% de las muestras se aislaron principalmente del intestino delgado, mientras que el resto se aislaron en intestino grueso.

8. Discusión.

Brooks y otros concluyeron que los modelos animales han sido y seguirán siendo piezas fundamentales en el avance del conocimiento de la microbiota y su interacción con el tracto gastrointestinal (TGI) del huésped. Mucho de nuestro conocimiento de la relación y estructura de la microbiota, se ha basado en el análisis de las heces. Las heces abarcan la diversidad microbiológica del TGI completo, esto se debe a que el bolo fecal se mueve a lo largo del intestino y sufre cambios continuos de sustrato que afectan su composición, sobre todo en las zonas más proximales del intestino. Hay una diferente distribución de especies bacterianas en el lumen intestinal y estas comunidades están asociadas a varias superficies presentes en el intestino. Finalmente, las heces contienen grandes cantidades de bacterias dañadas o muertas (Brooks, Johnson, Inglis, Uweira, & Kalmokoff, 2011).

En ese sentido, en el presente trabajo realizamos una serie de aislamientos a partir de TGI de *Rattus norvegicus* de campo. El muestreo en este trabajo consistió en tomar secciones del TGI desde el esófago hasta el recto incluyendo las heces; de estas porciones, tanto las heces como esófago y estómago mostraron un escaso o nulo crecimiento de bacterias Gram positivas, catalasa y oxidasa negativos, así como abundante crecimiento de levaduras por lo que no fueron contempladas en este trabajo. A partir de las muestras de heces, de igual manera se aislaron cantidades incontables de colonias lo que dificultó su separación y purificación.

De acuerdo con los trabajos realizados en 2011 por Bleich y otros, se describió como el análisis de la microbiota de los roedores comienza con el cultivo de bacterias aerobias o anaerobias facultativas extraídas del tracto gastrointestinal, dando pauta a estudios posteriores. Desde la década de los cincuentas, científicos como Schaedler y Gordon fueron capaces de cultivar microorganismos anaerobios, revelando que estos representan el 99% de las bacterias en el intestino. Únicamente del 10 al 20% de estas pueden ser cultivadas por técnicas tradicionales (Bleich & Hansen, 2011). Dicho esto, en el presente trabajo empleamos microanaerobiosis para realizar los aislamientos bacterianos, obteniendo en su totalidad bacilos cortos

en formaciones sencillas o cadenas cortas. Al no encontrarse ninguna otra forma bacteriana se sugiere que la metodología de cultivo, aislamiento y purificación de BAL empleada en este trabajo, no permitieron el crecimiento de otras especies como las bifidobacterias. Sin embargo, no se puede descartar su presencia en el TGI de los especímenes estudiados.

Ley, *et al.*, (2008) fueron los primeros en comparar la microbiota fecal de numerosos animales, sin embargo, los ratones no fueron incluidos en este estudio. Trabajos posteriores revelaron altas similitudes entre la microbiota de estos y la humana (Clavel, Lagkouvardos, Blaut, & Stecher, 2016). En este trabajo, los aislamientos de microorganismos se realizaron en una especie no convencional, como lo es *Rattus norvegicus* que históricamente se ha estudiado desde un enfoque epidemiológico, ya que esta especie es tomada en cuenta como una plaga. El presente trabajo, se consideró la capacidad de adaptación y colonización de *Rattus norvegicus* en casi todos los nichos medio ambientales, así como su resistencia a un entorno altamente contaminado y agreste, como en el que se desarrolla estos animales en los asentamientos humanos actuales (desagües, alcantarillas y zonas contaminadas) considerando esta situación, como una característica benéfica a explotar para la investigación en salud animal y humana.

Buddington y colaboradores (2009) demostraron que las bacterias que colonizan el TGI son adquiridas por los neonatos a partir de diversas fuentes como, la vagina, TGI, glándula mamaria y piel de las madres; así como del medioambiente que los rodea. La posibilidad de transferencia materna de BAL a los neonatos, es sustentada por la colonización del intestino del neonato por bifidobacterias y lactobacilos del digestivo de las madres (Buddington, Williams, Kostek, Buddington, & Kullen, 2009). Debido a la convivencia estrecha de esta especie con los humanos, en este trabajo se determinó el importante papel que juega el medio ambiente en el que las ratas se desenvuelven, el cual a su vez determina la microbiota que radica en su TGI de estos animales. Esta situación le crea ventaja a la rata, ya que adquiere resistencia al entrar en contacto con ciertos microorganismos patógenos para posteriormente colonizar a los neonatos o animales adultos, confiriéndoles así una

resistencia mayor que a sus predecesores. Cabe mencionar que la conducta neofóbica o neofílica de las ratas influye en las especies bacterianas que habitan su TGI.

Killer y otros en 2014 lograron en identificar en el tracto gastrointestinal de roedores, a partir de pruebas bioquímicas API 50 CHL y secuenciación del fragmento 16S rRNA del genoma de estas bacterias, una nueva especie denominada *Lactobacillus rodentium*, que está ampliamente emparentada con el complejo *L. acidophilus* teniendo como principales características a células Gram positivas, oxidasa negativa, con una morfología típica de lactobacilo: bastones regulares de 0.8-1.2 μm de diámetro y 2.1-8.6 μm de largo creciendo de forma independiente o en pares; con un crecimiento óptimo en agar MRS en condiciones microaerofílicas a temperaturas entre 15-46°C y un pH de 5-9.5. Desarrolla colonias con un diámetro de 0.46 a 0.68 mm, color crema con forma de disco y bordes lisos bien definidos (Killer , y otros, 2014). El presente trabajo de investigación, empleamos la metodología descrita por Killer en 2014, y encontramos BAL con características similares a las reportadas por el autor. Considerando que *L. acidophilus* forma un complejo que abarca múltiples especies de BAL, estudios complementarios podrían mejorar y hacer más específica la identificación de una especie o subespecie dentro del mismo.

La colonización de *Lactobacillus* en el intestino es normalmente inofensiva, sintetizando vitaminas, ayudando en la digestión del alimento y la absorción de nutrientes, promoviendo el metabolismo primario del huésped y aumentando la resistencia a otras bacterias con la producción del ácido láctico. Debido a las diferencias en las especies, *Lactobacillus* puede tener diferentes efectos fisiológicos el cual sólo es superado en importancia por *Bifidobacterium* (Heping & Yimin , 2014).

La cinética de supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* como cepas micro ecológicas es muy alta cuando han sido probadas en presencia de ácido clorhídrico, pepsina, sales biliares, tripsina y algunos antibióticos mediante la simulación del ambiente gastrointestinal. Según algunos experimentos, los conteos bacterianos de

L. acidophilus Ind-1 y *L. acidophilus* mediante el método de recuento de colonias de placas, puede estar por encima de 10^7 UFC / ml a pH 1,50-4,50. (Ruixiang, Haiping, Shengyang, & Gang, 2012). El ambiente ácido del estómago y la presencia de bilis en el duodeno de las diferentes especies animales, son factores que afectan la viabilidad de las bacterias potencialmente probióticas, después de su administración vía oral. Se cree que especialmente la acidez es el factor más detrimental en el crecimiento y viabilidad de los *lactobacilos* (Turková, y otros, 2013).

En el presente trabajo, no se consideró la evaluación probiótica de las cepas aisladas e identificadas ya que este punto es parte de otro proyecto de investigación.

Shokryazzdan y otros en 2014 concluyeron mediante estudios *in vitro* que 9 cepas de *Lactobacillus* fueron capaces de sobrevivir en TGI de humanos adhiriéndose a células epiteliales, aunque ninguna de estas cepas fue resistente a los antibióticos, estas mostraron una fuerte actividad antagonista contra numerosos patógenos. Por lo que se consideraron con un buen potencial probiótico (Shokryazzdan, y otros 2014).

Turkova y otros en 2013 determinaron que *Lactobacillus acidophilus* CCDM 109, *L. gasseri* CCDM 332 y *L. gasseri* CCDM 335, tuvieron un mayor desarrollo en condiciones simuladas al tracto gastrointestinal.

Chang y otros en 2009 concluyeron que grupos de ratas alimentados con probióticos mostraron un aumento en el peso y largo de colon al compararlos con los ejemplares del grupo control. También observaron que cambió la microbiota del colon de las ratas alimentadas con BAL. Por otro lado, se observó que *L. acidophilus* redujo la colonización de *E. coli* y bacterias anaerobias en el intestino grueso, por la colonización de BAL en el mismo reduciendo a su vez el pH del tracto gastrointestinal.

Los estudios anteriormente mencionados sustentan la idea de que *L. acidophilus* es un potente probiótico, con una buena capacidad de tolerancia al TGI de múltiples especies incluyendo la humana, validando incluso su uso en roedores

aunque de manera experimental. El presente trabajo se debe complementar con pruebas secundarias y secuenciación genética para así demostrar que las BAL obtenidas del TGI de *Rattus norvegicus* puedan tener un mayor potencial que algunas otras especies.

Los resultados de múltiples experimentos parecen apoyar la hipótesis de que las ratas que habitan un ambiente altamente cambiante no exhiben neofobia alimentaria y por lo tanto tienen una mayor cantidad de elementos a los que exponerse, al contrario de los animales que presentan conductas neofóbicas, lo que podría favorecer que las ratas de vida libre estén pobladas por una microbiota intestinal con mayor resistencia y que esta a su vez pueda tener un mayor potencial probiótico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Taylor y Thomas en 2012, los cuales no observaron neofobia alimentaria en una colonia de ratas que no estuvieron expuestas al control de plagas (Modlinska & Stryjek, 2016).

9. Conclusiones.

Se aislaron de intestino grueso de *Rattus norvegicus*, 8 cepas de BAL, identificando en 2 especies con potencial probiótico (*L. acidophilus* y *A. viridans*).

- *L. acidophilus* es ampliamente estudiado y utilizado con fines probióticos.
- *A. viridans* es comúnmente relacionado con agentes medioambientales o con una acción patogénica en la mayoría de las especies estudiadas.
- El sistema comercial de identificación bioquímica API 50 CHL, es una herramienta indispensable que facilita el diagnóstico primario de BAL y por ende la reducción de costos en un tiempo estandarizado, reduciendo el error humano.

9.1. Perspectivas a futuro.

Si bien, es necesario realizar estudios posteriores como la secuenciación del fragmento 16S rRNA del genoma de BAL, este tipo de pruebas permite realizar una identificación posterior más certera, a su vez adicionando pruebas secundarias como tolerancia a los ácidos gástricos y jugos biliares, tolerancia a los antibióticos y fijación a la pared intestinal; este tipo de trabajos serian adecuadamente complementados.

Bibliografía.

- Aarestrup F., M., Bager, F., Jensen N., E., Madsen , M., Meyling , A., & Wegner H., C. (1998). Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. *APMIS*, 606-622.
- Adams, R. M., & Moss, M. O. (2008). *Food Microbiology* (3a ed ed.). Cambridge Reino Unido: RSC Publishing.
- API web*. (2016). Retrieved Abril 21, 2016, from https://apiweb.biomerieux.com/jsp/help_ident/index
- Bleich, A., & Hansen, A. K. (2011). Time to include the gut microbiota in the hygienic standarisation of laboratory rodents. *Comparative Immunology, Microbiology and infectious Diseases*, 81-92.
- Bolado, M., & Acedo F., E. (2009). Differentiation of porcine wild-type lactobacilli strains, with ERIC-PCR and PFGE band patterns included in poluphasic taxonomy . *Czech J Anim Sci*, 7, 307-314.
- Brooks, S. J., Johnson, J. G., Inglis, G., Uweira, R. E., & Kalmokoff, M. (2011). *Gut Microbiology*. Elsevier .
- Buddington , R. K., Williams, C. H., Kostek, B. M., Buddington, K. K., & Kullen, M. J. (2009). Maternal-to-infant Transmission of Probiotics: Concept Validation in Mice,Rats, and Pigs. *Neonatology*, 250-256.
- Caballero C., Y. (2014). Aislamiento e identificación de Bacterias Ácido Lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein. *Colegio de postgraduados UACH* .
- Cebra J., J., Perival S., B., Lee , G., Lee , F., & Shroff K., F. (1998). Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue: The roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol*, 6, 13-18.
- Chen, C. C., Chiu, H. C., Lin, Y. T., Shi, N. H., & Walker, A. W. (2009). Effect of Probiotics Lactobacillus acidophilus on Citrobacter rodentium Colitis: The role of Dendritic Cells. *Pediatr Res.*, 169-175.
- Clavel, T., Lagkouvardos, I., Blaut, M., & Stecher, B. (2016). The mouse gut microbiome revisited: From complex diversity to model ecosystems. *International Journal of Medical Microbiology*, 316-327.
- Cutting S., M. (2011). Bacillus probiotics . *Food Microbiol*, 28(2), 214-220.
- Daeschel A., M. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives . *Food Technology*, 43, 164-167.
- FAO. (2006). Probióticos en los alimentos, propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación . Roma Italia: FAO.

- Figuroa G., I. (2007). Efecto de prebióticos en el crecimiento de *Lactobacillus casei shirioti* y *Escherichia coli* en un sistema de simulación del tracto gastrointestinal. (*Maestría en Biotecnología*). UAM unidad Iztapalapa .
- García G., A., Pérez M., R., Díaz C., M., & Acedo F., E. (2004). Resistance of Enterococcus strains isolated from pigs to gastrointestinal tract and antagonistic effect against *Escherichia coli*. *Rev Lat de Microbiol*, 46(1-2), 5-11.
- García, Y., Elias, A., Albelo, N., Herrera F., R., Núñez, O., & Dieppa, O. (2008). Crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación líquida de excretas de pollos de ceba para la obtención de probióticos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(2).
- Guarner, F., & Schaafsma G., J. (1998). Probiotics. *Food Microbiol*, 39, 237-238.
- Heping, Z., & Yimin , C. (2014). *Lactic Acid Bacteria fundamentals and practice* (1a ed ed.). Dordrecht Alemania: Springer.
- Ibarra D., M. (2013). Microencapsulación por aspersión y caracterización del probiotico *Lactobacillus acidophilus* adicionado en la aleboración de un panqué (Ingeniería en alimentos). *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM*.
- Inglis I., R., Shepherd D., S., Smith , P., Haynes P., J., Bull D., S., Cowan P., D., & Whitehead , D. (1996). Foraging behaviour of wild rats *Rattus norvegicus* towards new foods and bait containers. *Applied Animal Behaviour Science*, 47, 175-190.
- Jack R., W., Tagg J., R., & Ray , B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59, 171-200.
- Jay J., M., Rivers G., M., & Boisvet W., E. (1983). Antimicrobial properties of a-dicarbonyl and related compounds. *Journal of Food Protection* , 46, 325-329.
- Killer , J., Havlík, J., Vloková, E., Rada, V., Pechar, R., Benada O., . . . Sechovcová, H. (2014). *Lactobacillus rodentium* sp. nov., from the digestive tract of wild rodents. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1562-1533.
- Knchana, D., & Ramanathan, N. (2008). Antimicrobial activiti of lactic acid bacteria on food borne pathogenesis isolated from egg. *Plant Archives*, 8(1), 151-153.
- Kohl, K. D., & Dearing, D. M. (2014). Wild-caught rodents retain a majority of their natural gut microbiota upon entrance into captivity. *Enviromental microbiology reports*, 191-195.
- Kuipers, Gripe , B., & Kok , J. (2002). Courrent strategies for improving food bacteria. *Res Microbiol*, 151, 815-822.
- Lightfoot, N. F., & Maier , A. (1995). *Análisis microbiológico de alimentos y aguas directrices para el aseguramiento de la calidad*. Zaragoza España: ACRIBIA.
- Lilly D. , M., & Stillwell R., H. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.

- Lin, J. (2014). Antibiotic Growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers . *Front Microbiol.*
- Lindgren S., E., & Dobrogosz W., J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations . *FEMS Microbiology Reviews*(7), 149-163.
- Lobos, G., Ferres, M., & Palma R., E. (2005). Presencia de los géneros invasores Mus y Rattus en áreas naturales de Chile: Un riesgo ambiental y epidemiológico. *Rev Chil Hist Nat* , 78.
- M.-T. L. (2011). *Probiotics Biology. Genetics and Health Aspects*. Berlin: Springer.
- Mercenier, A., Pavan, S., & Pot , B. (2003). Probiotics as biotherapeutics agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Des*, 175-91.
- Metchnikoff, E. (1907). Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In the prolongation of life: Optimistic studies . *W. Heinneman*, 161-183.
- Min-Tze Liong. (2011). *Probiotics Biology, Genetics and Health Aspects* (primera ed.). Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- Modlinska, K., & Stryjek, R. (2016). Food Neophobia in Wild Rats (*Rattus norvegicus*) Inhabiting a Changeable Environment—A Field Study. *Public Library of Science*.
- Moussa S., D., & Malouin, F. (2014). Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Fron Microbiol*, 1-15.
- Nigatu, A., Ahrné, S., & Molin, G. (2000). Temperature-Dependent variation in API 50 CH fermentation profiles of *Lactobacillus* species . *Current Microbiology* , 41, 21-26.
- O'Hara A., M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO*, 688-693.
- O'Mahony, D., Barry K., B., MacSharry, J., Boileau, T., Sunvold , G., Reinhart , G., . . . O'Mahony, L. (2009). Portrait of a canine probiotic *Bifidobacterium*-from gut to gut. *Veterinary Microbiology*, 139, 106-112.
- Oh, S., Rheem , S., Sim, J., Kim , S., & Baek, Y. (1995). Optimizing conditios for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeastextract glucose medium by using response surface methodology . *Applied and Environmental Micobiology*, 3809-3814.
- P. D., Garrity, G. M., D. J., Krieg, N. R., W. L., Rainey, F. A., . . . Whitman, W. B. (2009). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology The Firmicutes* (Tercera ed.). New York USA: Springer.
- Patrick, S., & Villano S., J. (2012). Analysis of Behavior in Laboratory Rats. In I. Whishaw Q., V. Bergdall, & B. Klob (Eds.), *The laboratory rat* (pp. 191-218). Boca Raton Florida Estados Unidos de América: CRC.
- Randhawa, S., Brashears M., M., McMahon K., W., Fokar, M., & Karunasena, E. (2010). Comparison of phenotypic and genotypic methods used for the species identification of *Lactobacillus* NP51 and development of a strainspecific PCR assay. *Probiotics & Antimicro Prot*, 274-283.
- Rastal, R. A. (2003). Bacteria in the gut: Friends and Foes and How to Alter the Balance. *Waltham international Science Symposium*.

- Ruixiang, Z., Haiping, Z., Shengyang, N., & Gang, L. (2012). Tolerance of *Lactobacillus acidophilus* as Micro-ecological Strains by Simulating Gastrointestinal Environment. 259-266.
- Salvetti, E., Fondi, M., Fani, R., Torriani, S., & Felis G., E. (2013). Evolution of lactic acid bacteria in the order Lactobacillales as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *Syst Appl Microbiol*, 36(5), 291-305.
- Sarpe M., E. (1981). The genus *Lactobacillus*. *The prokariotes*, 2, 1653-1679.
- Saxelin, M. (2008). Probiotic formulations and applications, the current probiotics market and changes in the marketplace: a European perspective. *Clin Infect Dis*, 76-79.
- Sharp, P., & Villano S., J. (2012). Wild and Black Rats. In M. Hulin S., & R. Quinn (Eds.), *The laboratory rat* (pp. 865-882). Boca Raton Florida Estados Unidos de América: CRC.
- Shokryazdan, P., Sieo, C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alitheen, N. B., Jahromi, M. F., & Wan, Y. H. (2014). Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. *BioMed Research International*, 1-16.
- Souza M., R., Moreira J., L., Barbosa H., F., Cerqueira M., M., Nunes Á., C., & Nicoli J., R. (2007). Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from *Gallus gallus domesticus ceca*. *Veterinary Microbiol*, 120, 142-150.
- Stahl C., H. (2004). Alternatives to antibiotics in feed for pigs. *Pig News and Information*, 26(1), 9-15.
- Stanton T., B. (2013). A call of antibiotic alternatives research. *Trends Microbiol*, 21, 111-113.
- Tang, Y. W., & Stratton W., C. (2012). *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (3a ed ed.). New York Estados Unidos de America: Springer.
- Tisser, H. (1906). Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *CR Soc Biol*, 60, 359-361.
- Turková, K., Mavric, A., Narat, M., Rittich, B., Spanová, A., Roglej, I., & Bogovic, M. (2013). Evaluation of *Lactobacillus* strains for selected probiotic properties. *Folia Microbiol*, 261-267.
- Vázquez, S., Lopretti, M., & Zunino, P. (2007). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus* spp. para su uso como probióticos en la industria láctea. *Publ Anu Lab Tecnol del Uruguay*, 2, 12-14.

