



---

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Química

"Aislamiento e identificación de microorganismos con actividad probiótica, presentes en un preparado de suelo"

Tesis

Que para obtener el título de:

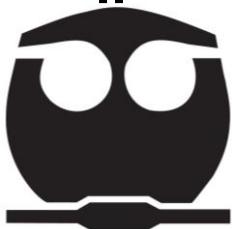
Química de Alimentos

Presenta:

Norma Roxana Delgadillo Valdés

Ciudad Universitaria, CD. MX.

2018





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Alejandro Camacho Cruz

VOCAL: Gloria Díaz Ruíz

SECRETARIO: Carolina Peña Montes

1er. SUPLENTE: Norma Angélica Camacho De la Rosa

2° SUPLENTE: Amelia Farrés González Saravia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 312, CONJUNTO E **"alimentos y biotecnología"**, FACULTAD DE  
QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra: Carolina Peña Montes

Dra: Amelia Farrés González Saravia

SUSTENTANTE:

Norma Roxana Delgadillo Valdés

## Agradecimientos

Al PAIP 50009095 por el financiamiento para realizar esta tesis.

Este proyecto fue presentado en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 21 al 26 de junio, 2015 en Guadalajara, Jalisco, México.



**XVI Congreso Nacional de  
Biotecnología y Bioingeniería**  
21 al 26 de Junio de 2015 Guadalajara, Jalisco, México.

Los sentimientos deben ser alumbrados por la inteligencia para convertirse en amor verdadero, y la inteligencia debe de ser alumbrada por los sentimientos para convertirse en sabiduría.

-Ami el niño de las estrellas, Enrique Barrios -

La inteligencia consiste no solo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica.

-Aristóteles-

Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución.

-Theodosius Dobzhansky-

## Contenido

Resumen.....	1
Capítulo I .....	2
1. Introducción.....	2
2. Marco Teórico.....	4
2.1 Definición de Suelo.....	4
2.2 Composición .....	4
2.3 Microbiología del suelo .....	4
2.4 Bacterias ácido lácticas .....	5
2.5 Clasificación de BAL.....	7
2.6 Distribución de las BAL .....	8
2.7 Las BAL en alimentos.....	8
2.8 BAL y su papel probiótico .....	10
2.9 Métodos empleados para la identificación de microorganismos.....	13
2.9.1 Técnica de vertido en placa .....	15
2.9.2 Análisis morfológico .....	15
2.9.3 Identificación bioquímica.....	15
2.9.3.1 Prueba Catalasa .....	16
2.9.3.2 Pruebas rápidas. Sistema API .....	16
2.9.4 Métodos moleculares.....	17
2.9.4.1 Genes de RNA ribosomal .....	18
2.9.4.2 El gen ribosomal 16S como marcador molecular .....	19
2.9.4.3 Aspectos generales de la técnica para la secuenciación del gen ribosomal 16S. ....	20
2.9.4.4 Marcadores moleculares alternativos.....	22
2.9.5. La evolución y los árboles filogenéticos.....	23
2.10 Pruebas de actividad probiótica .....	24
2.10.1 Resistencia a la acidez gástrica .....	25

2.10.2 Resistencia a Sales Biliares .....	26
2.10.3 Antagonismo microbiano y las BAL .....	28
2.10.3.1 Bacteriocinas .....	29
2.10.3.2 Ácidos orgánicos .....	30
2.10.3.3 Peróxido de hidrógeno .....	31
2.10.3.4 Diacetilo.....	31
2.11 Uso y aplicaciones de los microorganismos en suelo .....	32
2.11.1 Biorremediación.....	32
2.11.2 Las BAL y los Microorganismos efectivos (EM).....	33
2.11.2.1 EM y su aplicación en animales.....	34
3. Antecedentes .....	36
3.1 Localización de la muestra.....	36
Capítulo II .....	38
4. Justificación .....	38
5. Objetivos.....	39
5.1 Objetivo general .....	39
5.2 Objetivos particulares .....	39
6. Hipótesis .....	39
Capítulo III .....	40
7. Desarrollo experimental .....	40
7.1 Origen y elaboración del biopreparado .....	41
7.2 Muestreo y manipulación de la muestra que provenía del biopreparado .....	41
7.3 Aislamiento de BAL.....	42
7.4 Análisis morfológico.....	43
7.5 Prueba de catalasa .....	43
7.6 Pruebas bioquímicas .....	44
7.7 Pruebas genéticas .....	44
7.7.1 Preparación de la muestra .....	45

7.7.2 Extracción de ADN .....	45
7.7.3 Cuantificación de ADN de las 9 cepas .....	46
7.7.4 Amplificación de la región ADN ribosomal 16S .....	46
7.7.5 Electroforesis previa a la purificación de ADN .....	47
7.7.6 Purificación de ADN mediante kit GenElute™ Minus EtBr Spin Columns .....	48
7.7.7 Secuenciación del ADN purificado.....	48
7.7.8 Análisis de secuencias .....	48
7.8 Árbol filogenético .....	49
7.9 Pruebas de actividad probiótica.....	49
7.9.1 Resistencia a la acidez gástrica .....	49
7.9.2 Resistencia a las sales biliares .....	50
7.9.3 Pruebas de actividad antagónica.....	50
Capítulo IV.....	52
8. Resultados .....	52
8.1 Características físicas y sensoriales del biopreparado .....	52
8.2 Muestreo y manipulación del biopreparado .....	52
8.3 Crecimiento de cepas.....	53
8.4 Prueba de catalasa .....	58
8.5 Pruebas Bioquímicas.....	58
8.6 Extracción de ADN.....	60
8.6.1 Amplificación de la región ADNr 16S.....	62
8.7 Purificación de ADN .....	64
8.8 Identidad de las cepas BAL.....	64
8.9 Árbol filogenético .....	66
8.10 Pruebas de actividad Probiótica .....	68
8.10.1 Resistencia a la acidez gástrica .....	68
8.10.2 Sales biliares.....	69

8.10.3 Pruebas antagónicas.....	70
9. Análisis de resultados .....	71
10. Conclusiones .....	83
11. Perspectivas.....	83
12. Bibliografía.....	85
APÉNDICE .....	107
Apéndice A .....	107
Apéndice B .....	108
Apéndice C .....	109
Apéndice D.....	110
Apéndice E .....	110
Apéndice F .....	113

## Índice de Tablas

Tabla 1. Información y secuencia de los cebadores <b>utilizados</b> .....	<b>44</b>
Tabla 2. Concentración de los componentes utilizados para llevar a cabo la amplificación del gen ADNr 16S en PCR tiempo final (PCR <sub>TF</sub> ).....	47
Tabla 3. Condiciones de PCR <sub>TF</sub> para la amplificación del gen ADNr 16S.....	47
Tabla 4. Características de las colonias en Agar nutritivo.....	53
Tabla 5. Características de las colonias en Agar MRS .....	54
Tabla 6. Criterio de selección para las colonias de estudio Agar MRS.....	<b>55</b>

Tabla 7. Descripción de las colonias aisladas de acuerdo con su crecimiento en Agar MRS. Características macroscópicas. ....	57
Tabla 8. Resumen de las características de las colonias aisladas.....	57
Tabla 9. Resultados de las pruebas bioquímicas (Galería API® 50 CH) obtenidas por Apiweb™.....	60
Tabla 10. Resultado de la cuantificación de ADN genómico para las nueve <b>cepas</b> .....	<b>61</b>
Tabla 11. Identidad de las cepas seleccionadas por alineamiento con el NCBI a través del programa BLAST para nucleótidos.....	65
Tabla 12. Resultados cualitativos de la prueba de resistencia a pH. ....	<b>68</b>
Tabla 13. Comparación de resultados antes y después de tratamiento con sales biliares en Agar MRS.....	<b>69</b>
Tabla 14. <b>Resumen de los patrones antagónicos</b> .....	<b>70</b>
Tabla 15. Comparación de resultados de las pruebas genéticas y <b>bioquímicas</b> .....	<b>79</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura y composición de <b>un ribosoma bacteriano</b> .....	19
Figura 2. Estructura <b>secundaria del ARNr 16S</b> .....	<b>20</b>
Figura 3. Diseño experimental general para identificar a un organismo mediante la secuenciación de ADNr 16S. ....	21

Figura 4. Estructura química de las sales biliares.....	26
Figura 5. Localización geográfica de la Región donde fue recolectada la muestra.....	37
Figura 6. Diagrama de flujo de la estrategia experimental .....	40
Figura 7. Descripción gráfica de la técnica de vertido en placa.....	43
Figura 8. Método para la prueba de antagonismo .....	51
Figura 9. Análisis filogenético molecular .....	67
Figura 10. Crecimiento microbiano en relación con la cantidad de oxígeno disuelto en el medio y el contenido enzimático .....	107

### Índice de Imágenes

Imagen 1. Muestra total de la fracción que provenía del biopreparado...	52
Imagen 2. Fraccionamiento de la muestra en el sentido de las manecillas del reloj y pesaje de la muestra.....	53
Imagen 3. Colonias en medio Agar nutritivo.....	54
Imagen 4. Colonias en medio Agar MRS.....	55
Imagen 5. Morfología vista en el microscopio (100x) de las cepas aisladas del Agar MRS.....	56
Imagen 6. Morfología vista en el microscopio (100x) de las cepas aisladas del Agar MRS.....	57
Imagen 7. Galería API® 50 CH.....	59
Imagen 8. Extracción de ADN de las colonias problema y el control.....	61

Imagen 9. Productos de amplificación del ARNr 16S, cepas 2-8.....	62
Imagen 10. Productos de amplificación del ARNr 16S, cepas 11-15.....	63
Imagen 11. Amplicones de Gel de agarosa al 1% para secuenciación. ....	64
Imagen 12. Cuantificación de la extracción de ADN de las cepas a una <b>absorbancia de A260/A280 nm.....</b>	<b>113</b>
Imagen 13. Cuantificación de la extracción de ADN de las cepas a una absorbancia de A260/A280 nm. ....	114
Imagen 14. Cuantificación de la extracción de ADN de las cepas a una <b>absorbancia de A260/A280 nm.....</b>	<b>115</b>

## Resumen

Un grupo de investigadores en alimentación animal (México-Cuba) probó un fermentado de suelo (biopreparado) con resultados positivos en la promoción del crecimiento en lechones. De ahí surge el interés en identificar los microorganismos eficientes responsables de ello. En este trabajo, se logró identificar bacterias ácido lácticas (BAL), que tuvieron características favorables para el empleo y elaboración de suplementos probióticos para alimentación animal. Para lo cual, del biopreparado obtenido en el municipio de Chiautzingo, Puebla, se aislaron bacterias en medios de cultivo diseñados para el crecimiento de bacterias ácido lácticas en condiciones microaerofílicas. Se aislaron 9 cepas de BAL, las cuales presentaron resistencia a las sales biliares, pH ácido e inhibieron el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* y *Listeria monocytogenes*. Algunas cepas inhibieron *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. De acuerdo con las pruebas bioquímicas y con los resultados de secuenciación de ADN todas estas cepas pertenecen al género *Lactobacillus*. Se concluye que el biopreparado contiene bacterias ácido lácticas, las cuales son las responsables de la actividad probiótica que pudieran beneficiar el crecimiento de los lechones.

## Capítulo I

### 1. Introducción

Es en las capas superficiales del suelo donde residen la mayor cantidad y variedad de microorganismos, provenientes de los tres dominios de la vida: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*; en estas capas hay mayor interacción con el ambiente, plantas y animales de manera positiva, neutra o negativa lo que desencadena la competencia entre las especies por sobrevivir en un determinado lugar (Janssen, 2008).

Los microorganismos dependen de la estructura del suelo, disponibilidad y ciclo de nutrientes, contenido de humedad y cantidad de materia orgánica para desarrollar sus funciones básicas, así como también participan en los ciclos biogeoquímicos y en la descomposición de los tejidos de plantas y animales. (Tulip Group, 2010).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están naturalmente presentes en vegetales, cultivos forrajeros, plantas, bebidas fermentadas, productos lácteos, productos cárnicos, vegetales fermentados, piel, mucosa del tracto digestivo y tracto genital de humanos y animales terrestres y marinos (Breidt *et al.*, 2013; Cueto *et al.*, 2012; Florou-Paneri *et al.*, 2013; **Karovičová & Kohajdová**, 2003; Yang *et al.*, 2010; Yusuf & Hamid, 2013). Sin embargo, los aislamientos de BAL provenientes de suelo son poco frecuentes (Chen, 2004).

En los últimos años se ha visto que las BAL aisladas de fuentes no lácteas (como el suelo o plantas) poseen características únicas debido a que toleran altas concentraciones de sal y pH; además de que poseen una amplia gama de enzimas para fermentar carbohidratos y presentan mejor tolerancia al estrés que las de origen lácteo (Teneva & Beshkova, 2016).

Las BAL son utilizadas como probióticos debido a que presentan diversas características como resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, controlan la homeostasis intestinal, producen sustancias antibacterianas en el tracto digestivo y presentan propiedades inmunomodulatorias (Erickson & Hubbard, 2000; Jini *et al.*, 2011; Meydani & Ha, 2000).

En la industria de alimentos son muy utilizadas como cultivo iniciador debido a la producción de ácido láctico que acidifica el medio, producen sustancias proteolíticas y son excelentes productoras de bacteriocinas que se utilizan en la prevención de la descomposición de los alimentos (Chen *et al.*, 2010; Dolz, 2008; Jini *et al.*, 2011; Savadogo *et al.*, 2004).

Los probióticos han sido usados desde tiempos muy antiguos y su preparación tradicional se ha propagado a través de los años, llegando a industrializar la elaboración de productos y suplementos con cepas probióticas. Los investigadores han descubierto características y posibles usos alternativos para el tratamiento y prevención de enfermedades. La preparación y conservación de la muestra de suelo que se analiza en este proyecto está basada en una fermentación inducida en la que las BAL transforman los carbohidratos solubles en ácidos orgánicos, de esta manera se conserva el preparado al reducir el pH, recuperando lípidos y proteínas del medio (Angmo *et al.*, 2016b; Cai *et al.*, 1997; Jini *et al.*, 2011; Meydani & Ha, 2000).

Dada la amplia distribución de las BAL y los escasos aislamientos de suelo, el presente trabajo tiene como objetivo aislar e identificar bacterias ácido lácticas que se encuentren presentes en el preparado de suelo y verificar si las cepas aisladas presentan actividad probiótica verificando su resistencia a sales biliares, pH y pruebas de antagonismo (Begley *et al.*, 2005; Bou *et al.*, 2011; Teneva & Beshkova, 2016).

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Definición de Suelo

El suelo es un conjunto de materia en el cual se encuentran sólidos orgánicos y minerales, líquidos y gases, los cuales se acomodan en capas diferenciadas, consecuencia de transformaciones de materia y energía que sufren con el tiempo. El suelo tiene diferentes espesores, que pueden abarcan hasta varios metros de profundidad (Volke *et al.*, 2005).

### 2.2 Composición

El suelo es una mezcla de fracciones minerales (arcillas, limo y arena) materia orgánica, agua, aire y organismos vivos. Tiene una gran importancia ya que es un recurso natural donde los organismos desarrollan sus funciones básicas, dando soporte e infraestructura; es ahí donde ocurren los ciclos biogeoquímicos y es fuente de materiales no renovables (Volke *et al.*, 2005).

### 2.3 Microbiología del suelo

Los microorganismos provenientes de los tres dominios de la vida, Archaea, Bacteria y Eukarya, habitan las capas superficiales del suelo, es ahí donde ocurre la mayor interacción con el ambiente y los demás seres vivos, de manera positiva, neutra o negativa, lo que desencadena la competitividad entre las especies por sobrevivir en un determinado lugar y aprovechar los recursos que el medio ofrece (Janssen, 2008).

Los microorganismos dependen de la estructura del suelo, contenido, disponibilidad y ciclo de nutrientes, contenido de humedad y cantidad de materia orgánica para desarrollar sus funciones básicas, así como también, participan en los ciclos biogeoquímicos y en la descomposición de los tejidos de plantas y animales para contribuir al reciclaje de los nutrientes al medio. Los microorganismos que más abundan en la superficie del suelo son las bacterias, tanto del dominio Archaea como Bacteria. Ellas, junto con los demás organismos que residen en el suelo, ciclan los nutrientes y purifican los contaminantes orgánicos (Pepper *et al.*, 2015; Tulip Group, 2010).

La microbiología del suelo abarca diversos organismos: microscópicos y macroscópicos. En el grupo de los microscópicos están las bacterias, actinomicetos, hongos, protozoarios y virus. En el grupo de los macroscópicos se tiene a los nemátodos, ácaros y otros microartrópodos. A estos dos grupos se le puede agrupar como la biota del suelo, los cuales interactúan con las raíces de las plantas y el ambiente (Tulip Group, 2010).

#### 2.4 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas, también forman parte del suelo y son Gram-positivo, tienen forma de cocos, cocobacilos o bacilos, no son móviles, no forman esporas y son anaerobios aerotolerantes, lo que significa que pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno (Apéndice A). Su crecimiento se favorece al eliminar oxígeno del medio o al añadir 5-10 % de CO<sub>2</sub> (Barbés, 2008; Stanier *et al.*, 1996; Yusuf & Hamid, 2013).

La mayoría de las BAL son mesófilas, es decir, su temperatura de crecimiento se encuentra entre los 20°C y 45°C y su rango óptimo es de los 30°C a 40°C. El pH en el que se desarrollan está entre los 5,5 a 6,2 aunque hay algunas

especies que soportan actividades de iones de hidrógeno más bajos. Carecen de la enzima catalasa, no reducen nitratos, no licuan gelatina, no producen ácido sulfhídrico, ni indol, ni pigmentos (Barbés, 2008; Florou-Paneri *et al.*, 2013; Higuchi *et al.*, 2000; Parra, 2010; Prescott *et al.*, 2004; Sánchez, 2005; Yusuf & Hamid, 2013).

Debido a la falta de ciclo de Krebs y enzimas citocromo catalasa y citocromo oxidasa (ya que no pueden sintetizar el grupo hemo) no cuentan con sistemas de transporte de electrones funcionales, por lo que no pueden obtener energía por esa vía, es por eso que utilizan vías de fermentación eficientes acopladas a la fosforilación a nivel sustrato para la obtención de energía a partir de la oxidación de carbohidratos; el principal producto de la fermentación es el ácido láctico (Barbés, 2008; Florou-Paneri *et al.*, 2013; Higuchi *et al.*, 2000; Parra, 2010; Prescott *et al.*, 2004; Yusuf & Hamid, 2013).

Las BAL son quimioorganoheterótrofas, su principal fuente de carbono y energía la obtienen de moléculas orgánicas preformadas y reducidas. Los requerimientos nutricionales son altos y solo crecen en medios complejos. Necesitan de ciertos aminoácidos y vitaminas del grupo B para su crecimiento (factores de crecimiento) (Barbés, 2008; Parra, 2010; Prescott *et al.*, 2004).

Estos requerimientos varían entre las diferentes especies BAL. Por ejemplo, la tiamina solo es requerida entre las especies que son heterofermentativas. El medio MRS es ideal para la reproducción en el laboratorio, pues cubre con sus necesidades nutrimentales. En el medio ambiente estos requerimientos son cubiertos por otros microorganismos que producen sustancias útiles para el crecimiento de las BAL (Barbés, 2008; Parra, 2010; Prescott *et al.*, 2004).

## 2.5 Clasificación de BAL

Las bacterias se han dividido en dos ramas de acuerdo con los datos de las secuencias del ADN ribosomal (16S). El primer phylum, que recibe por nombre *Firmicutes*, incluye las bacterias Gram positivas con un ADN base con menos del 50% en moles de guanina más citosina (G+C). El otro phylum, *Actinomyces*, comprende bacterias con un G+C superior al 50 % (Holzapfel & Wood, 2012).

Las BAL pertenecen al phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*. Las diferentes familias incluyen *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*. En la naturaleza podemos encontrar los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Microbacterium*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*; el género *Bifidobacterium* pertenece a la subdivisión *Actinomyces* y es usado también en el área de alimentos como probiótico (Axelsson, 2004; Florou-Paneri *et al.*, 2013; Lahtinen *et al.*, 2011; Ventura *et al.*, 2008; Yusuf & Hamid, 2013).

La clasificación de las BAL se basa en su morfología, la temperatura de crecimiento, la configuración óptica del ácido láctico producido, tolerancia a la sal, el pH, en su metabolismo y en el modo en que fermentan los carbohidratos, las bacterias homofermentativas utilizan la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas la cual produce principalmente ácido láctico y las bacterias heterofermentativas utilizan la vía de pentosas fosfocetolasa para producir

ácido láctico y varios compuestos más, como ácido acético, etanol, dióxido de carbono y ácido fórmico (Duong & Klaenhammer, 2008).

## 2.6 Distribución de las BAL

Se encuentran en suelo y están naturalmente presentes en vegetales, cultivos forrajeros, plantas, bebidas fermentadas, productos lácteos, productos cárnicos, vegetales fermentados, piel, mucosa del tracto digestivo; tracto genital de humanos, animales terrestres y marinos (Breidt *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2012; Cueto *et al.*, 2012; Florou-Paneri *et al.*, 2013; **Karovičová & Kohajdová**, 2003; Yang *et al.*, 2010; Yusuf & Hamid, 2013). Sin embargo, los aislamientos de BAL provenientes de suelo son poco frecuentes (Chen, 2004).

En los últimos años se ha visto que las BAL aisladas de fuentes no lácteas (como el suelo o plantas) poseen características únicas debido a que toleran altas concentraciones de sal y pH; además de una amplia gama de enzimas para fermentar carbohidratos y mejor tolerancia al estrés que las de origen lácteo (Teneva & Beshkova, 2016).

## 2.7 Las BAL en alimentos

La BAL se utilizan como cultivo iniciador o se añaden en alguna etapa del proceso y son importantes en la conservación de los alimentos, debido a que fermentan los componentes presentes en el alimento, lo que da un producto final con diversas características que lo hacen único y funcional (Duong & Klaenhammer, 2008; Vandamme *et al.*, 1996).

Durante la fermentación, cambian las propiedades reológicas y organolépticas del alimento y se producen diferentes compuestos como ácidos orgánicos,

gases y compuestos volátiles los cuales le dan sabor, textura y un gran aporte nutrimental. Por ejemplo, en los quesos madurados la producción de dióxido de carbono durante la etapa de maduración provoca la aparición de los agujeros, así como también la aparición de la espuma presente en algunas bebidas fermentadas (Duong & Klaenhammer, 2008; Vandamme *et al.*, 1996).

El ácido láctico, el acetaldehído y diacetilo producen sabor en el alimento (por la fermentación de citratos) y son los responsables de dar aroma y sabor al alimento (Balciunas *et al.*, 2013; Durango *et al.*, 2012; Jyoti *et al.*, 2003; Parra, 2010; Vedamuthu, 1994).

Las BAL también participan en la producción a gran escala de ingredientes y productos químicos finos, como el ácido L-láctico que se utiliza para la síntesis de polímeros biodegradables y como sustrato para la elaboración de otros compuestos como ácido acético, etanol, acetaldehído, ácido propiónico, ácido acrílico y propilenglicol (Duong & Klaenhammer, 2008).

Las bacteriocinas también son producidas por las BAL y tienen un efecto antimicrobiano que se produce durante el proceso de fermentación e inhiben el desarrollo de bacterias no deseadas que pueden descomponer al alimento. Son péptidos que se ha utilizado como bioconservadores alternativos seguros, que pueden sustituir a los conservadores químicos que se utilizan actualmente en la industria alimentaria ya que se han detectado problemas por su ingesta (Chen *et al.*, 2010; Mondragón *et al.* 2013; Yusuf & Hamid, 2013).

Las bacteriocinas pueden ser añadidas directamente al alimento, la bacteriocina purificada o bien, añadir a la bacteria para que la produzca en el alimento; se puede elaborar también preparaciones con bacteriocinas inmovilizadas (Chen *et al.*, 2010; Mondragón *et al.* 2013; Yusuf & Hamid, 2013). Son consideradas como GRAS (generalmente reconocidos como

seguros) debido a que, por ser de origen proteico, son metabolizados por las proteasas del humano (enzimas como la tripsina y la pepsina) (Dolz, 2008; Savadogo *et al.*, 2004; Vásquez *et al.*, 2009).

## 2.8 BAL y su papel probiótico

La FAO y la OMS han definido **probiótico como:** “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedero”. Los probióticos han sido usados desde tiempos muy antiguos y su preparación tradicional se ha propagado a través de los años (Fuller, 1995; Morelli & Capurso, 2012).

Con el paso del tiempo se han descubierto que las BAL son GRAS, tienen características y propiedades terapéuticas únicas que brindan un efecto positivo al sistema gastrointestinal e inmunológico, así como también usos alternativos para el tratamiento y prevención de enfermedades (Álvarez & Azpiroz, 2015; Angmo *et al.*, 2016b; Erickson y Hubbard, 2000; Fontana, *et al.*, 2013; López & Domingo, 2007; Meydani & Ha, 2000).

La microbiota intestinal es un ecosistema muy complejo y dependen muchos factores para que una especie probiótica pueda colonizar y desarrollarse en el intestino. Estos factores son: el desarrollo del huésped y la genética, la edad, el estado de salud y actividad física, la dieta (la ingesta de leche materna en el caso de los bebés y el consumo de ciertas proteínas o carbohidratos que está influenciada por la cultura alimentaria del anfitrión) el tipo de cepa y la adaptabilidad de cada especie bacteriana (Ventura *et al.*, 2008).

Durante la colonización del tracto gastrointestinal, la microbiota debe de superar diversos obstáculos como cambios en el pH, concentraciones bajas de

oxígeno, alta osmolaridad y pocos nutrientes disponibles para asegurar la supervivencia en el medio (Begley *et al.*, 2005).

Los microorganismos pueden encontrarse en el estómago (en menores cantidades, que pueden sobrevivir de manera transitoria al adherirse al estómago), en el íleon y en el intestino grueso concentrando ahí la mayoría de su población, por lo que la distribución de las especies no es la misma, diversificando la actividad bacteriana a lo largo del tracto gastrointestinal (Behnsen *et al.*, 2013; Jandhyala *et al.*, 2015; Sivieri *et al.*, 2013).

Dicha actividad juega un papel muy importante en contra de microorganismos patógenos y oportunistas impidiendo la adhesión a la mucosa gastrointestinal, imposibilitando que los microorganismos patógenos colonicen y causen infección en el humano o animal (Sivieri *et al.*, 2013; Castro & De Rovetto, 2006).

En resumen, los probióticos poseen diversas funciones y características que les permiten ser parte de la microbiota como la resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, tienen actividad proteolítica y antibacteriana (por la síntesis de metabolitos antimicrobianos), tienen la capacidad de fermentar mucinas endógenas y los residuos provenientes de la dieta (que podrían perderse en la excreción) (Iñiguez & Acedo, 2006).

También, los probióticos son un elemento importante de la microbiota humana para conservar la salud, dado que aportan energía por la producción de ácidos grasos de cadena corta, mejoran la digestión de la lactosa, disminuyen los niveles de colesterol total del plasma y el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) (Angmo *et al.*, 2016b; Liong & Shah, 2005; Usman & Hosono, 1999; Walker & Gilliland, 1993).

Además, modulan el sistema inmune (disminuyen la diarrea infantil, la enfermedad inflamatoria intestinal, etc.) controlan la homeostasis en el intestino (mejoran la motilidad intestinal) y ayudan a la fortificación de la mucosa intestinal (Agudelo *et al.*, 2015; Angmo *et al.*, 2016b; García *et al.*, 2009; Jini *et al.*, 2011; Sivieri *et al.*, 2013; Taheri *et al.*, 2012).

En consecuencia, el consumo de alimentos con probióticos se ha incrementado gracias a la larga lista de beneficios que aporta al consumidor, su relación tan estrecha con la salud y por los desarrollos genéticos para la identificación e incorporación de nuevas cepas probióticas. Estos análisis tienen gran relevancia para evitar riesgos a la salud o que sus declaraciones sean engañosas; la actividad probiótica depende de cada cepa en particular (Mohania *et al.*, 2008; Rodríguez, 2015; Vásquez *et al.*, 2009).

Se ha generado un gran desarrollo tecnológico en la elaboración de los alimentos funcionales, los cuales además de brindar un efecto nutricional, aportan un beneficio a la salud como ya se ha mencionado. Estos alimentos funcionales pueden contener probióticos, prebióticos (carbohidratos no digeribles por las enzimas humanas, pero si digeribles por los probióticos favoreciendo su crecimiento en el tracto intestinal) o los dos dándole el nombre de simbióticos (Álvarez & Azpiroz, 2015).

En el caso de animales domésticos para consumo humano, como los cerdos, se ha visto que los probióticos son un recurso más confiable y seguro que contribuyen a la salud del animal. Debido a que limitan el desarrollo de patógenos y permiten el desarrollo de bacterias que si ofrecen un beneficio a los cerdos (Giraldo *et al.* 2015; Jurado *et al.*, 2009).

Las principales acciones son mejorar la digestión y absorción de los nutrientes provenientes de la dieta, estimulan el sistema inmunológico; reducen los residuos de antibióticos, diarreas y la distensión del intestino por gases,

producen ácidos grasos de cadena corta y contribuyen a la síntesis de vitaminas del complejo B (Giraldo *et al.* 2015; Jurado *et al.*, 2009).

## 2.9 Métodos empleados para la identificación de microorganismos

Para cualquier campo de aplicación de las cepas microbianas que se aíslan es importante conocer la identidad del microorganismo, por lo que primero se debe clasificarlo taxonómicamente; este proceso está basado en un enfoque polifásico en el cual se aplican métodos fenotípicos y genotípicos (Fontana *et al.*, 2013).

Desde hace algunas décadas a la fecha, la identificación de microorganismos se ha realizado por medio de metodologías convencionales (Bou *et al.*, 2011).

Estas metodologías se enfocan en el estudio de características fenotípicas al cultivar una especie bacteriana en un medio de cultivo (líquido o sólido) y se efectúan pruebas bioquímicas y/o fisiológicas en esa cepa pura. Estos estudios tienen algunas desventajas, como lo es su baja reproducibilidad, bajo poder discriminatorio ya que no siempre se expresan todos los genes de la célula (esta respuesta depende de las condiciones ambientales) y no siempre es posible obtener un cultivo puro y/o viable en un medio artificial (Bou *et al.*, 2011; Mohania *et al.*, 2008; Theron & Cloete, 2008; Vandamme *et al.*, 1996).

Los métodos fenotípicos se enfocan en las características observables como: su adaptación a medios artificiales, morfología, estructura de sus componentes celulares, metabolismo, producción de pigmentos y desarrollo de ensayos serológicos; estos métodos son más accesibles y menos costosos en comparación a los métodos genotípicos, aunque llevan un poco más de tiempo en realizarlas en el laboratorio (debido a que se necesitan de diferentes medios de cultivo para ello), además que no reflejan la interacción entre comunidades

bacterianas en sus ambientes naturales (Temmerman *et al.*, 2004; Theron & Cloete, 2008).

Solo el 10% de la diversidad microbiana se ha identificado de esta manera, debido a que los métodos fenotípicos son limitantes para el estudio muchas especies, las especies no cultivables se han identificado por medio de técnicas moleculares y se ha visto que son especies metabólicamente activas en sus hábitats naturales, pero no en los artificiales. Esto puede deberse a que no se han elaborado medios de cultivo exclusivos para esos microorganismos (regulación de la temperatura, cantidad de oxígeno y de nutrientes) o que su supervivencia dependa de otro microorganismo (Díaz & Wacher, 2003; Theron & Cloete, 2008).

Con el desarrollo en métodos y técnicas moleculares, es posible clasificar mejor a un microorganismo. Las ventajas que proporcionan estos métodos es que arrojan resultados más precisos, pueden no necesitar de un cultivo de células previo, son confiables y sensibles, por la estabilidad que presenta el ADN, así como la alta discriminación de microorganismos a nivel cepa. La desventaja para el aislamiento del ADN es el alto costo de reactivos y equipos (Díaz & Wacher, 2003; Marroki *et al.*, 2011).

La identificación de las BAL se ha hecho principalmente por medio del estudio de pruebas fenotípicas, como, el perfil de fermentación de carbohidratos. Sin embargo, distinguir algunas especies por estos métodos es difícil o ambiguo, por lo que la aplicación de métodos genotípicos y el estudio del genoma bacteriano ha permitido identificar o tipificar mejor, en este caso, al género *Lactobacillus* spp y encontrar nuevos cultivos para las distintas aplicaciones industriales (Marroki, *et al.*, 2011).

A continuación, se describirán de forma breve algunas técnicas que se emplearon en este trabajo.

### 2.9.1 Técnica de vertido en placa

Para la obtención de microorganismos que se encuentran en la muestra, se toma una cantidad de la muestra y se transfiere a una serie de diluciones en solución salina isotónica al 0.85% y se siembra una alícuota de cada dilución en un medio sólido (Camacho *et al.*, 2009).

Los medios sólidos se incuban para observar el crecimiento del microorganismo. En esta etapa se controla el tiempo de incubación, la temperatura y el suministro de oxígeno. El objetivo es obtener una colonia de bacterias provenientes de una célula. Cada célula forma una colonia, esta bacteria se le denomina unidad formadora de colonia (UFC). Así es como se logra conocer el número de bacterias vivas que existen en la placa de agar, como también obtener una cepa pura aislada (Pepper *et al.*, 2015).

### 2.9.2 Análisis morfológico

Una vez que se ha aislado a la bacteria, se observa la morfología mediante el uso del microscopio óptico y el empleo de diferentes reactivos para la tinción de las estructuras celulares. De acuerdo con el tipo de técnica es posible conocer la composición de su pared celular o si la célula posee flagelos o cápsula, o bien, si es productora de esporas. La técnica empleada en este trabajo fue la tinción de Gram (Apéndice B) para conocer el tipo de pared celular que poseen. Es importante que el cultivo tenga menos de 24 horas de crecimiento para realizar las pruebas (Prescott *et al.*, 2004).

### 2.9.3 Identificación bioquímica

Las características metabólicas de la bacteria en estudio están estrechamente relacionadas con la actividad enzimática y su relación indirecta con la

expresión genética. De acuerdo con las BAL y la manera en cómo convierten los diferentes carbohidratos para la obtención de energía, se han diseñado pruebas para determinar el patrón de fermentación para carbohidratos (Prescott *et al.*, 2004).

Existen diversas pruebas, la mayoría se preparan en el laboratorio, pero hay marcas comerciales que fabrican kits de identificación rápida, las cuales tras inocular la cepa pura en cada microtubo y esperar el tiempo de incubación marcado por el fabricante se puede conocer el patrón característico de fermentación de la cepa (Nigatu *et al.*, 2000).

#### 2.9.3.1 Prueba Catalasa

Esta prueba se utiliza para reconocer a los microorganismos aerobios. Las BAL, al no poseer la enzima citocromo catalasa no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso (Apéndice D). Algunas BAL son capaces de tomar grupos hemo del medio ambiente para formar la pseudocatalasa (por lo que forman colonias de color blanco lechoso) (Prescott *et al.*, 2004).

#### 2.9.3.2 Pruebas rápidas. Sistema API

La identificación bioquímica se puede realizar también mediante sistemas miniaturizados como el sistema API® (Índice Analítico de Perfil por sus siglas en inglés *Analytical Profile Index*) que son métodos rápidos miniaturizados destinados a la identificación de microorganismos.

Estas pruebas constan de diferentes medios de cultivo deshidratados y liofilizados o diferentes sustratos contenidos en microtúbulos para la búsqueda

de enzimas que pudiera tener el microorganismo de interés. Estas pruebas están diseñadas de acuerdo con el tipo de microorganismos que se quiera identificar, relacionando su actividad metabólica con el tipo de tira que se requiera emplear (Biomériux, 1989).

La galería API® 50 CH y el sistema API® 50 CHL Medium son específicos para la búsqueda del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos, ya que permite el estudio de la fermentación de 49 azúcares de la galería API® 50 CH (Apéndice C) (Biomériux, 1989; Bou *et al.*, 2011; Nigatu *et al.*, 2000).

Durante la incubación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico y permiten la identificación del microorganismo con la ayuda de un programa informático de identificación Apiweb™.

#### 2.9.4 Métodos moleculares

Los métodos moleculares permiten obtener información más detallada y precisa de la relación que existe en las especies y su evolución en el tiempo, son los ácidos nucleicos, las moléculas que reflejan los cambios que suceden (así como también las proteínas y la proteómica se encarga de dicho estudio) para comparar o agrupar dos o más organismos es necesario contar con un marcador genético (Bou *et al.*, 2011).

Un marcador genético es una secuencia de ADN que está asociado a una característica en particular o a un gen y la ubicación dentro del cromosoma es conocida, la característica principal es que contenga regiones de ADN conservadas, es decir, que la secuencia no haya cambiado con el tiempo (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015; Rentarúa, 2007).

Para seleccionar el marcador, se debe tener en cuenta el alcance de la técnica, los costos y los métodos en base al tipo de análisis que se quiera realizar. Los usos que pueden tener los marcadores son: observación en el flujo génico, variabilidad genética, mejoramiento genético, historia evolutiva, identificación de individuos, análisis de la paternidad, detección de secuencias y sistema de apareamiento (Cornejo *et al.*, 2014; Godoy, 2009).

Actualmente se han desarrollado diversas técnicas moleculares, con una amplia gama de secuencias genéticas (ADN o ARN) para analizar y agrupar de manera más correcta los géneros o especies de los organismos. La técnica más utilizada es la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. Esta técnica se empleó en este trabajo para la identificación de las bacterias aisladas obtenidas el suelo.

#### 2.9.4.1 Genes de RNA ribosomal

Los ribosomas son unidades celulares universales que están encargados de traducir el código genético en proteínas y la formación catalítica de los enlaces peptídicos. Los ribosomas de células procariotas están formados por dos subunidades con diferentes coeficientes de sedimentación (expresado en unidades Svedberg, S): 30S (subunidad pequeña) y 50S (subunidad grande) y un coeficiente de sedimentación combinado de 70S; el polirribonucleotido ARNr 16S se encuentra dentro de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Figura 1). (Krupkin *et al.*, 2011; Nelson & Cox, 2009; Rodicio & Mendoza, 2004).

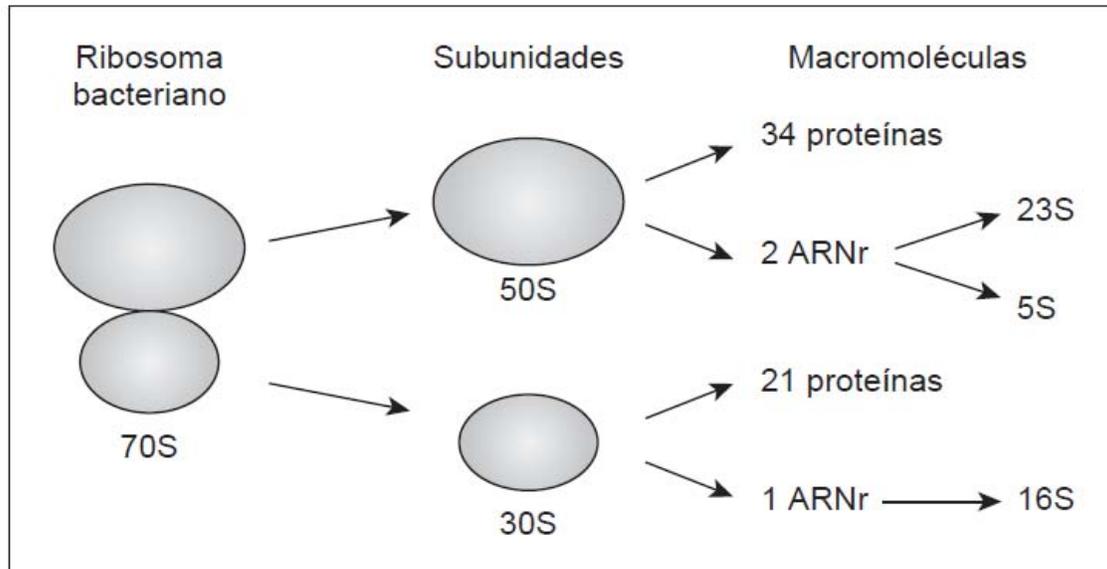


Figura 1. Estructura y composición de un ribosoma bacteriano (Rodicio & Mendoza, 2004).

#### 2.9.4.2 El gen ribosomal 16S como marcador molecular

El ADN ribosomal 16S (ADNr 16S) ó gen *rrs* que codifica para ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), presenta regiones de alto grado de conservación que además son comunes en todos los organismos, es decir, genes que casi no ha sufrido mutaciones con el tiempo, por lo que la selección como marcador y cronómetro molecular (gracias al estudio de éste gen fue que se llevó a cabo la separación de los organismos celulares en 3 dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*), proporciona resultados certeros y reproducibles, para estudios taxonómicos y evolutivos, aunque no es una herramienta infalible. Este gen está compuesto de 1500 pares de bases (pb) aproximadamente lo que brinda un adecuado polimorfismo interespecífico, y los suficientes pares de bases para reducir las fluctuaciones en análisis estadísticos (Figura 2.) (Bou *et al.*, 2011; Rodicio & Mendoza, 2004).

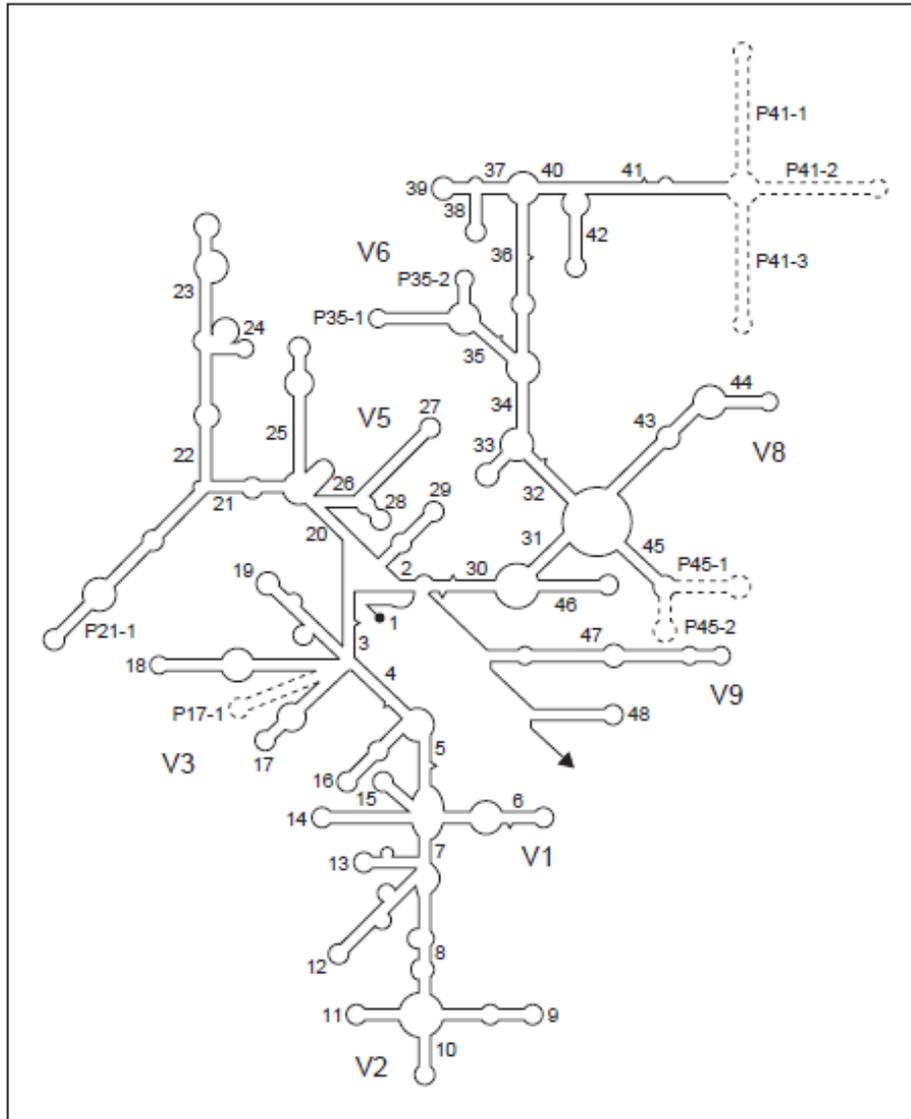


Figura 2. Estructura secundaria del ARNr 16S (Rodicio & Mendoza, 2004).

### 2.9.4.3 Aspectos generales de la técnica para la secuenciación del gen ribosomal 16S.

En esta técnica comienza con recuperar el ADN cromosómico de una cepa pura a partir de un medio de cultivo, mediante técnicas y kits de extracción para ADN generales o modificadas (Figura 3), la colonia deberá encontrarse en fase exponencial para la extracción (aunque también puede obtenerse ADN directo

de la muestra, sin un cultivo previo de células), después, amplificar con cebadores específicos la región conservada del ADNr en un termociclador para generar copias amplificadas del gen ribosomal 16S por medio de la reacción en cadena polimerasa (PCR) (Cornejo *et al.*, 2014).

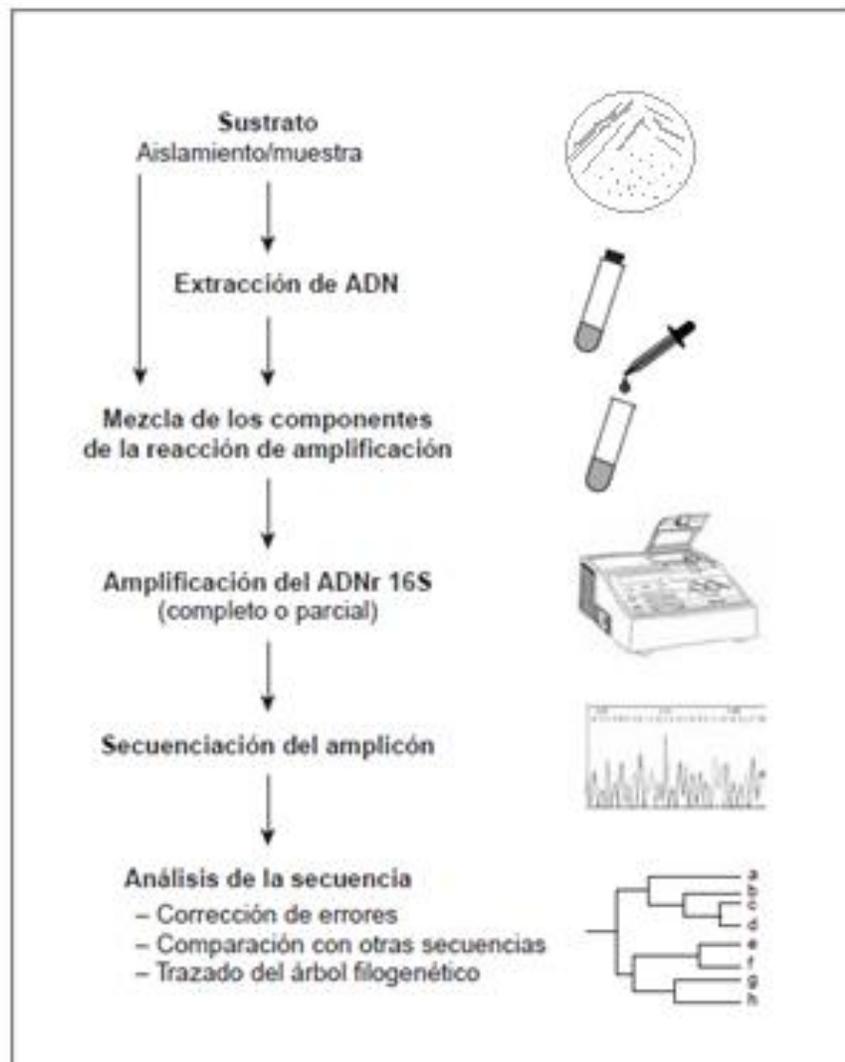


Figura 3. Diseño experimental general para identificar a un organismo mediante la secuenciación de ADNr 16S. Esta técnica se compone de tres etapas: a) Amplificación del gen del organismo de interés, b) Determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y c) Análisis de la secuencia (Rodicio & Mendoza, 2004).

**Se deben de seleccionar cebadores iniciadores que estén cerca al extremo 5' y 3' del gen**, para obtener amplicones con aproximadamente 1500 pb (Bou *et al.*, 2011; Rodicio & Mendoza, 2004; Weisburg *et al.*, 1991).

Se analizan los amplicones obtenidos por medio de una electroforesis (en los cuales se debe de observar el mismo peso molecular) y posteriormente se procede a la secuenciación de los amplicones. Para conseguir la secuencia de genes, se analizan los electroferogramas, además de que se deben de alinear la cadena directa y la reversa y eliminar posibles errores (Bou *et al.*, 2011; Rodicio & Mendoza, 2004).

Finalmente, las secuencias de nucleótidos obtenida, se compara con las bases de datos en la web de acceso público (como el Genbank NCBI -National Center of Biotechnology Information-, RDP -Ribosomal Data Base Project-, entre otras) o privado (como MicroSeq -Applied Biosystems-). Con esto se logrará construir un árbol filogenético con el que se pueda analizar mejor a los organismos de interés y verificar su grado de similitud y su relación evolutiva (Bou *et al.*, 2011; Rodicio & Mendoza, 2004).

#### 2.9.4.4 Marcadores moleculares alternativos

La secuencia del gen ribosomal 16S no es la única secuencia genética que se utiliza para identificar a un organismo y clasificarlo a nivel de género, especie o cepa (aunque es la más usada para filogenia o clasificación taxonómica). Muchas veces existe un alto grado de homología en los genes que esta técnica no puede discriminar (Bou *et al.*, 2011; Mohania *et al.*, 2008; Rodicio & Mendoza, 2004; Theron & Cloete, 2008).

Sin embargo, es posible recurrir a otras técnicas moleculares como: el análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA), el polimorfismo de

longitud de fragmento de restricción (RFLP), electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE), electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)) y utilizar otros genes diana o cronómetros moleculares alternativos al ADNr 16S, como, por ejemplo: el espacio intergénico del 16S-23S ARNr, ARNr 23S o el gen *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa), *gyrB* (subunidad  $\beta$  de la ADN girasa) (Bou *et al.*, 2011; Mohania *et al.*, 2008; Rodicio & Mendoza, 2004; Theron & Cloete, 2008).

Estos dos últimos genes son de distribución universal y permiten obtener resultados satisfactorios; todo esto con el fin de identificar y caracterizar a las cepas probióticas (Bou *et al.*, 2011; Mohania *et al.*, 2008; Rodicio & Mendoza, 2004; Theron & Cloete, 2008).

#### 2.9.5. La evolución y los árboles filogenéticos

Los organismos han sido sometidos a una selección natural para adaptarse al ambiente tan cambiante donde se desarrollan, heredando estos cambios que han quedado grabados en el ADN, los cuales podemos estudiar a través de métodos de reconstrucción filogenética y así inferir su evolución partiendo de los organismos actuales. Los árboles filogenéticos son estimaciones de las relaciones que existen entre las secuencias o taxones homólogos, es decir si esas secuencias son descendientes de un antepasado común. En el árbol filogenético se muestra el parentesco de los organismos o la evolución de genes y de los cambios que se han ido acumulado en cada rama (Abascal *et al.*, 2014; Hall, 2013).

El árbol filogenético es una representación gráfica y la información que se utiliza en la construcción de árboles filogenéticos son secuencias de ADN o

proteínas. El proceso comienza con reunir las secuencias homólogas de ADN o proteínas, después estas secuencias se alinean, posteriormente se construye el árbol filogenético con las secuencias alineadas y por último se muestra el árbol filogenético en el que se muestre la información que se desee transmitir (Hall, 2013).

## 2.10 Pruebas de actividad probiótica

Para utilización de una cepa como probiótico se requieren realizar diversos protocolos para asegurar la sobrevivencia de la cepa a través del tracto gastrointestinal y proveer un beneficio positivo al hospedador. Una de las pruebas que se practica a las cepas es la resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, ya que el pH del estómago y la bilis del intestino son barreras antimicrobianas que tienen que superar las cepas con el fin de crecer y desarrollarse en el colón (Fontana *et al.*, 2013; Harzallah & Belhadj, 2013; Succi *et al.*, 2005).

Para verificar la seguridad de la cepa, es decir, que no sea una cepa patógena y tóxica, se debe comprobar la ausencia de factores de virulencia y realizar pruebas mediante ensayos clínicos *in vivo*; debe tener patrones de resistencia a antibióticos; la cepa debe contar con actividad contra patógenos para disminuir la adhesión de éstos al tracto intestinal y asegurar la adherencia de la cepa a las líneas celulares humanas (requisito para la colonización de la cepa) (Fontana *et al.*, 2013; Ganguly *et al.*, 2011; Gueimonde & Salminen 2006; Harzallah & Belhadj, 2013; López & Domingo, 2007).

El uso de cepas probióticas debe conferir un beneficio en el organismo hospedero (el organismo hospedero debe de ser inmuno-tolerante a la cepa probiótica) y existir células viables desde la elaboración del producto alimenticio hasta su almacenamiento (Fontana *et al.*, 2013; Ganguly *et al.*,

2011; Gueimonde & Salminen 2006; Harzallah & Belhadj, 2013; López & Domingo, 2007).

### 2.10.1 Resistencia a la acidez gástrica

Cada microorganismo crece y se desarrolla a ciertos valores de pH, estos valores si se alteran, su crecimiento se inhibe o pueden causar la muerte del microorganismo. Es así como los microorganismos probióticos ingeridos en el alimento comienzan a sufrir estrés al llegar al estómago, por la secreción de ácido clorhídrico (HCl). En el estómago se segregan también enzimas para iniciar la digestión de la comida ingerida y convertirla en una densa masa líquida llamada quimo, que será neutralizada en el lumen duodenal por las secreciones del páncreas exocrino, hígado y jugo de la mucosa del intestino delgado (Sherwood, 2011; Succi *et al.*, 2005).

El éxito de sobrevivencia de las BAL en desarrollarse a valores de pH bajos es debido al equilibrio que genera con el exterior de la célula entre la producción de ácido láctico y de protones, el cual regula el pH interno y al mismo tiempo produce energía, considerándose un sistema eficaz para la célula. Una enzima que participa en esta regulación es la glutamato descarboxilasa, la cual incorpora iones hidrógeno para descarboxilar aminoácidos y así resistir el estrés a ambientes ácidos (Serrazanetti *et al.*, 2013; Vásquez *et al.*, 2009).

Una vez que la cepa ha logrado colonizar y adherirse al intestino grueso, la glucosa es metabolizada en ácidos orgánicos que provocan el descenso en el pH del medio el cual ayuda a difundir la parte no disociada del ácido láctico o acético, que atraviesa la pared celular de la célula patógena y evita que los microorganismos patógenos proliferen ahí (Serrazanetti *et al.*, 2013; Vásquez *et al.*, 2009).

## 2.10.2 Resistencia a Sales Biliares

La resistencia de los microorganismos a las sales biliares es una de las principales pruebas que se incluyen en la búsqueda de cepas con potencial probiótico debido a que no todas las cepas microbianas sobreviven a la acción de la bilis: las sales biliares son también una barrera antimicrobiana.

La bilis es sintetizada en los hepatocitos pericentrales del hígado, constituye un fluido acuoso alcalino (pH de 7.5-8) de compuestos orgánicos e inorgánicos como sales biliares (Figura 4), colesterol, fosfolípidos y bilirrubina el cual es un pigmento amarillo-verdoso que le da la coloración a la bilis (Begley *et al.*, 2005; Sherwood, 2011).

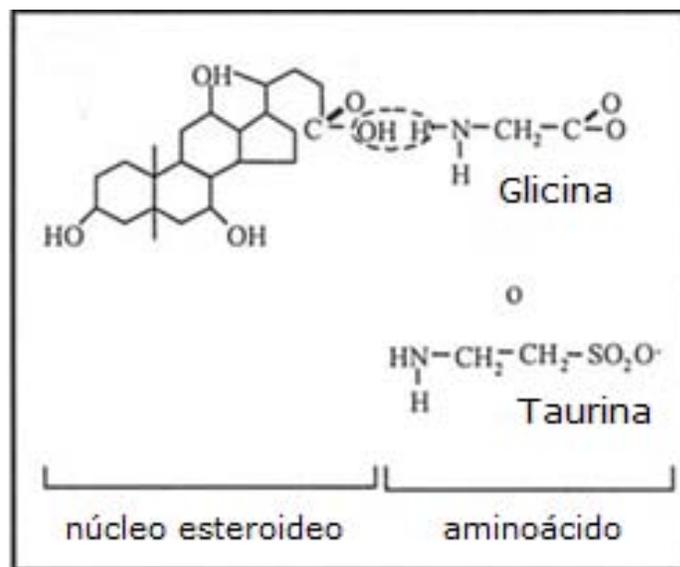


Figura 4. Estructura química de las sales biliares. El grupo carboxilo del ácido biliar se une mediante un enlace amida con el grupo amino de la glicina o taurina. (Begley *et al.*, 2006).

Las sales biliares son derivados del colesterol (parte hidrofóbica) unidos o conjugados con aminoácidos: glicina o taurina (parte hidrofílica y tiene carga negativa). Las sales biliares emulsifican los lípidos y vitaminas liposolubles, formando pequeñas micelas para incrementar el área superficial disponible y

puedan ser metabolizadas en el intestino. La bilis es vertida al duodeno para llevar a cabo la absorción y digestión de los lípidos ingeridos en la dieta (Ahn *et al.*, 2003; Begley *et al.*, 2006; Bi *et al.*, 2016; Reyes *et al.*, 2016; Sherwood, 2011).

La bilis altera la integridad y la permeabilidad de la membrana microbiana, debido a que también emulsifican los lípidos que están presentes en las membranas, lo que provoca la disociación de las proteínas integrales (además de un mal plegamiento o incluso desnaturalización) y la salida de los componentes intracelulares: la muerte celular es inminente, por lo que el desarrollo de mecanismos de defensa por parte de los microorganismos (tanto de los benéficos como de los patógenos) ha sido crucial para la adaptación y desarrollo en el tracto gastrointestinal (Begley *et al.*, 2005; Bi *et al.*, 2016; Succi *et al.*, 2005).

Las bacterias pueden soportar la presencia de sales biliares al refugiarse en los microambientes de alimento al no exponerse de manera directa a la bilis, esto se ha observado de manera experimental al encapsular bacterias en aceite de sésamo. La cantidad de sales biliares varía con el tiempo en el intestino (durante la ingesta de alimentos los niveles de sales biliares aumentan), lo que permite a las bacterias crear tolerancia a las sales biliares con cantidades mínimas de bilis al inducir proteínas para su adaptación en el ambiente del intestino (Begley *et al.*, 2005).

Estas proteínas juegan diversos papeles en la adaptación, como alterar la fluidez, permeabilidad o carga de la membrana celular, expresar proteínas que estén involucradas en el mantenimiento de homeostasis celular o secreción de proteínas al medio para modificar las sales biliares (Begley *et al.*, 2005).

Los probióticos, como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, por ejemplo, sintetizan una hidrolasa de sal biliar (BSH, EC 3.5.1.24) que es una enzima extracelular que actúa en la hidrólisis del enlace entre la glicina o taurina con la sal biliar libre. Gracias a este mecanismo de defensa por la enzima BSH, los probióticos pueden mantenerse en el intestino, sobrevivir a los efectos antibacterianos de la bilis y competir contra los microorganismos patógenos (Bi *et al.*, 2016; Bustos *et al.*, 2016; Liong & Shah, 2005; Noriega *et al.*, 2006).

De manera paralela, esta hidrólisis provoca que los ácidos biliares libres pierdan la capacidad emulsificante y el hígado tenga que sintetizar de novo más sales biliares (a partir de colesterol) para reponer las que se fueron al hígado por la circulación entero-hepática, por lo que favorece una reducción en los niveles de colesterol sérico en el organismo hospedero (Bi *et al.*, 2016; Bustos *et al.*, 2016; Liong & Shah, 2005; Noriega *et al.*, 2006).

### 2.10.3 Antagonismo microbiano y las BAL

En un ambiente determinado, hay una interacción constante entre microorganismos patógenos y microorganismos antagónicos, siendo éstos últimos los que evitan o suprimen, en la mayoría de los casos, situaciones de enfermedad. Es así como el antagonismo microbiano inhibe o causa la muerte de otro microorganismo mediante la producción y secreción de ciertos metabolitos a los cuales es susceptible (Pérez *et al.*, 2014).

Las BAL, producen diversas sustancias que tienen un efecto negativo o antagónico en algunas especies que causan enfermedades gastrointestinales y alimentarias en humanos y animales, como lo son: *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y especies

de *Bacillus*, entre algunas otras (Angmo *et al.*, 2016a; Fhoula *et al.*, 2013; Naidu, *et al.*, 1999).

Esta acción antagónica, ejercida por las BAL, evita la adherencia y/o replicación de las especies patógenas en el tracto gastrointestinal y puede darse por la disminución del pH a través de la producción de ácidos orgánicos (como el ácido láctico, acético o propiónico), la falta de nutrimentos disponibles para los patógenos, disminución del potencial redox en el medio o por la producción de peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Angmo *et al.*, 2016a; Fhoula *et al.*, 2013; Naidu, *et al.*, 1999).

Los ensayos de antagonismo se llevan a cabo al poner en contacto las dos cepas: la antagónica o la productora de sustancias antimicrobianas y la patógena o el microorganismo sensible, después de la incubación *in vitro* se observará un halo de inhibición del microorganismo sensible (Jeevaratnam *et al.*, 2005). A continuación, se describen algunas de las sustancias antimicrobianas que producen las BAL.

#### 2.10.3.1 Bacteriocinas

Son péptidos y proteínas que se sintetizan en los ribosomas y que actúan como sustancias bacteriostáticas y bactericidas sobre receptores específicos en las células blanco. La producción de estas sustancias antimicrobianas ocurre en la fase exponencial y está modulada por la temperatura, pH y nutrientes del medio, además que presentan mecanismos de acción muy variados en contra del crecimiento de microorganismos patógenos (Beristain *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2015; Liong, 2015; Savadogo *et al.*, 2006; Yusuf & Hamid, 2013).

Algunos ejemplos de bacteriocinas son: plantaricina (producido por *Lactobacillus plantarum*); pediocina, que se usa en animales y es producida

por *Pediococcus* spp.; la nisina (Producida por *Lactococcus* spp.) es la única bacteriocina aprobada por la FDA que se ha purificado y comercializado para el área de alimentos en humanos (Pérez *et al.*, 2015).

Las bacteriocinas producidas por las BAL son GRAS debido a que son fácilmente digeridos por las enzimas gástricas y pancreáticas antes de ser metabolizadas, no son tóxicas y su espectro de inhibición es mayor al de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativas. Su estabilidad y resistencia al calor se encuentra a rangos de pH bajos (Beristain *et al.*, 2012; Kaur, *et al.*, 2015; Yusuf & Hamid, 2013).

#### 2.10.3.2 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son el producto del metabolismo de los carbohidratos, los cuales al acumularse reducen el pH. Esta reducción de pH favorece el aumento del ácido no disociado (de origen lipofílico) que penetra en la pared celular de las bacterias Gram negativas hacia el citoplasma para ahí disociarse. Como consecuencia, aumenta la concentración de protones, superando el equilibrio intracelular, por lo que la célula agota sus reservas energéticas al expulsar al exterior el exceso de protones (la célula utiliza la bomba de protones para ello), provocando que el pH interno disminuya y la célula muera por la desnaturalización de proteínas y funciones celulares como la inhibición de ATP (Naidu *et al.*, 1999; Rykers & Theron, 2012; Vásquez *et al.*, 2009).

Los ácidos orgánicos producidos principalmente por las BAL son el ácido láctico y el ácido acético, por el pK, el ácido acético (pK= 4.7) tiene mejor actividad antimicrobiana que el ácido láctico (pK=3.8), pero en conjunto actúan mejor, aumentando el espectro antimicrobiano contra bacterias gram positivas y gram negativas (Naidu *et al.*, 1999; Rykers & Theron, 2012; Vásquez *et al.*, 2009).

### 2.10.3.3 Peróxido de hidrógeno

Las BAL al ser microorganismos anaerobios aerotolerantes (Apéndice A), pueden crecer en presencia de oxígeno, para eso han desarrollado mecanismos enzimáticos para contrarrestar los efectos oxidativos celulares y así asegurar la supervivencia en el medio (Vásquez *et al.*, 2009).

En presencia de oxígeno molecular, las BAL generan peróxido de hidrógeno, el cual es un agente antimicrobiano que se acumula en el medio y oxida los constituyentes celulares de otros grupos microbianos (como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos) que son susceptibles a este compuesto (Vásquez *et al.*, 2009).

Las enzimas con las que las BAL pueden eliminar el oxígeno molecular del medio y producir peróxido de hidrógeno son: super oxido dismutasa (SOD), NADH peroxidasa, NADH oxidasa, piruvato oxidasa y  $\alpha$ -Glicerofosfato oxidasa. Estas enzimas se encuentran en el citoplasma (Apéndice E) (Condon, 1987; Higuchi *et al.*, 2000).

### 2.10.3.4 Diacetilo

El diacetilo o 2,3-butanodiona es un compuesto antimicrobiano y selectivo producido por las BAL heterofermentativas (y algunos otros microorganismos). Es considerado como GRAS debido a que no es tóxico y su efecto antimicrobiano tiene impacto sobre las bacterias Gram negativas y levaduras (Hao *et al.*, 2017; Jyoti *et al.*, 2003; Lanciotti *et al.*, 2003).

## 2.11 Uso y aplicaciones de los microorganismos en suelo

### 2.11.1 Biorremediación

La biorremediación utiliza organismos vivos (bacterias, hongos, plantas, etc.) para transformar sustancias orgánicas que muchas veces son tóxicas a productos menos tóxicos e inofensivos al ambiente. Esta transformación depende de la capacidad del organismo, para que pueda obtener reservas energéticas para vivir y desarrollarse al impulsar y generar las condiciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos que residen ahí y llevar a cabo la biorremediación; los parámetros que se controlan son: el pH, el oxígeno, la temperatura y suministro de nutrientes para enriquecer el medio (Volke & Velasco, 2002).

Los procesos catabólicos que realiza el organismo al degradar el sustrato que se quiera transformar, son de gran interés, de eso depende el producto inocuo que se quiera obtener al realizar el proceso de biorremediación. Esta tecnología utiliza microorganismos que ya residen ahí de manera natural (autóctonos) o son incorporados de otros sitios (exógenos); se puede llevar a cabo en el mismo lugar o no (*in situ* o *ex situ*), con o sin presencia de oxígeno (Volke & Velasco, 2002).

La Biorremediación en fase sólida o también llamado composteo es llevada a cabo en condiciones controladas al cual se le adiciona compuestos orgánicos biodegradables como paja, estiércol, aserrín, etc., con el objetivo de mejorar y enriquecer los nutrientes del medio (Volke & Velasco, 2002).

### 2.11.2 Las BAL y los Microorganismos efectivos (EM)

Los microorganismos efectivos (sigla en inglés de effective microorganisms, EM) son consorcios de microorganismos de origen natural, sin modificación genética, inofensivos y no tóxicos, caracterizándose por la coexistencia de microorganismos aerobios y anaerobios que son aplicados en la agricultura para reacondicionar suelos, mejorar la calidad de las plantas, semillas y frutos, así como la aplicación en animales para obtener un beneficio en la salud y mejorar su estado nutricional (Higa & Parr, 1994; Olle & Williams, 2013).

Este consorcio está compuesto mayormente de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Streptococcus lactis*, *Propionibacterium freudenreichii*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*), en menor cantidad bacterias fotosintéticas (*Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides*), actinomicetos (*Streptomyces albus*, *S. griseus*) y hongos (*Aspergillus oryzae*, *Mucor hiemalis*) los cuales conviven entre sí en un cultivo líquido a un pH de 3.5-4 (Cóndor *et al.*, 2007; Ndonga *et al.*, 2011; Higa & Parr, 1994; Olle & Williams, 2013).

Esta idea fue desarrollada por el Profesor Teruo Higa en la Universidad de Ryukyus en Okinawa, Japón alrededor de 1980 (Higa & Wididana, 1991). La preparación de EM se ha comercializado en más de 120 países durante 30 años; tiene varias aplicaciones, como, por ejemplo: estimular la mineralización de sustrato, acelerador en la descomposición de lodos reduciendo el mal olor, uso alternativo de productos químicos para limpieza en el hogar entre otros ("EMRO Japan", 2018).

También se vende el producto EM<sup>®</sup>1 como una aplicación para reducir los malos olores, compostaje de residuos sólidos y sanidad en la producción avícola y porcina (Ficha técnica del producto AMBIEM Ltda, 2018a; Ficha técnica del producto AMBIEM Ltda, 2018b).

Desde ese momento se ha desarrollado y empleado mucho esta técnica, la cual se ha aprobado en diversos países entre ellos Estados Unidos por medio del departamento de agricultura, catalogando a los EM como GRAS por la FDA (Food and Drug Administration), así mismo diferentes industrias han comercializado productos con EM para su empleo en la agricultura y ganadería.

Los EM son usados también como "bokashi". Bokashi es una fermentación de compuestos orgánicos (como el salvado de trigo) adicionando EM. Es una estrategia adicional para optimizar la productividad en el campo de la agricultura (Ndona *et al.*, 2011).

#### 2.11.2.1 EM y su aplicación en animales

La producción avícola o porcina se lleva a cabo con la explotación intensiva de estos animales para consumo humano. Dicha práctica trae riesgos para los animales, debido a la alta densidad de la población en espacios reducidos, cambios en la dieta (tanto en composición como en proporción), variaciones en la temperatura ambiental, enfermedades por microorganismos, patologías digestivas y respiratorias, además de la acumulación de gases tóxicos y heces (Hoyos *et al.*, 2008; Ladino & Rodríguez, 2009; Rondón *et al.*, 2008).

Esto genera mucho estrés en los animales, desencadena el desarrollo de microorganismos patógenos, se crea un desequilibrio en la flora intestinal del animal y provoca la disminución del estado de salud, por lo que el rendimiento en la producción disminuye y el costo por vacunas o antibióticos aumenta (Hoyos *et al.*, 2008; Ladino & Rodríguez, 2009; Rondón *et al.*, 2008).

Los antibióticos se usan con el fin de erradicar alguna infección bacteriana (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, etc) o bien, como suplemento alimentario para incrementar la eficiencia en el crecimiento y

desarrollo de los animales (Blajman *et al.*, 2015; Florou-Paneri *et al.*, 2013; García *et al.*, 2016; Giraldo *et al.*, 2015; Liong, 2015).

Pero su uso se ha restringido o prohibido debido a que los patógenos se han hecho resistentes a muchos antibióticos por lo que existe un riesgo alto de que ocurra una transferencia de genes resistentes desde los animales de consumo humano a la microbiota intestinal de humanos (Blajman *et al.*, 2015; Florou-Paneri *et al.*, 2013; García *et al.*, 2016; Giraldo *et al.*, 2015; Liong, 2015).

De igual manera, se ha visto que la carne o los huevos (que son comercializados para consumo humano), quedan contaminados con residuos de antibióticos, presentando hipersensibilidad en los consumidores humanos y desarrollo de resistencia hacia ese medicamento. Por ejemplo, la administración de la tetraciclina a las aves de corral deja residuo en sus huevos (Blajman *et al.*, 2015; Florou-Paneri *et al.*, 2013; García *et al.*, 2016; Liong, 2015).

Todo esto ha llevado a la búsqueda de otros recursos y alternativas tecnológicas como es el uso de probióticos o EM<sup>®</sup> en el agua y alimentación de los animales, ya que es un buen agente desodorizante, además que incrementa el equilibrio en la flora bacteriana y la digestibilidad del alimento impactando en un aumento de peso y en la salud de estos animales (Hoyos *et al.*, 2008; Ladino & Rodríguez, 2009; Liong, 2015).

Este impacto positivo se debe a que los microorganismos efectivos (EM<sup>®</sup>), al colonizar el tracto digestivo promueven la asimilación y digestibilidad de carbohidratos, lípidos y proteínas lo que aumenta la disponibilidad de los aminoácidos, además crean ambientes poco favorables para los patógenos confiriendo resistencia a enfermedades y mejoran el sistema inmune (Hoyos *et al.*, 2008; Ladino & Rodríguez, 2009; Liong, 2015).

Otro punto positivo del uso de los EM es que no deja residuos en la carne o huevos, por lo que se asegura su uso para comercio humano (Hoyos *et al.*, 2008; Ladino & Rodríguez, 2009; Liong, 2015).

### 3. Antecedentes

El grupo de investigación en el Colegio de Postgraduados (COLPOS) se dedica a la búsqueda de microorganismos eficientes para el beneficio de la salud de animales domésticos para consumo humano (lechones).

En el municipio de Chiautzingo se recolectó una muestra de tierra la cual tuvo una preparación especial (como se detallará más adelante). Este grupo de investigación encontró que al dársela de comer a los lechones favorecían su crecimiento.

#### 3.1 Localización de la muestra

La muestra de suelo fue recolectada del monte, en el municipio de Chiautzingo, Puebla, a 45 min aproximadamente del Colegio de Postgraduados (COLPOS). Esta región es una zona de encinos cerca del volcán Iztaccihuatl, en donde no hay animales (Figura 5).

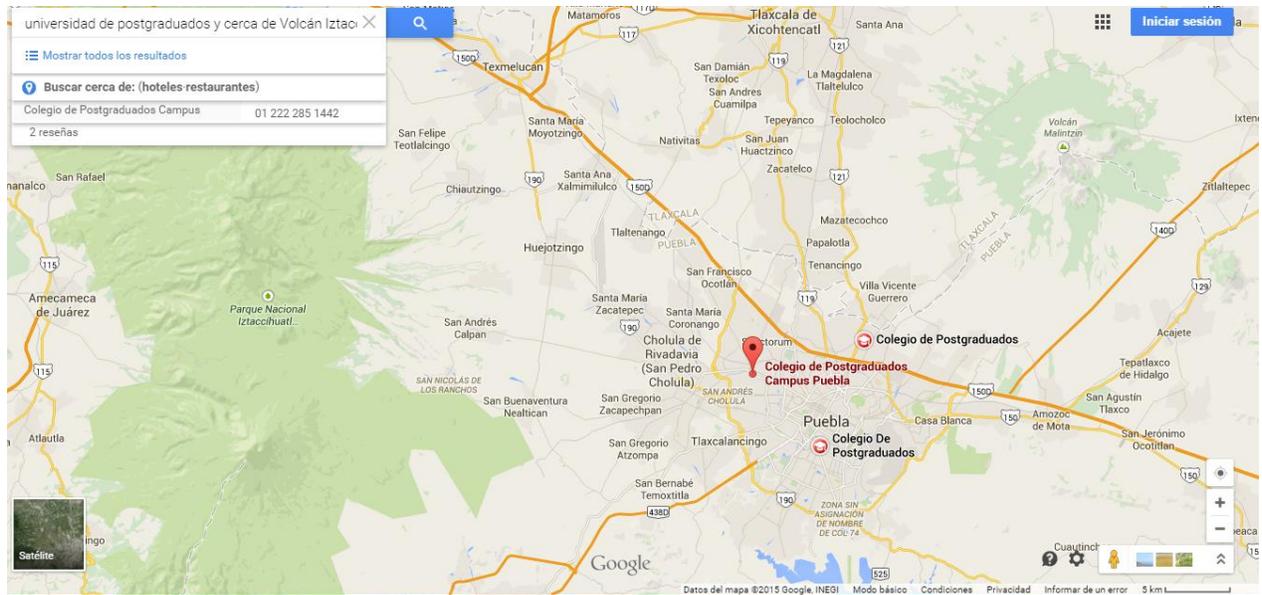


Figura 5. Localización geográfica de la Región donde fue recolectada la muestra (google earth, 2018).

## Capítulo II

### Planteamiento del problema

#### 4. Justificación

En la industria porcina se están buscando alternativas para preservar la salud de estos animales y disminuir el empleo de antibióticos. Se busca eliminar patologías digestivas derivadas de la administración de antibióticos que alteran la microbiota intestinal benéfica (Cortés & Gómez, 2011). Las bacterias ácido lácticas (BAL) al ser consideradas por la OMS y FAO como probióticos, mantienen una relación simbiótica muy importante con el sistema gastrointestinal del organismo hospedero (Morelli & Capurso, 2012).

Es así como las BAL brindarán a los cerdos protección inmunológica, impidiendo la adhesión de microorganismos patógenos y controlarán la homeostasis en el intestino, el cual tendrá un impacto positivo en el aumento de peso, al promover la asimilación de carbohidratos, lípidos y proteínas al incrementar la disponibilidad de los aminoácidos, la cual se verá reflejada en la salud de estos animales. Las BAL se han aislado de diferentes ambientes como productos lácteos o heces fecales de lactantes para consumo humano, siendo el suelo un ambiente poco explorado para encontrar BAL y ser empleadas como probióticos el en consumo animal o humano.

Con la tecnología probada sobre los microorganismos efectivos (EM) creada en Japón alrededor de los años 80's, se han encontrado una serie de microorganismos efectivos, los cuales en diferentes países se han evaluado con diferentes animales generando resultados exitosos, por lo que la búsqueda de BAL en este biopreparado puede resultar en una aplicación beneficiosa en lechones y animales domésticos de consumo humano.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Aislar e identificar las bacterias ácido lácticas con potencial probiótico presentes en un biopreparado de suelo.

### 5.2 Objetivos particulares

- ✓ Aislar bacterias ácido lácticas empleando medios de cultivo selectivos a partir del biopreparado de suelo.
- ✓ Verificar que las bacterias aisladas no presenten actividad para la enzima catalasa.
- ✓ Caracterizar su metabolismo mediante pruebas bioquímicas y el uso de tiras API®.
- ✓ Extraer y purificar el ADN de las cepas seleccionadas.
- ✓ Amplificar la región del gen ribosomal 16S mediante la técnica de PCR punto final.
- ✓ A partir de las secuencias obtenidas, elaborar y analizar los árboles filogenéticos construidos para establecer la historia evolutiva de los microorganismos aislados.
- ✓ Evaluar y seleccionar las cepas aisladas con base en ensayos que permitan considerarlas como probióticas.

## 6. Hipótesis

Si el tratamiento que presenta el biopreparado favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas, entonces se podrán aislar e identificar BAL que presenten potencial probiótico.

# Capítulo III

## 7. Desarrollo experimental

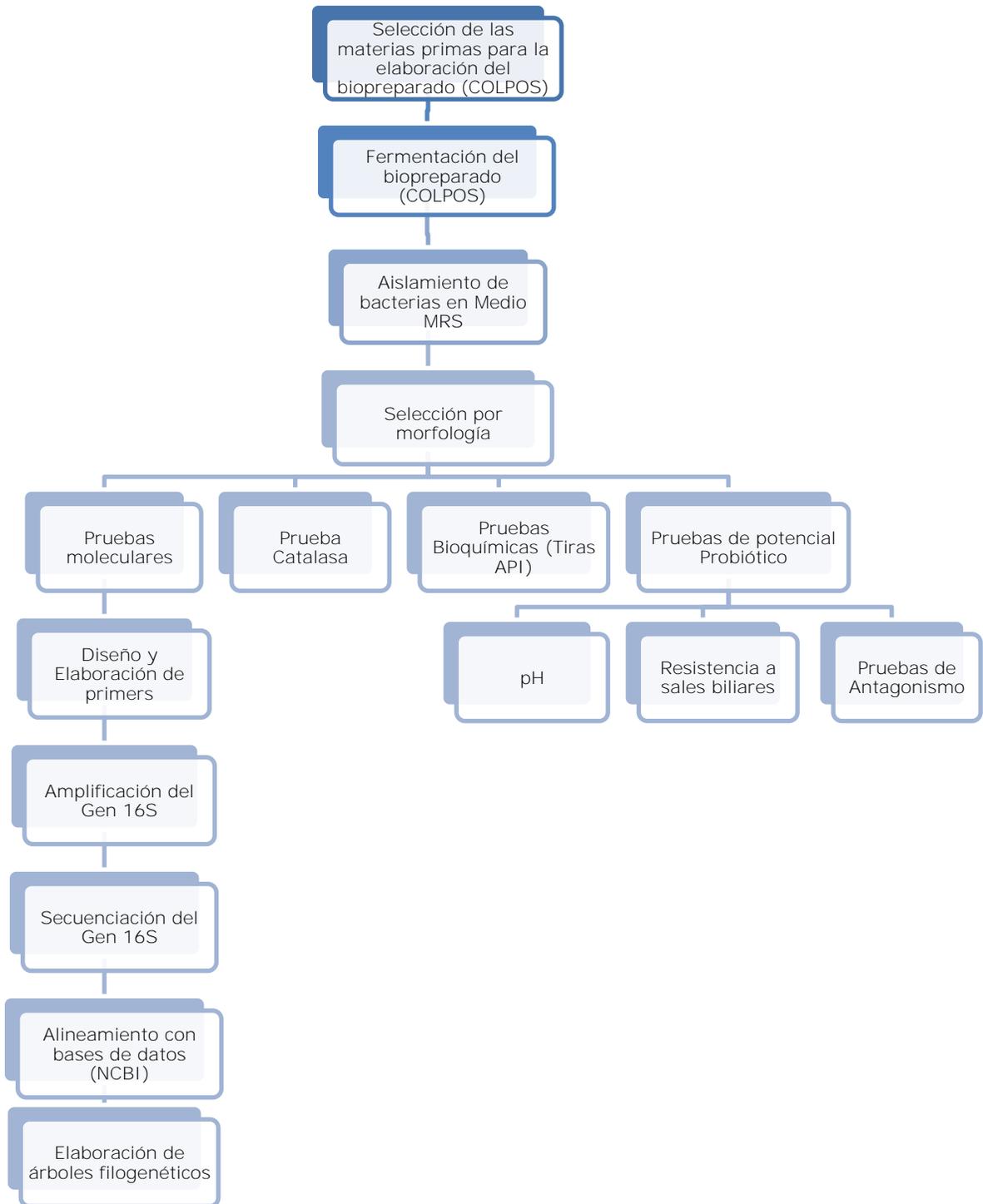


Figura 6. Diagrama de flujo de la estrategia experimental

## 7.1 Origen y elaboración del biopreparado

Las muestras que se analizaron en el laboratorio provienen del biopreparado, y fueron tomadas de una fermentación sólida anaerobia a partir de una porción de suelo. El biopreparado se elaboró con un costal de tierra (hojarasca) recogida de un monte en el cual crecen encinos y otro costal recogido en un bosque que se encuentra en la ladera del volcán Popocatepetl. Ese material en descomposición fue mezclado con 40 Kg de salvado de trigo y 20 L de melaza diluida con agua de lluvia colectada en un tanque de cemento. La mezcla preparada se comprimió a fin de retirar el oxígeno y se tapó. La mezcla se dejó fermentar 22 días, cerrado herméticamente (este procedimiento se realizó en el COLPOS).

## 7.2 Muestreo y manipulación de la muestra que provenía del biopreparado

A partir de esa fermentación que duró 22 días, se recolectó una porción en un frasco de vidrio para su posterior análisis. En el laboratorio bajo condiciones de asepsia se realizó un muestreo aleatorio estratificado, en el cual la muestra de tierra se subdividió en subgrupos y en cada estrato se realizó un muestreo aleatorio simple (Volke *et al.*, 2005). Brevemente, se vació el contenido del frasco a una hoja de papel resistente aproximadamente de 15 cm<sup>2</sup>, se homogenizó la muestra y se dividió la tierra en 4 partes iguales numerándolas del 1 al 4 en sentido de las manecillas del reloj, esto con el fin de obtener una muestra lo más representativa posible.

Se tomó y separó las fracciones 1 y 3 y se colocaron en el frasco original. Las fracciones 2 y 4, que quedaron en la hoja de papel, se homogenizaron con la espátula y se realizó un nuevo fraccionamiento.

Se tomaron las fracciones 2 y 4 y se regresaron al frasco inicial. Las fracciones que quedaron en la hoja de papel se homogenizaron con la espátula. Este procedimiento se repitió hasta obtener solo 10 gramos de tierra.

### 7.3 Aislamiento de BAL

En condiciones de asepsia, se transfirieron los 10 gramos de tierra en una bolsa estéril para "Stomacher" y se le añadieron 90 ml de solución isotónica de cloruro de sodio estéril a una concentración de 0.85 %. Se realizó el homogenizado de la muestra en un "Stomacher", a una velocidad normal durante 1 min.

Se hicieron diluciones decimales a partir del homogenizado obtenido hasta la dilución  $10^{-7}$ , tomando 1 ml del homogenizado y diluyéndolo en 9 ml de solución isotónica de cloruro de sodio estéril a una concentración de 0.85 %.

Se depositaron 200  $\mu$ l de la dilución en cajas Petri con medio estéril. Se realizó un estriado para poder aislar los microorganismos (Figura 7).

Los medios de cultivo empleados fueron Agar nutritivo y Agar MRS, se esterilizaron a 121°C por 15 min y aproximadamente a una temperatura de 37°C se añadió nistatina como antifúngico.

Se dejó incubar las cajas inoculadas con Agar nutritivo y MRS a una temperatura de 37°C por 48 h (Difco & BBL Manual, 2009; HiMedia Laboratories, 2012; Rogosa *et al.*, 1951).

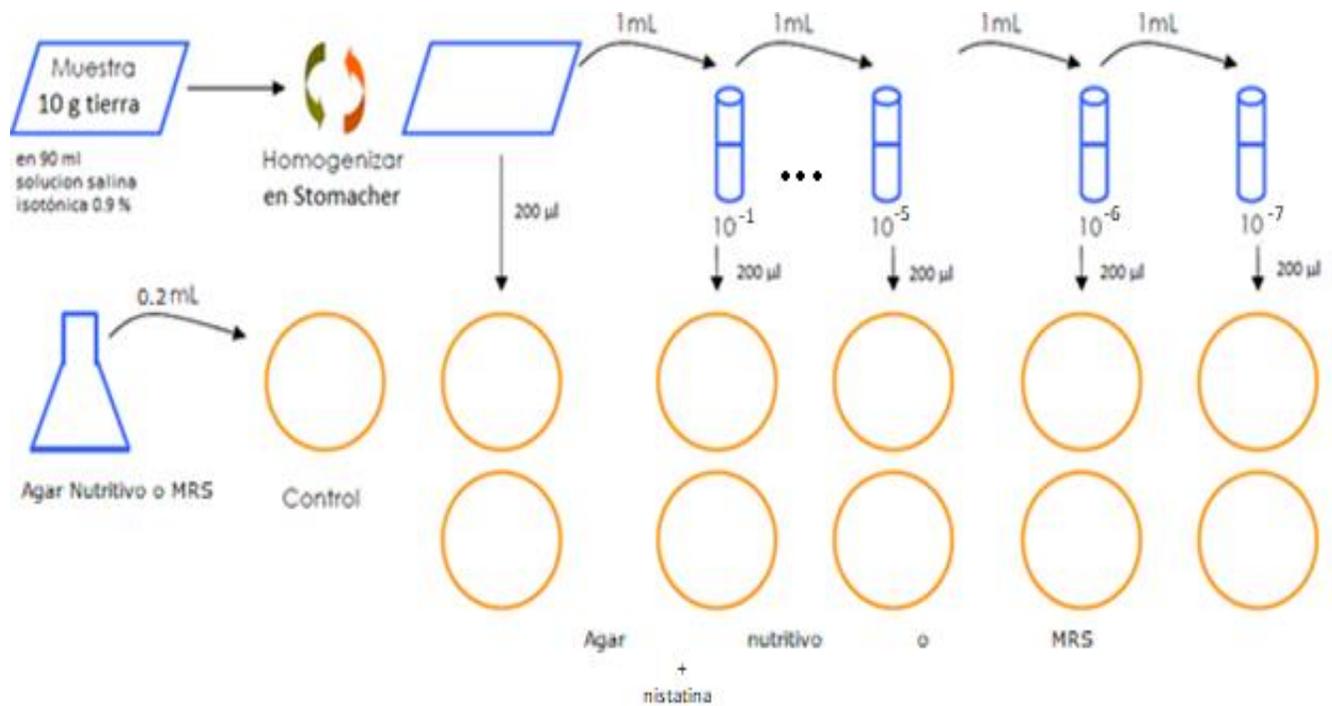


Figura 7. Descripción gráfica de la técnica de vertido en placa (Ramírez *et al.*, 2013).

#### 7.4 Análisis morfológico

Se seleccionaron 20 colonias al azar por tinción de Gram, pero solo 9 presentaron una tinción de Gram positiva y con morfología uniforme. Se utilizó a *Lactobacillus paracasei* como cepa control (Ramírez *et al.*, 2013).

#### 7.5 Prueba de catalasa

De cada colonia que creció en el agar MRS se tomó una asada y en un portaobjetos se añadió 0.3 ml de peróxido de hidrógeno al 3%. Se realizó la misma prueba para la colonia control.

La prueba se considera positiva si hay presencia de burbujas en la colonia. La prueba se considera negativa por la ausencia de burbujas.

## 7.6 Pruebas bioquímicas

Se realizó el perfil bioquímico a las 9 colonias aisladas, mediante la galería API® 50 CH de la marca de Biomerieux®; para la realización de estas pruebas se siguió las instrucciones del fabricante (Biomériux, 1989). El inóculo de cada una de las 9 cepas se estandarizó de acuerdo con la escala número 2 de Mc Farland (Patrón de turbidez BBL preparado, 2005) y se aplicó a la galería API® 50 CH. Se dejó incubar por 48 horas a 37 °C. Posteriormente, se anotó que pozos si tuvieron cambio en el color y esos datos se ingresaron al programa Apiweb™ proporcionado por el fabricante Este programa ya tiene una base de datos que permite identificar a la cepa por género, especie y/o subespecie.

## 7.7 Pruebas genéticas

Para identificar genéticamente a cada una de las 9 cepas, se amplificó la región que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma 16S, mediante el uso de cebadores específicos para la amplificación de este gen (Tabla 1) (Weisburg *et al.*, 1991).

Tabla 1. Información y secuencia de los cebadores utilizados  
(Weisburg *et al.*, 1991).

Cebador cadena directa (secuencia 5'-3')	FD1 ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Temperatura de fusión (Tm) 55 °C	% Guanina- Citosina 51.3
Cebador cadena reversa (secuencia 5'-3')	RD1 cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC	Temperatura de fusión (Tm) 55 °C	% Guanina- Citosina 60.6

### 7.7.1 Preparación de la muestra

Cada una de las 9 cepas se cultivó en 10 ml de medio caldo MRS por 24 h a 37°C. Se midió la densidad óptica a 600nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (U.V.) y la concentración celular se ajustó aproximadamente a 1.0 de absorbancia para tener suficientes células para la extracción de ADN.

### 7.7.2 Extracción de ADN

Para aislar el DNA genómico se utilizó el kit Fast ID de la marca Genetic DNA, INC. La extracción de ADN se realizó según el protocolo descrito por el proveedor del kit Fast ID, al cual se le realizaron algunas modificaciones (Genetic ID NA, Inc, 2017). La metodología se describe a continuación.

Se diluyó la proteinasa K en 2 mL de agua grado biología molecular, a fin de obtener una solución 10 mg/mL. Se concentró el paquete celular en un tubo para centrifuga de 2 mL, y se agregó 1 mL de buffer de Lisis, 3 µL de Lisozima (1 mg/mL) y 10 µL de Proteinasa K. Se diluyó completamente y se incubó a 65 °C durante 30 minutos (min) en el equipo Thermomixer. Se agregaron 500 µL de cloroformo y se agitó vigorosamente en el vórtex por 5 segundos (s). Se centrifugó a 10,000 rpm, 5 min. Se tomó la fase superior, sin tocar la capa intermedia y se pasó a otro tubo para centrifuga de 2 mL.

Se agregaron 500 µL de Buffer de unión y se agitó en el vórtex brevemente. Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. Se pasó el sobrenadante a través de una de las columnas para retención de ADN mediante centrifugación (10,000 rpm, 1 min). Se agregaron 650 µL de buffer de lavado y se centrifugó a 10,000

por 1 min. Se realizaron tres lavados con EtOH al 75 % (se agregaron 650  $\mu$ L de etanol y se centrifugó a 10,000 por 1 min cada vez). Se desechó el alcohol colectado y se secó la columna mediante un centrifugado de 1 min a 12,000 rpm. Se colocó la columna en un tubo nuevo para centrifuga de 1.6 mL y se agregaron 50  $\mu$ L de Buffer TE previamente calentado a 65 °C. Se calentaron las muestras a 65 °C durante 10 min. Pasado el tiempo se centrifugó 1 min a 13,00 rpm, para eluir y colectar el ADN. Repetir con otros 50  $\mu$ L de buffer TE. Se conservó el ADN colectado a -20°C.

### 7.7.3 Cuantificación de ADN de las 9 cepas

Se cuantificó el ADN aislado en un espectrofotómetro de la marca BIOTEK modelo EPOCH, y se elaboró un gel de agarosa al 1 % para corroborar la integridad de ADN después de la extracción; se corrió en una cámara para electroforesis a 80 volts por aproximadamente 30 min. La muestra fue teñida con bromuro de etidio y se reveló bajo luz ultravioleta.

### 7.7.4 Amplificación de la región ADN ribosomal 16S

Para la amplificación del gen ribosomal 16S se mandaron a construir los cebadores (primers) en SIGMA-Aldrich (Tabla 1). Se amplificó la región de ADN que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma 16S en un termociclador de la marca APPLIED BIOSYSTEMS modelo Veriti 96 well (Tabla 2 y 3). Se elaboró un gel de agarosa al 1 % (para corroborar la integridad del PCR) en una cámara para electroforesis y se corrió a 90 volts por aproximadamente 30 min. La muestra fue teñida con bromuro de etidio y se reveló bajo luz ultravioleta.

Tabla 2. Concentración de los componentes utilizados para llevar a cabo la amplificación del gen ADNr 16S en PCR tiempo final (PCR<sub>TF</sub>).

Componente	Stock	Concentración final	Para 1 reacción
dNTP's	10 mM	0.2 mM	1 µl
Buffer +MgCl <sub>2</sub>	10 x	1 x	5 µl
Enzima Pfu	2.5 U/ µl	1.25 U <small>totales</small>	0.5 µl
Primer Fw	10 µM	0.2 µM	1 µl
Primer Rv	10 µM	0.2 µM	1 µl
ADN	10 ng/ µl	50 ng <small>totales</small>	5 µl
Agua	5 ml	-	36.5 µl

Cebador Fw=cadena directa; cebador Rv=cadena reversa

Tabla 3. Condiciones de PCR<sub>TF</sub> para la amplificación del gen ADNr 16S

Etapa	Condiciones	Ciclos
Apertura de la cadena	95 °C, 10 min	1
Desnaturalización	95 °C, 2 min	35
Unión de cebadores	55 °C, 30 s	
Elongación	72 °C, 1 min	
Término	72 °C, 10 min	1

#### 7.7.5 Electroforesis previa a la purificación de ADN

Se elaboró un gel de agarosa al 1% y se corrió en una cámara para electroforesis a 90 volts por 30 min, el gel se reveló con bromuro de etidio y se visualizó en el equipo GEL DOC XR+ de la marca de BIORAD modelo universal Hood II. Para obtener resultados óptimos, se cortaron las bandas del gel con un peso molecular de 1500 pb.

#### 7.7.6 Purificación de ADN mediante kit GenElute™ Minus EtBr Spin Columns

Las bandas se purificaron con el kit GenElute™ Minus EtBr spin columns de la marca de SIGMA de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Se colocó una columna del kit GenElute menos EtBr spin en un tubo eppendorf para recolectar el ADN. Se lavó la columna de centrifugación añadiendo 100  $\mu$ l de **1 x TE (10mM Tris, pH 8.0, con EDTA 1 mM)**. Se centrifugó la columna a una máxima velocidad 14,000 rpm durante 5-10 s (la columna no debe dejarse secar). Se descartó el eluido de lavado. Se cargó el trozo cortado del gel en la columna y se centrifugó a una máxima velocidad 14,000 rpm durante 10 min. El ADN recolectado y purificado está listo para mandarse a secuenciar. El ADN se almacenó a -20°C para su envío.

#### 7.7.7 Secuenciación del ADN purificado

Las muestras se mandaron a la empresa MACROGEN Korea para conocer la secuencia genética del ADN ribosomal 16S de los 9 microorganismos.

#### 7.7.8 Análisis de secuencias

Las secuencias de las cepas enviadas por Macrogen fueron ingresadas en el programa BLAST para nucleótidos y fueron comparadas con las secuencias en el banco de datos de NCBI (National Center of Biotechnology) (Madden, 2013). Se tomaron las secuencias con mayor similitud y se alinearon con el programa Multalin (Corpet, 1988) y Clustal W (Larkin *et al.*, 2007).

## 7.8 Árbol filogenético

Se elaboró un árbol filogenético con las secuencias de ADN ribosomal 16S de las cepas del biopreparado y las secuencias que fueron similares a éstas en el BLAST. Se utilizó el programa Mega 6 bajo el método de Neighbor-Joining y fue inferido entre 10,000 remuestreos; se calculó la distancia filogenética con el método Tamura-Nei (Saitou & Nei, 1987; Tamura & Nei, 1993; Tamura *et al.*, 2013).

## 7.9 Pruebas de actividad probiótica

Se determinaron en las 9 cepas las siguientes pruebas probióticas.

### 7.9.1 Resistencia a la acidez gástrica

Para evaluar la resistencia que tienen las cepas a crecer en pH ácido, se realizó una prueba cualitativa en la que se inocularon 100 µL de cada una de las 9 cepas y el control en 2 ml de caldo MRS con diferentes valores de pH. Cada cepa se inoculó a pH 3, 4, 5.5 y 7. Las cepas se dejaron crecer 24 h a 37 °C en condiciones microaerofílicas y se observaron resultados.

La resistencia a la acidez se considera positiva si se observa turbidez en el medio. La prueba es negativa si no se observa turbidez.

### 7.9.2 Resistencia a las sales biliares

Con esta técnica se cuantificó la resistencia a las sales biliares de las 9 cepas. En la primera corrida llamada serie testigo se hizo con el fin de ver si la cepa a evaluar era viable y cuantificar el número de colonias que crecieron en el agar MRS. Se tomó 1 ml de un cultivo fresco de cada cepa y se depositó en 9 ml de caldo MRS; en total la serie se conformó de 6 tubos de ensayo que correspondieron a las de diluciones decimales  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

Para evaluar la resistencia a las sales biliares, es decir, cuantificar la sobrevivencia de las células al tratamiento, se tomó 1 ml de un cultivo fresco de cada cepa y se depositaron en 9 ml de caldo MRS, en esta corrida se le añadió al caldo MRS sales biliares de buey a una concentración de 0.5 % de la marca Sigma. Esta serie se conformó de 6 tubos de ensayo que correspondieron a las de diluciones decimales  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

En las dos series decimales **se tomó 1  $\mu$ l de la cepa a evaluar** y se depositó en cajas Petri con agar MRS. Se incubaron a 37 °C por 24 h. Se observaron resultados. Se realizó un conteo de las colonias sobrevivientes al tratamiento con sales biliares y se comparó con las colonias que crecieron en la serie testigo.

### 7.9.3 Pruebas de actividad antagónica

Para reactivar las 9 cepas, se sembraron en caldo BHI (medio rico en nutrientes para microorganismos de difícil desarrollo), se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente se preparó agar BHI y se esterilizó a 121 °C durante 15 min. Se vació el agar en cajas Petri de plástico de 100 x 15 mm y se esperó a que solidificaran. Se hizo una estría en el centro de la caja con la cepa a

probar y se dejó incubar por 24 h a 37°C. Después de que se corroboró que había crecimiento en la cepa principal, se hicieron estrías horizontales a cada lado de la cepa central sin tocarla (Figura 8).

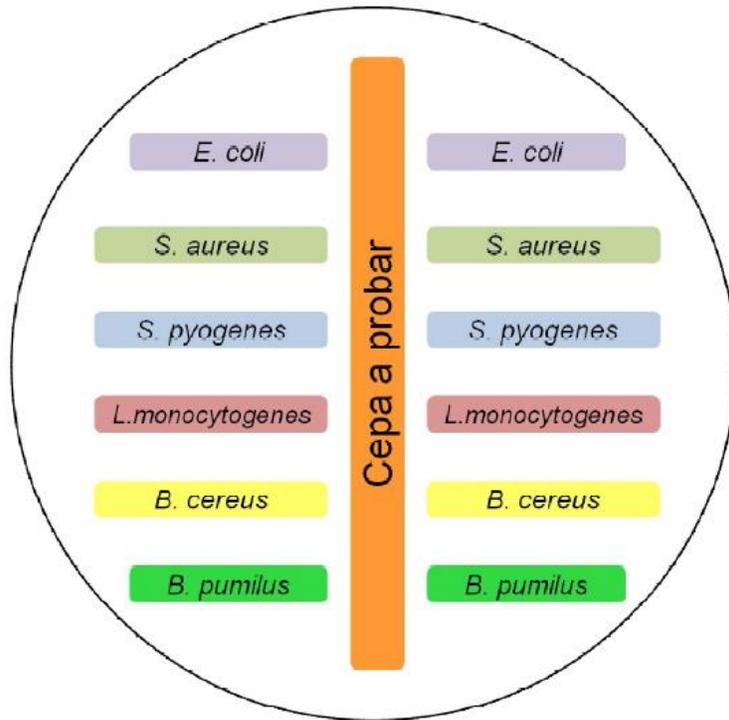


Figura 8. Método para la prueba de antagonismo. (Imagen elaborada para este trabajo)

Las cepas utilizadas fueron: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Bacillus pumilus*, en todas las cajas Petri se conservó ese mismo orden y se realizó por duplicado. Se observaron resultados (Figura 8).

La prueba se considera como positiva si la cepa a probar produce un halo de inhibición a lo largo de la cepa patógena. La prueba de antagonismo es negativa si hay crecimiento del patógeno en donde se realizó la estría horizontal.

## Capítulo IV

### 8. Resultados

#### 8.1 Características físicas y sensoriales del biopreparado

Se inspeccionó la apariencia que tuvo la muestra que se fermentó anaeróbicamente; se percibió un aroma dulce, con notas fermentadas. Es de color café oscuro, contiene restos de semillas, hojas, palos delgados y degradados de distintos tamaños, piedras pequeñas y restos de materia orgánica en descomposición (Imagen 1).



Imagen 1. Muestra total de la fracción que provenía del biopreparado.

#### 8.2 Muestreo y manipulación del biopreparado

Con el fin de tomar una muestra representativa del frasco proveniente del biopreparado, se realizó un muestreo aleatorio estratificado. La muestra se fraccionó en 4 hasta pesar 10 gramos para llevar a cabo la técnica de vertido en placa (Imagen 2).



Imagen 2. Fraccionamiento de la muestra en el sentido de las manecillas del reloj y pesaje de la muestra.

### 8.3 Crecimiento de cepas

Las cepas se obtuvieron después de 24 h de crecimiento obteniendo los siguientes resultados mostrados en las tablas 4 y 5; se observa el aislamiento de colonias en las imágenes 3 y 4. La diferencia en la masa microbiana en cada medio de cultivo (agar nutritivo y agar MRS) es debido a que el agar MRS está enriquecido, por lo que facilitó el crecimiento de microorganismos con requerimientos nutritivos exigentes.

Tabla 4. Características de las colonias en Agar nutritivo.

Inóculo	Conteo de microorganismos (UFC/g muestra)	Descripción de las colonias en el medio Agar nutritivo
Control (sin inóculo)	0	Sin crecimiento
Muestra de biopreparado	$2.2 \times 10^5$	Colonias grandes, bordes enteros circulares enteros, de elevación convexa.



Imagen 3. Colonias en medio Agar nutritivo

Tabla 5. Características de las colonias en Agar MRS

Inóculo	Conteo de microorganismos (UFC/g muestra)	Descripción de las colonias en el medio Agar MRS
Control (sin inóculo)	0	Sin crecimiento
Muestra de biopreparado	$1.5 \times 10^7$ UFC/g	Presentaron colonias pequeñas de forma puntiforme, de bordes enteros circulares, con una elevación convexa, de textura cremosa, y colores que van del color blanco al crema claro y oscuro.

#### 8.4 Selección de cepas

Del Agar MRS (Imagen 4a) se seleccionaron 20 colonias al azar, al realizar la tinción de Gram se descartaron 11 colonias que presentaban tinción Gram negativa. Las 9 colonias que se conservaron presentaron las siguientes características: Tinción de Gram positiva, con morfología de bacilos; no se encontraron otras morfologías (Tabla 6). La Imagen 4b muestra un ejemplo de un aislamiento por estría de una de las colonias.

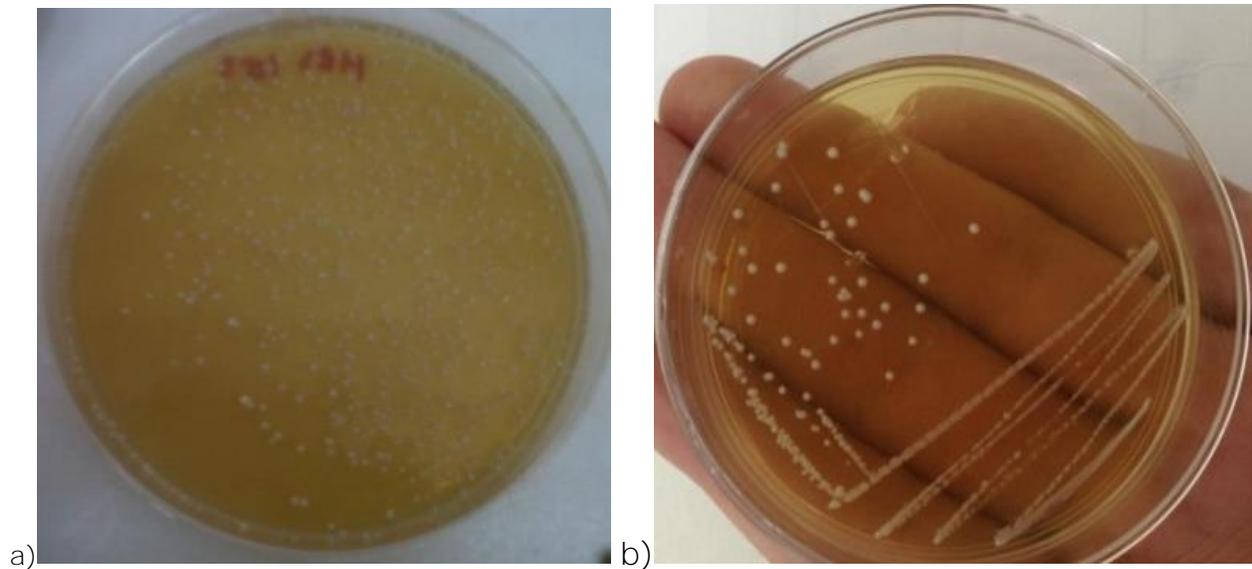


Imagen 4. a) Crecimiento de las colonias en medio Agar MRS, b) Aislamiento por estría de una de las colonias (colonia 6).

Tabla 6. Criterio de selección para las colonias de estudio en Agar MRS

Cepa	Criterio	Morfología encontrada
2, 6, 7, 8, 11, 13, 15	Gram positivo	Bacilos cortos
3, 12		Bacilos medianos

Estas colonias se resembraron 3 veces hasta verificar su viabilidad en el mismo medio y su pureza (que presenten la misma morfología), en la Tablas 7 y 8 se muestra la descripción que tuvieron las cepas. De igual manera en las Imágenes 5 y 6 la vista que presentaron en el microscopio.

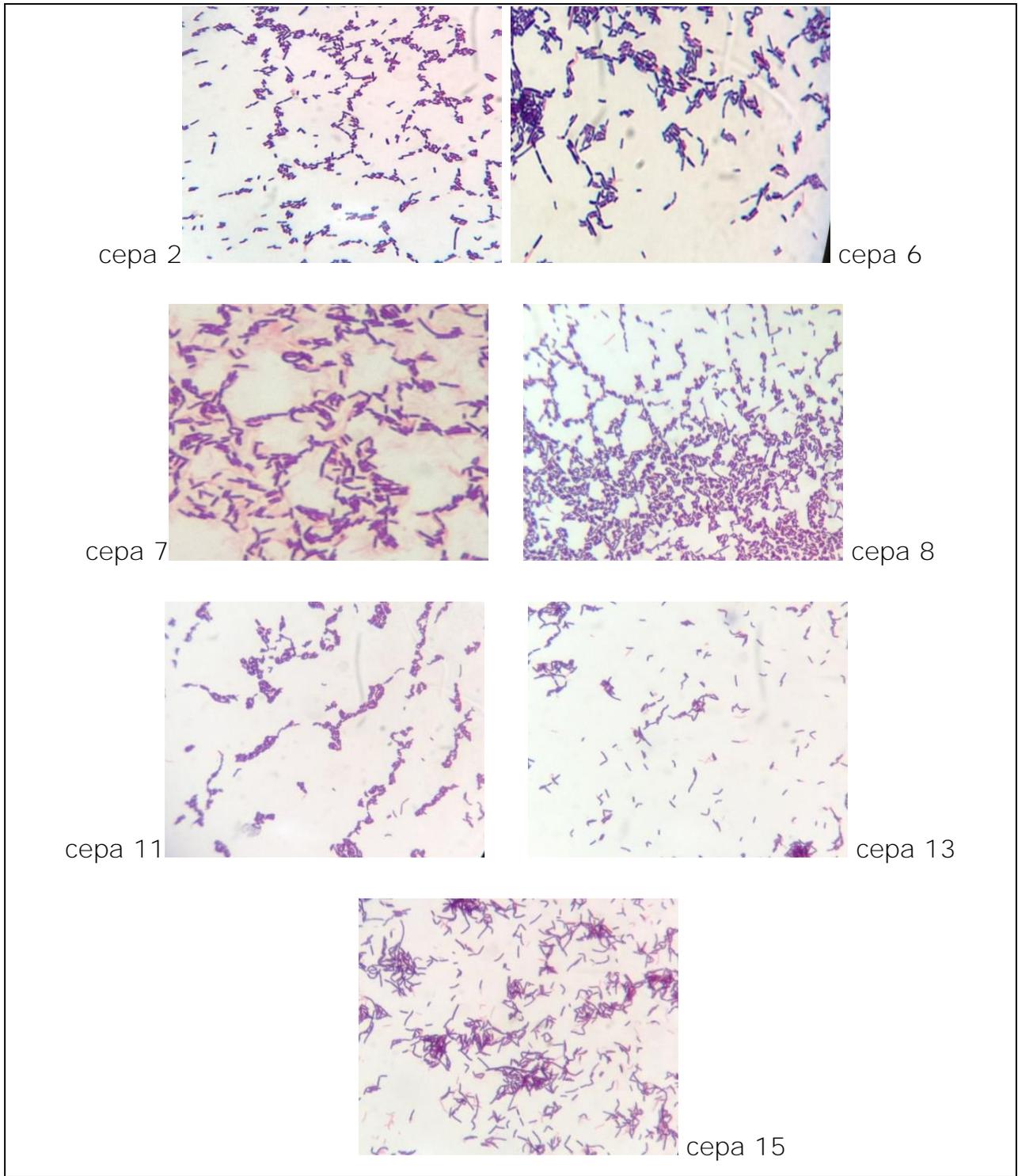


Imagen 5. Morfología vista en el microscopio (100x) de las cepas aisladas del Agar MRS.

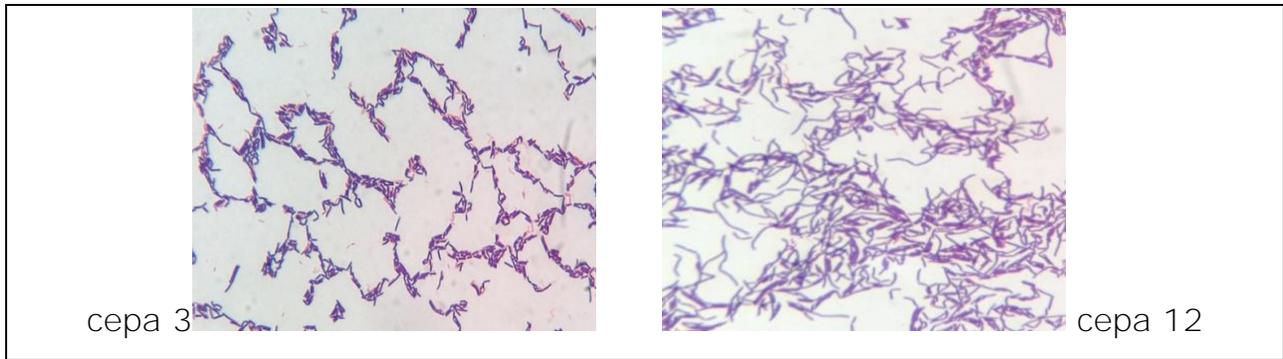


Imagen 6. Morfología vista en el microscopio (100x) de las cepas aisladas del Agar MRS.

Tabla 7. Descripción de las colonias aisladas de acuerdo con su crecimiento en Agar MRS. Características macroscópicas.

Característica	Observación
Forma	Puntiforme
Bordes	Circular, entero
Elevación	Convexa
Textura	Viscosa
Color	Crema-blanco

Tabla 8. Resumen de las características de las colonias aisladas.

Cepa	Características microscópicas	Características macroscópicas de las colonias en el medio agar MRS	Clasificación del Gram
2	bacilos cortos	Forma: puntiforme, Bordes: circular entero, elevación: convexa, textura: Viscosa, color: crema-blanco	+
6	bacilos cortos		+
7	bacilos cortos		+
8	bacilos cortos		+
11	bacilos cortos		+
13	bacilos cortos		+
15	bacilos cortos		+
3	bacilos medianos		+
12	bacilos medianos		+

#### 8.4 Prueba de catalasa

No se detectó presencia de burbujas, por lo que la prueba es negativa para las 9 colonias y el control.

#### 8.5 Pruebas Bioquímicas

A cada cepa se le realizó el perfil bioquímico (incluyendo a la cepa control), mediante la galería API<sup>®</sup> 50 CH (Imagen 7 y Apéndice C).

De acuerdo con cada perfil de fermentación, Apiweb<sup>™</sup> arrojó que las cepas 6, 12, 13 15 y cepa control se identificó como *Lactobacillus paracasei paracasei*, para la cepa 2, 7 y 8 se identificó como *Lactobacillus brevis*. La cepa 3 se identificó como *Pediococcus* ssp y para la cepa 11 *Lactobacillus rhamnosus*. Todas las cepas tuvieron un porcentaje de identificación arriba del 99% y 89.4% para el control. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos.



a)



b)

Imagen 7. Galería API® 50 CH. Perfil de fermentación de la colonia 6. a) En la parte superior se muestra la galería inoculada antes de incubar; b) En la parte inferior se muestra la galería inoculada después de incubar.

Tabla 9. Resultados de las pruebas bioquímicas (Galería API® 50 CH) obtenidas por Apiweb™.

Cepa	Identificación en programa informático	Porcentaje (%) de identificación con desviación estándar
Control: <i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	89.4 %, T= 0.94
6		99.8 %, T= 0.95
12		99.8 %, T= 0.95
13		99.5 %, T= 1.00
15		99.8 %, T= 0.95
2	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.9 %, T= 0.89
7		99.1 %, T= 0.95
8		99.0 %, T= 0.88
3	<i>Pediococcus</i> spp.	99.9 %, T= 0.97
11	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99.7 %, T= 0.99

## 8.6 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN para las 9 cepas mediante el kit Fast ID y el ADN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro de la marca BIOTEK modelo EPOCH. No se observaron impurezas en la extracción debido a que la absorbancia a 260 nm es mayor que la absorbancia a 280 nm (Tabla 10 y Apéndice F).

Tabla 10. Resultado de la cuantificación de ADN genómico para las nueve cepas.

Cepa	Cantidad de ADN ng/ $\mu$ L	Pureza (260/280 nm)
2	10.872	2.476
3	89.873	2.032
6	29.634	2.144
7	61.572	1.983
8	12.162	2.275
11	14.715	2.333
12	70.317	1.979
13	38.957	2.085
15	103.314	2.023

Se elaboró un gel de agarosa 1% (Imagen 8), se usó el marcador de peso molecular Thermo Scientific MassRuler ADN de alto rango.

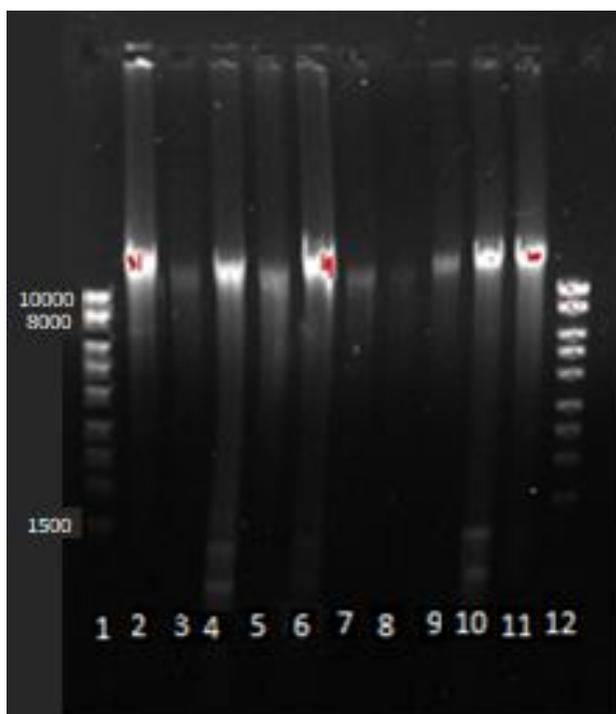


Imagen 8. Extracción de ADN de las colonias problema y el control. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: *Lactobacillus paracasei*, carril 3: colonia 2, carril 4: colonia 3, carril 5: colonia 6, carril 6: colonia 7, carril 7: colonia 8, carril 8: colonia 11, carril 9: colonia 12, carril 10: colonia 13, carril 11: colonia 15, carril 12: Marcador de peso molecular.

En la Imagen 8, los carriles 4, 6 y 10 se observan pequeñas bandas menores a 1500 pares de bases, posiblemente sean plásmidos contenidos en las colonias. En la misma fotografía se observan bandas de ADN con más de 10,000 pares de bases, con esto se corrobora que la integridad del ADN es buena.

#### 8.6.1 Amplificación de la región ADNr 16S.

Una vez obtenido el ADN, se hizo la amplificación de la región que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma 16S, se usaron los cebadores mostrados en la Tabla 1 bajo las condiciones de reacción de la Tabla 2, 3. En las imágenes 9 y 10, se observan los amplicones del gen ADNr 16S.

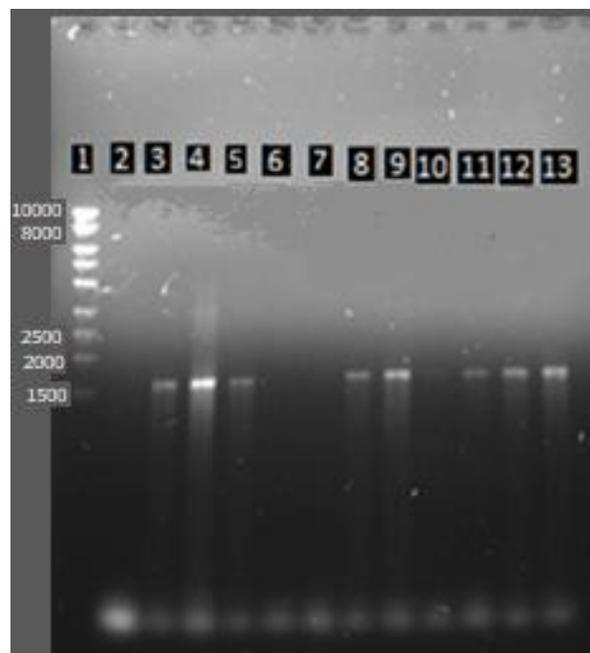


Imagen 9. Gel de agarosa 1%, las bandas que se muestran son los productos de amplificación del ribosoma 16S. Carril 1: marcador peso molecular Mass ruler, carril 2: blanco: sin banda, carril 3: *L. paracasei*: con banda, carril 4: colonia 2: con banda, carril 5: colonia 2: con banda, carril 6: colonia 3: sin banda, carril 7: colonia 3: si banda, carril 8: colonia 6: con banda, carril 9: colonia 6: con banda, carril 10: colonia 7: con banda tenue, carril 11: colonia 7: con banda, carril 12: colonia 8: con banda, carril 13: colonia 8: con banda

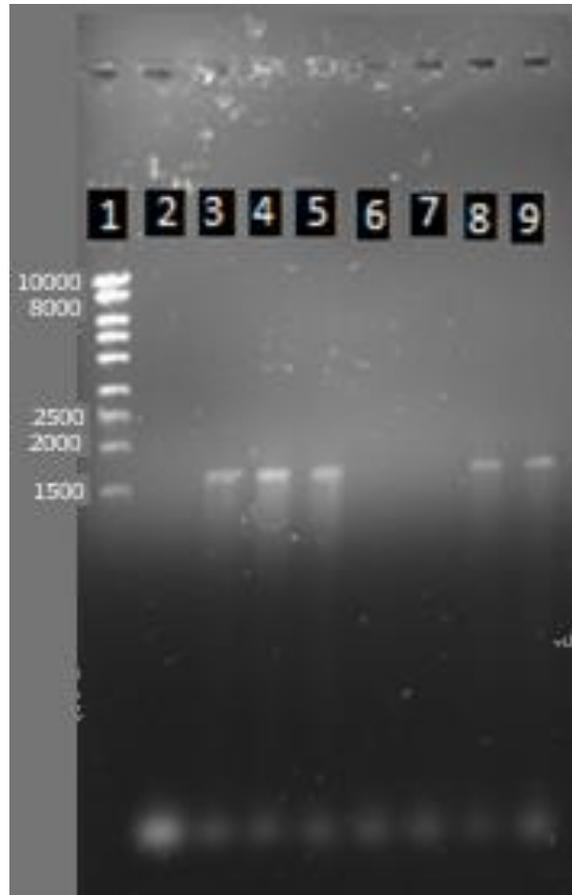


Imagen 10. Gel de agarosa 1%, las bandas que se muestran son los productos de amplificación del ribosoma 16S. Carril 1: marcador peso molecular Mass ruler, carril 2: blanco sin banda, carril 3: colonia 11 con banda, carril 4: colonia 12 con banda, carril 5: colonia 12 con banda, carril 6: colonia 13 sin banda, carril 7: colonia 13 si banda, carril 8: colonia 15 con banda, carril 9: colonia 15 con banda.

Después de verificar en cuales muestras si hubo amplificación (Imágenes 9 y 10), se inició otro PCR con las mismas condiciones (Tablas 1, 2 y 3). Posteriormente se elaboró un gel de agarosa al 1% y las bandas se cortaron para poder purificar el ADN y posteriormente enviar a secuenciar los amplicones de las cepas 2, 6, 8, 11, 12 13 y 15 (Imagen 11).

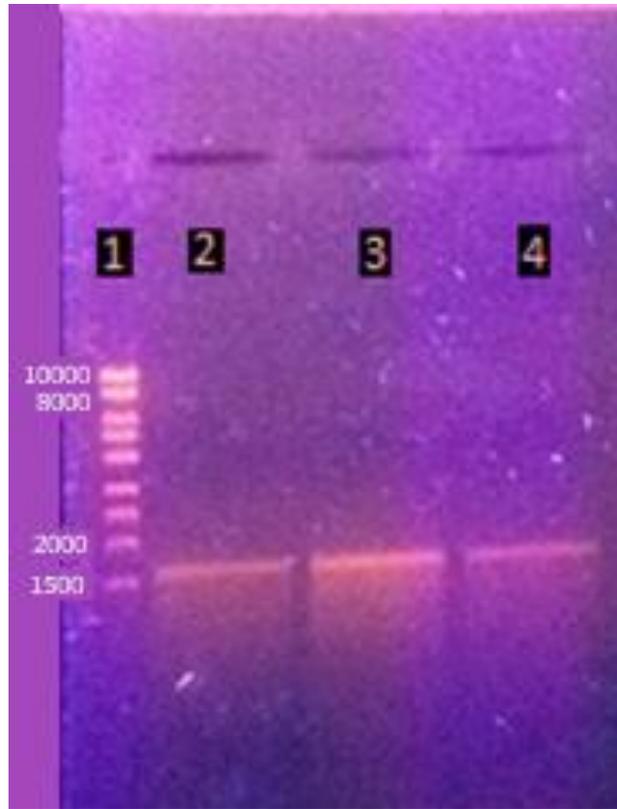


Imagen 11. Gel de agarosa al 1%. Las bandas mostradas son las que se cortaron, se purificaron y se mandaron secuenciar. Solo se presenta uno de los dos geles, siendo similar el otro para las demás cepas. Carril 1: marcador de peso molecular MassRuler alto rango, carril 2-4: amplicones de las colonias.

### 8.7 Purificación de ADN

De estos geles se cortaron las bandas y se purificaron con el kit GenElute™ Minus EtBr spin columns de la marca de SIGMA para poder obtener el ADN y enviar a secuenciar en la empresa de MACROGEN.

### 8.8 Identidad de las cepas BAL

En la tabla 11 se muestran los resultados de los alineamientos de las secuencias genéticas analizadas para cada cepa con el NCBI y su identidad a través del programa BLAST para nucleótidos. Para la cepa 3, 7, 13 y 15 no se logró obtener alguna identidad conocida, por lo que se reporta como no disponible. La secuencia genética de la cepa 2 y 11 se alineó con 3 microorganismos *Lactobacillus paracasei*, *rhamnosus* y *casei* con un porcentaje de identidad del 99 % para la cepa 2 y 86 % para la cepa 11; la secuencia genética de la cepa 6 se alineó con *Lactobacillus paracasei* con un porcentaje de identidad del 83 %; la secuencia genética de la cepa 8 se alineó con *Lactobacillus sunki* y *parakefirii* con un porcentaje de identidad del 94 %; la secuencia genética de la cepa 12 se alineó con *Lactobacillus acidipiscis* con un porcentaje de identidad del 90 %.

Tabla 11. Identidad de las cepas seleccionadas por alineamiento con el NCBI a través del programa BLAST para nucleótidos.

Cepa	Pruebas genéticas		
	Identidad	% ident	Valor de E
2	<i>Lactobacillus paracasei, rhamnosus, casei</i>	99	0.0
3	No disponible	-	-
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	83	1e <sup>-36</sup>
7	No disponible	-	-
8	<i>Lactobacillus sunki, parakefirii</i>	94	0.0
11	<i>Lactobacillus rhamnosus, casei, paracasei</i>	86	0.0
12	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	90	0.0
13	No disponible	-	-
15	no disponible	-	-

## 8.9 Árbol filogenético

Se construyó un árbol filogenético con secuencias obtenidas del ADNr 16S. Como control negativo se utilizó la secuencia del gen ribosomal 16S de *Escherichia coli* para comprobar que el agrupamiento fuera certero.

El árbol consenso fue construido con las 35 secuencias analizadas obtenidas del programa BLAST, las cuales fueron muy similares a las cepas que se aislaron del biopreparado. El valor junto al nodo corresponde al porcentaje en que fueron asociadas las secuencias en el mismo clado en el análisis de bootstrap.

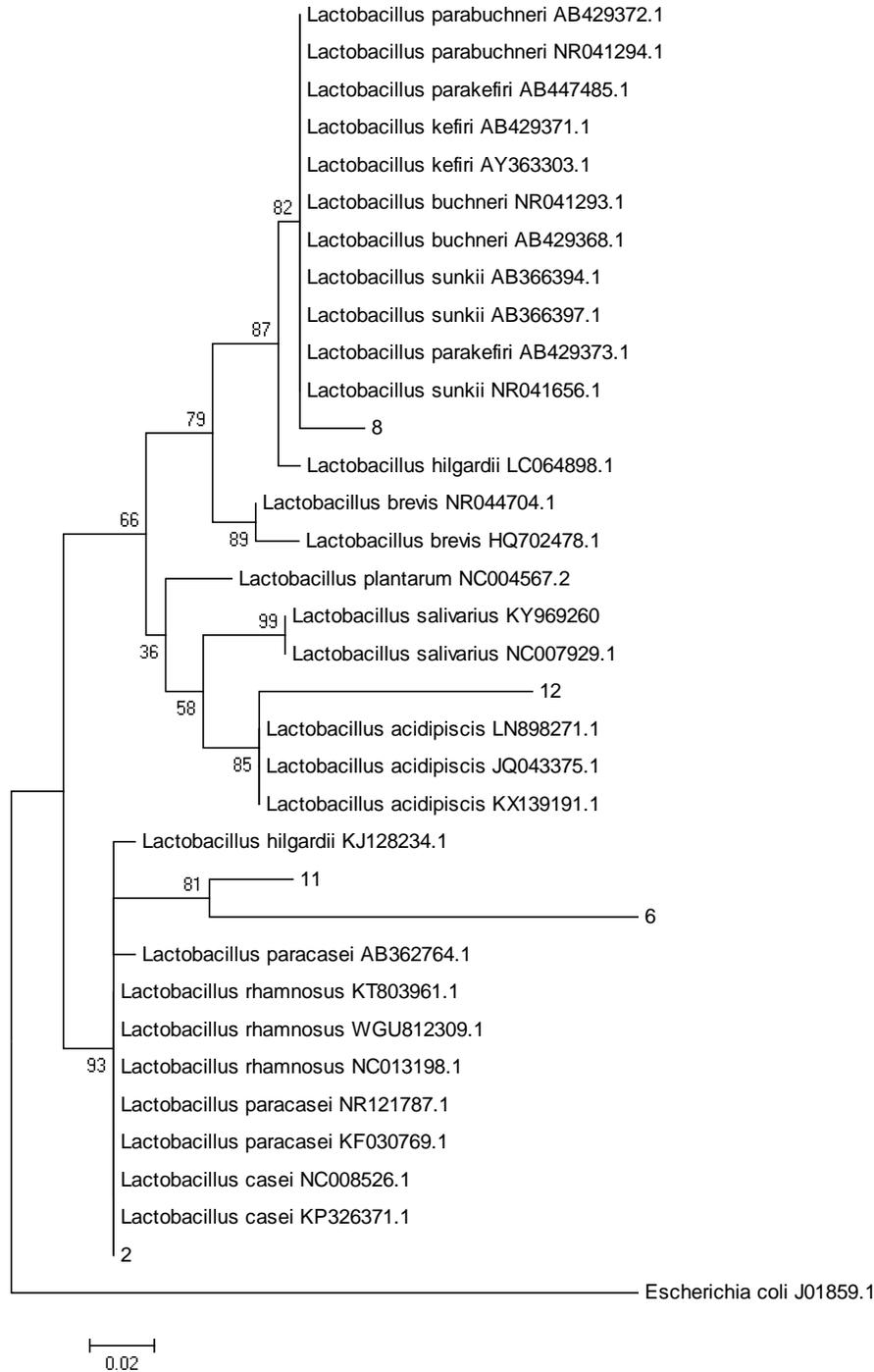


Figura 9. Análisis filogenético molecular. La historia evolutiva se dedujo mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). Se muestra el árbol con mayor probabilidad de registro (-693.7904). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas. El Árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo aplicando el método de Neighbor-Joining a una matriz de distancias parejas estimada utilizando el enfoque de probabilidad máxima compuesta (MCL). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 35 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos. Había un total de 152 posiciones en el conjunto de datos final. Análisis evolutivos se realizaron en MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

## 8.10 Pruebas de actividad Probiótica

### 8.10.1 Resistencia a la acidez gástrica

Se realizó de manera cualitativa la resistencia a pH, es decir solo se comprobó la presencia o ausencia de crecimiento de las cepas a diferentes valores de pH.

Se observó crecimiento bacteriano en todos los tubos con desarrollo de turbidez en el medio. El control que se utilizó fue en medio caldo MRS, en el cual no hubo desarrollo microbiano. En la Tabla 12 se muestran los resultados.

Tabla 12. Resultados cualitativos de la prueba de resistencia a pH.

Cepas	pH			
	3	4	5.5	7
control	x	x	x	x
2	✓	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓
11	✓	✓	✓	✓
12	✓	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓

✓: Crecimiento de la cepa en el medio, presencia de turbidez en el medio.

X: Sin crecimiento, ausencia de turbidez

### 8.10.2 Sales biliares

En la Tabla 13 se muestra la viabilidad de las cepas en Agar MRS antes de someterlas a las pruebas de sales biliares (serie testigo) y a la sobrevivencia de las cepas en Agar MRS después de someterlos a la prueba de sales biliares de buey con una concentración de 0.5%, las dos series se incubaron a 37°C por 24 h. Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC / mL). La cepa 3 presentó una cuenta menor a 10 UFC / ml, por lo que se considera un valor estimado y que la cepa no resistió al tratamiento con sales biliares.

A mayor número de UFC / mL que presentan las cepas 7, 8 y 11 se pudo observar que presentan mayor resistencia al tratamiento con sales biliares que las cepas 2, 6, 12, 13 y 15, estas últimas presentan resistencia en menor grado. Este grado de resistencia se compara con la cuenta de la serie testigo a la cual no se le agregó sales biliares.

Tabla 13. Comparación de resultados antes y después de tratamiento con sales biliares en Agar MRS.

Cepa	Serie testigo (antes de tratamiento)	Serie con sales biliares al 0.5 % (después de tratamiento)
	Resultado (UFC / mL)	Resultado (UFC / mL)
2	60x 10 <sup>4</sup>	17 x 10 <sup>4</sup>
3	39x 10 <sup>4</sup>	< 10 valor estimado, sensibilidad del método
6	8x 10 <sup>4</sup>	3.6 x 10 <sup>4</sup>
7	730 x 10 <sup>4</sup>	530 x 10 <sup>4</sup>
8	750 x 10 <sup>4</sup>	240 x 10 <sup>4</sup>
11	13x 10 <sup>4</sup>	12 x 10 <sup>4</sup>
12	11x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>
13	52x 10 <sup>4</sup>	11 x 10 <sup>4</sup>
15	39x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>

### 8.10.3 Pruebas antagónicas

En la tabla 14 se presenta el resumen de las inhibiciones que las cepas aisladas del biopreparado ejercieron contra los microorganismos probados. Las cepas 2, 6 y 11 inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*; no se observó halo de inhibición en *E. coli* y en *B. pumilus*. Las cepas 12 y 13 inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*; no se observó halo de inhibición en *B. pumilus*. Las cepas 7 y 15 inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *L. monocytogenes*; no se observó halo de inhibición en *E. coli*, *B. cereus* y en *B. pumilus*. La cepa 3 inhibió el crecimiento de *S. pyogenes*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*; no se observó halo de inhibición en *E. coli*, *S. aureus* y en *B. pumilus*. La cepa 8 solo inhibió el crecimiento de *S. pyogenes* y *L. monocytogenes*; no se observó halo de inhibición en *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* y en *B. pumilus*.

Tabla 14. Resumen de los patrones antagónicos.

Cepa	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. pumilus</i>
2	x	✓	✓	✓	✓	x
3	x	x	✓	✓	✓	x
6	x	✓	✓	✓	✓	x
7	x	✓	✓	✓	x	x
8	x	x	✓	✓	x	x
11	x	✓	✓	✓	✓	x
12	✓	✓	✓	✓	✓	x
13	✓	✓	✓	✓	✓	x
15	x	✓	✓	✓	x	x

✓= si inhibió; X= no inhibió

## 9. Análisis de resultados

Después del periodo de 22 días de fermentación, el biopreparado presentó aromas muy dulces y avinagrados, esto se debe a la liberación de los ácidos orgánicos y compuestos volátiles que se desarrollaron durante la fermentación; la producción de estos ácidos orgánicos que podrían ser ácido láctico, ácido acético y/o etanol, se produjeron por la descomposición de la melaza y del salvado de trigo que fue adicionado al inicio del tratamiento.

Con estos aromas detectados, se puede inferir la existencia de bacterias fermentadoras, es decir las BAL, que ya existían ahí de manera natural y que confirmaron su presencia con las pruebas que se llevaron a cabo.

Las BAL aumentaron en proporción al suministrarle al medio los carbohidratos complejos necesarios para la obtención de energía, llevar a cabo sus funciones y liberar al medio diversos compuestos. No se descarta la acción de otros grupos microbianos autóctonos involucrados en la descomposición de la materia orgánica.

Este proceso de biorremediación transformó al biopreparado en una mezcla biológicamente activa, debido a que los microorganismos mineralizaron la materia orgánica mediante una fermentación inducida, en la que se controlaron parámetros de manera cualitativa como cantidad de oxígeno y suministro de nutrientes enriquecedores para favorecer el crecimiento de las BAL (melaza y salvado de trigo) (Volke & Velasco, 2002).

La temperatura no fue controlada cuantitativamente, pero debió de estar en un rango entre 30 °C a 40 °C debido a las reacciones exotérmicas de descomposición de la materia orgánica y a la temperatura cálida del municipio de Chautzingo donde se realizó la fermentación.

Este rango de temperatura es óptimo para el desarrollo de las BAL. El pH fue acidificado por los ácidos orgánicos generados por las BAL (ácido láctico principalmente).

Durante la fermentación del biopreparado, se agotó el oxígeno que quedó atrapado en los microambientes del tanque (ya que antes de cerrar el tanque se compactó la mezcla, para eliminar lo más posible el oxígeno), este oxígeno fue utilizado en el crecimiento de la biomasa fermentadora (hongos y levaduras en primera instancia) que transformó la materia prima; con esto también el crecimiento las BAL se favoreció para que pudieran aumentar en número y colonizar el medio. En el laboratorio se usaron condiciones microaerofilicas al momento de incubar las cepas aisladas, ya que tardaban más en crecer si se incubaban en condiciones aerobias.

Se puede resaltar de estos hechos que no se necesita una fuente animal en la cadena alimentaria para abastecer al suelo con este género de bacterias y que su origen principal son también las plantas y vegetales, ya que en el lugar donde se recogió la muestra no hay una presencia regular de animales, y que sus desechos fecales no se encontraban en la tierra con la que se elaboró el fermentado.

La búsqueda se centró en obtener BAL y de manera muy general se hizo un aislamiento rápido de otros grupos microbianos que existían en él. Se utilizó como medio agar nutritivo, el cual es un medio no selectivo, es decir, en él que crecen todo tipo de especies con escasos requerimientos nutricionales o especies no exigentes. Se obtuvieron diferentes grupos microbianos como hongos y bacterias.

Del agar MRS, se tomaron 20 colonias y se le hizo tinción de Gram, en el microscopio óptico solo 9 colonias retuvieron el primer colorante (cristal violeta), es decir en el microscopio se veían colonias de una sola morfología (color morado), por lo que se decidió proseguir con el protocolo con esas 9 colonias.

La morfología que presentaron estas colonias fue la de bacilos cortos y bacilos medianos. Las demás colonias, no se les observaba la misma morfología en el microscopio, tenían dos colorantes o solo safranina, por lo que fueron descartadas.

Las 9 colonias que fueron Gram positivas presentaron las mismas características morfológicas en Agar MRS que son características de la Familia *Lactobacillaceae*. Formaron colonias pequeñas en forma puntiforme, de bordes enteros circulares, con una elevación convexa, de textura cremosa, y colores que van del color blanco al color crema claro debido a que no producen pigmentos (Goyal *et al.*, 2012).

Las 9 cepas son catalasa negativas, es decir, no cuentan con la enzima citocromo catalasa que le permite degradar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, esta característica se usa para identificar a los lactobacilos (Goyal *et al.*, 2012).

Las BAL producen peróxido de hidrógeno como producto final (o lo utilizan como sustrato) para contrarrestar los efectos oxidativos que provoca el oxígeno atmosférico en sus componentes celulares (Apéndice E). Esto les da una gran ventaja frente a otras bacterias (ya que el peróxido de hidrógeno es un agente microbiano) que son susceptibles al peróxido de hidrógeno y así colonizar el medio (Vásquez *et al.*, 2009).

Las colonias presentan un perfil de carbohidratos muy variado, esto lo podemos observar en la galería API<sup>®</sup> después de la incubación (Imagen 7),

debido a que cada cepa cuenta con enzimas muy específicas a otras cepas que le permiten metabolizar los diferentes sustratos que hay, con esto asegura su propio éxito de supervivencia en un medio determinado (Axelsson, 2004; Barbés, 2008).

Cada cepa tiene su propio perfil de enzimático, característica fenotípica que sirve para diferenciar a las colonias. En la galería API<sup>®</sup> la ausencia o presencia de una enzima se visualiza debido a que el indicador de pH vira en el pozo (púrpura de bromocresol), el indicador a pH 7 es de color morado, cuando la cepa metaboliza algún carbohidrato y produce algún ácido orgánico, provoca el descenso en el pH y el indicador cambia a color amarillo (prueba positiva), si el pozo se queda de color morado después de la incubación quiere decir que la cepa no expresó esa enzima para metabolizar el carbohidrato, por lo que el pH permanece en 7 (prueba negativa); los pozos en los que sí ocurrió un cambio de color se anotan en la ficha para resultados que viene para cada galería.

No todos los sustratos son fermentados por las cepas, de ahí que surja una variación que se puede medir. Los perfiles de carbohidratos obtenidos por cada cepa se ingresaron al programa apiweb<sup>™</sup> y el programa arrojó la identidad bioquímica de cada una de las cepas que se registraron en la Tabla 9.

De acuerdo con Apiweb<sup>™</sup>, las 9 cepas pertenecen al género *Lactobacillus*. Los resultados tuvieron porcentajes de identidad altos con un 99%, con una desviación estándar mayor a 90.

De acuerdo con las pruebas bioquímicas, la cepa 6, 12, 13 y 15 se identificaron como *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei*. Las cepas 2, 7, 8 se identificaron como *Lactobacillus brevis*. La cepa 11 se identificó como *Lactobacillus rhamnosus*.

La cepa 3 se identificó como *Pediococcus*, pero este género tiene morfología de coco y de acuerdo con la fisiología observada en el microscopio fue de bacilo, por lo que probablemente hubo una mala interpretación en los resultados de la galería API. Es necesario repetir esta prueba.

Para tener una mejor certeza en la identificación de las cepas se hizo la amplificación de la región del gen ribosomal 16S. Se partió de un cultivo celular fresco con una incubación de no más de 24 horas (se necesitan muchas células para la extracción de los ADN's individuales), cada cepa fue incubada en 10 ml de medio de cultivo, que posteriormente se centrifugó y se desechó el sobrenadante y se extrajo el ADN con el kit Fast ID.

Para verificar que la extracción de ADN no tuviera impurezas, como proteínas (que absorben a 280nm en el espectro UV) se determinó la pureza del ADN mediante espectrofotometría y se puede ver en el Apéndice F que en todas las gráficas a una longitud de onda de 260 nm el pico de absorbancia es superior a 1.8. También se puede observar en las Imágenes 12, 13 y 14 que el pico en 260nm (longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos) es superior a la longitud de onda de 280nm.

En cuanto a la cantidad de ADN se obtuvo suficiente material genético para poder hacer la amplificación del gen de interés. El método comercial de extracción que se utilizó permitió capturar el ADN genómico de una manera más selectiva y con un alto grado de pureza.

El gel de agarosa (Imagen 8) se realizó con el fin de verificar que el ADN que se extrajo estuviera íntegro o detectar algún fragmento durante el proceso de extracción, las bandas que se observan de las 9 cepas se ven integras, es decir casi no se ve el ADN degradado (esto se observa como un sendero luminoso en el carril), por lo que sí se puede hacer la amplificación. Si el ADN estuviera fragmentado o degradado dificultaría la amplificación en el PCR y su posterior secuenciación e interpretación en la identificación.

Una vez obtenido el ADN genómico, se llevó a cabo la amplificación de gen ribosomal 16S, para la reacción de PCR se utilizó la enzima *Pfu* (enzima encontrada en *Pyrococcus furiosus*) la cual es una polimerasa de ADN que tiene una mayor termoestabilidad, además que posee actividad exonucleasa **3' a 5'**, por lo que **generará productos de PCR con menos errores.**

Los fragmentos complementarios o cebadores que fueron seleccionados para la reacción PCR, FD1 y RD1, son capaces de amplificar a una gran variedad de bacterias; no son complementarios entre sí y tienen más de 30 nucleótidos por lo que se consideran cebadores de buen tamaño. La temperatura de fusión depende de la composición, tamaño y concentración de los cebadores, en este caso es de 55 °C (Weisburg *et al.*, 1991).

Se llevaron a cabo 20 reacciones, es decir 2 para cada una de las cepas (9 cepas), una para la cepa control (*L. paracasei*) y otra para el blanco que llevó todos los componentes de reacción sin material genético.

Al terminar la reacción de PCR se tiene que comprobar si la reacción se llevó a cabo y si ocurrió la amplificación, por lo que se hizo un gel de agarosa 1%. En la Imagen 9 y 10 se observó que efectivamente las reacciones se llevaron a cabo de manera correcta; en las cepas 2, 6, 7, 8, 11, 12 y 15 los cebadores si amplificaron y que los amplicones tienen un peso de 1500 nucleótidos. Solo ocurrieron dos excepciones, en la cepa 3 y 13 no hubo amplificación, tal vez los cebadores no encontraron regiones complementarias a ellos o no eran específicos para el ADN o existían inhibidores en la reacción.

En la reacción blanco tampoco hubo amplificación, lo que era un resultado esperado, si hubiera ocurrido lo contrario, es decir que se hubiera notado en el gel alguna señal amplificada se podría pensar que hubo una contaminación en la preparación de las reacciones o en la preparación de los nucleótidos.

Para tener un mayor rendimiento de la amplificación de ADN, se repitió la reacción de PCR y se juntaron en un solo tubo para cada cepa (2, 6, 7, 8, 11,

12 y 15); en el gel de agarosa (Imagen 11) se observó el mismo peso molecular.

Para recuperar el gen que está contenido en el gel de agarosa (Imagen 11), se cortó la porción donde estaba contenido el gen ribosomal 16S, esto se hizo con el fin de eliminar el exceso de agarosa (donde no está el gen) y mantener el ADN más concentrado (el gel puede ser molido en un tubo de microcentrífuga, picado en pequeñas partículas con una hoja de afeitar o bisturí, o pasado a través de una jeringa).

Una vez cortadas las rebanadas del gel se utilizó el kit GenElute menos EtBr spin para purificarlo, este kit es un método rápido para quitarle al ADN la agarosa y el bromuro de etidio (colorante usado para detectar el desplazamiento del ADN en la agarosa mediante fluorescencia bajo la luz UV) y poder mandar el gen a secuenciar sin contaminantes.

Con el ADN purificado de las cepas 2, 6, 7, 8, 11, 12 y 15 se enviaron a la empresa MacroGen para su secuenciación. Una vez conocidas las secuencias nucleotídicas de cada cepa se ingresaron a la base de datos del NCBI para ver a que secuencias se asemejan.

En la Tabla 11 se muestran las identidades genéticas de las cepas. Las secuencias de las cepas 2 y 11 tuvieron similitud con *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei*, con un porcentaje de identidad del 99 % para la cepa 2 y 86 % para la cepa 11.

Las cepas 7 y 15 no tuvieron similitud con ninguna cepa del NCBI, por lo que el ADN que se analizó pudo haber estado muy degradado y no se pudo comparar con nada. Es importante repetir este análisis y obtener un ADN de mejor calidad amplificable.

La cepa 6 tuvo similitud con *Lactobacillus paracasei* y tuvo un porcentaje de identidad del 83 %. La cepa 8 tuvo similitud con 2 cepas *Lactobacillus sunki* y *Lactobacillus parakefirii* con un porcentaje de identidad del 94%. La cepa 12 tuvo similitud con *Lactobacillus acidipiscis* con un 90% de identidad.

La cepa 3 y 13 no se pudieron amplificar con los cebadores que se utilizaron por lo que no se mandaron secuenciar.

El árbol filogenético (Figura 9) fue construido (en el programa Mega 6) con 35 secuencias obtenidas del NCBI. Se observa que las 5 cepas (2, 6, 8, 11, 12) se agrupan dentro del género *Lactobacillus*, pero solo la cepa 12 se agrupa dentro de una sola especie *Lactobacillus acidipiscis*, las 4 cepas restantes (2, 6, 8 y 11) se agrupan dentro de varias especies del género *Lactobacillus*.

En la Tabla 15 se muestra una comparación entre las pruebas bioquímicas con la secuenciación del gen ribosomal 16S; los resultados de ambas pruebas concuerdan a nivel de género, aunque no de especie.

De acuerdo con las dos pruebas (bioquímica y genética) la cepa 6 es *Lactobacillus paracasei* y la cepa 11 es *Lactobacillus rhamnosus*. En cuanto a la cepa 12, aunque no concuerdan las dos pruebas (bioquímica y genética) es la única cepa que se agrupa dentro de una especie en el árbol filogenético de acuerdo con la base de datos del NCBI como *Lactobacillus acidipiscis*.

En el caso de la cepa 7, 13 y 15 que no se pudo amplificar el gen ribosomal 16S, solo se puede saber que las pruebas bioquímicas las identifican como *Lactobacillus brevis* para la cepa 7 y *Lactobacillus paracasei paracasei* para las cepas 13 y 15. Con la cepa 3 tampoco se logró identificar en ningún aspecto, debido a que en la prueba morfológica, bioquímica y genética no se logró una convergencia en los resultados. Solo se puede inferir que es una bacteria ácido láctica por la morfología que presenta y porque carece de la enzima catalasa.

Las pruebas bioquímicas y genéticas no convergen en resultados para inferir que tipo de especie son las cepas 2 y 8, solo se puede saber que sí son *Lactobacillus* por que los cebadores si amplificaron para estas cepas y tienen mucha similitud de secuencias con las secuencias de la base de datos del NCBI.

Se puede emplear otros marcadores moleculares como el espacio intergénico del ARN ribosomal 16S-23S, la amplificación del ARN ribosomal 23S, el gen *rpoB* (subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa) o *gyrB* (subunidad  $\beta$  de la ADN girasa) (Bou *et al.*, 2011; Mohania *et al.*, 2008; Rodicio & Mendoza, 2004; Theron & Cloete, 2008).

Tabla 15. Comparación de resultados de las pruebas genéticas y bioquímicas.

#	Secuenciación del gen ribosomal 16S			Pruebas bioquímicas (Galería API® 50 CH)	
	Identidad	% ident	Valor de E	Identificación en programa informático	% ident.
2	<i>Lactobacillus paracasei, rhamnosus, casei</i>	99	0.0	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.9 %, T= 0.89
3	No disponible	-	-	<i>Pediococcus</i> spp.	99.9 %, T= 0.97
6	<i>Lactobacillus paracasei</i>	83	1e <sup>-36</sup>	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	99.8 %, T= 0.95
7	No disponible	-	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.1 %, T= 0.95
8	<i>Lactobacillus sunki, parakefirii</i>	94	0.0	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.0 %, T= 0.88
11	<i>Lactobacillus rhamnosus, casei, paracasei</i>	86	0.0	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99.7 %, T= 0-99
12	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	90	0.0	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	99.8 %, T= 0.95
13	No disponible	-	-	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	99.5 %, T= 1
15	No disponible	-	-	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	99.8 %, T= 0.95

Las 9 cepas (2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 15) fueron capaces de resistir y crecer en los diferentes tubos con caldo MRS a distintos pH's 3, 4, 5.5 y 7. Esta prueba solo se hizo de manera cualitativa, es decir, solo se quería probar si las cepas resistían a diferentes ambientes ácidos (**pH's 3 y 4**), por lo que solo se puso especial atención en el tubo eppendorf donde se notaba turbidez.

Es de esperarse que las 9 cepas crecieran a pH 5.5 y 7, debido a que son **valores donde su crecimiento es óptimo. A estos pH's sus membranas no se ven afectadas** y sus actividades enzimáticas funcionan adecuadamente en el interior de la célula (Serrazanetti *et al.*, 2013; Vásquez *et al.*, 2009).

Por el metabolismo que tienen las BAL, disminuyen el pH externo debido a la producción de ácidos orgánicos por lo que este cambio no se ve afectado en su desarrollo a esos valores de pH (5.5) (Prescott *et al.*, 2004).

Para que las BAL sea consideradas como cepas probióticas uno de los requisitos es su sobrevivencia a pH muy ácidos, debido al tránsito por el estómago (por la producción de HCl) hacia el intestino. Por esa razón se hicieron crecer a pH 3 y 4 y si se observó crecimiento. En estos valores de pH (aunque no son valores muy cercanos al que produce en el estómago) las cepas lograron crecer debido a que generaron un equilibrio entre la producción de protones del medio (que incorporaron a la célula con ayuda de la enzima glutamato descarboxilasa) con la producción de ácido láctico para regular el pH interno y producir energía (Serrazanetti *et al.*, 2013; Vásquez *et al.*, 2009).

Otro aspecto importante es que las bacterias que se aislaron provienen de suelo, estas bacterias son más resistentes a valores de pH más bajos, por lo que se puede ver reflejado en este resultado (Teneva & Beshkova, 2016).

Sin duda estos experimentos deben ampliarse y ser más cuantitativos y las cepas sean aceptadas como cepas probióticas. Las condiciones deben

asemejarse más a la del estómago y el jugo gástrico que produce (Vinderola & Reinheimer, 2003).

En el tubo etiquetado como control no se observó turbidez (solo era medio líquido sin microorganismos), lo que significa que se trabajaron bajo condiciones buenas de asepsia para inocular todos los tubos.

En la Tabla 13 se muestran los resultados de la serie testigo, esta serie estaba libre de sales biliares y se realizó para ver si la cepa era viable en el medio, además que se verificó que no hubiera ninguna contaminación externa por falta de asepsia. Se observó crecimiento en las 9 cepas. En la Tabla 13 se muestran los resultados del crecimiento de las cepas después de haberlas sometido al tratamiento con sales biliares al 0.5%.

La cepa 3 no se observó crecimiento, probablemente porque no expresó la enzima BSH, por lo que fue susceptible a la acción de las sales biliares.

Las cepas 2, 6, 11, 12, 13, 15 fueron capaces de resistir el tratamiento, aunque tuvieron una menor sobrevivencia de  $17 \times 10^4$ ,  $3.6 \times 10^4$ ,  $12 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $11 \times 10^4$  y  $4 \times 10^4$  UFC / mL respectivamente. Las cepas 7 y 8 tuvieron un mayor índice de sobrevivencia ya que contaron con más células viables de  $530 \times 10^4$  y  $240 \times 10^4$  UFC / mL respectivamente. Estas cepas probablemente si sobrevivan en el intestino debido a que si expresaron adecuadamente la enzima BSH al desconjugar las sales biliares y omitir el efecto emulsificante que produce en las células.

Todas las cepas tuvieron un efecto antagónico y no permitieron el crecimiento de los patógenos *S. pyogenes* y *L. monocytogenes*.

Ninguna cepa fue capaz de inhibir el crecimiento de *B. pumilus*. De la misma manera ocurrió lo mismo con el microorganismo *E. coli*, a excepción de las cepas 12 y 13 que si impidieron el crecimiento de *E. coli*.

Las cepas 3 y 8 no pudieron inhibir el crecimiento de *S. aureus*, pero las cepas 2, 6, 8, 11, 12, 13 y 15 si lo lograron la inhibición.

El patógeno *B. cereus*, fue inhibido con el desarrollo de las cepas 2, 3, 6, 11, 12, y 13. Las cepas 7, 8, y 15 no pudieron inhibir el crecimiento de éste patógeno.

Las cepas que lograron inhibir el crecimiento de los patógenos significan que producen ciertas sustancias (como ácidos orgánicos que reducen el pH, bacteriocinas, diacetilo y/o peróxido de hidrógeno) que no favorecen el desarrollo de éstos patógenos. De manera paralela los patógenos si fueron susceptibles a los compuestos antagónicos excretados por las 9 cepas y no fueron capaces de impedir el daño celular que les ocasionó.

Finalmente, y en base a la identificación de las cepas, éstas podrían ser las responsables de los efectos benéficos en los lechones, y por tanto se podrían utilizar para elaborar suplementos alimenticios, a reserva de que se realicen pruebas *in vivo* con estas cepas y se corrobore la inocuidad en los lechones.

## 10. Conclusiones

- ✓ Se aislaron del biopreparado bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*.
- ✓ Todas las cepas presentan potencial probiótico. Las pruebas que se realizaron fueron la resistencia a la acidez gástrica, resistencia a las sales biliares y pruebas de actividad antagónica.

## 11. Perspectivas

- ✓ Aislar, identificar y caracterizar más bacterias con el protocolo que se empleó aquí, con el fin de encontrar más especies de bacterias ácido lácticas.
- ✓ Enriquecer con medio líquido MRS una muestra de este preparado, para multiplicar las poblaciones de bacterias que están a bajas concentraciones y que aún son desconocidas. Posteriormente llevar a cabo el protocolo de identificación mencionado en esta tesis.
- ✓ Verificar que las cepas aisladas sean inocuas, al comprobar la ausencia de islas de patogenicidad en su genoma o en sus plásmidos.
- ✓ Verificar que las cepas aisladas presenten adherencia a las líneas celulares de los lechones.
- ✓ Caracterizar las sustancias antimicrobianas que producen las cepas aisladas

- ✓ Enriquecer el biopreparado con medio líquido MRS y suministrar como suplemento a los lechones. Llevar un registro de los efectos positivos que se observen en ellos.
- ✓ Elaborar un producto comercial, el cual sea capaz de contener BAL encontradas en este proyecto y cumpla con los parámetros de una dieta completa para emplearse en la alimentación de lechones.

## 12. Bibliografía

- Abascal, F., Irisarri, I. & Zardoy, R. (2014). Filogenia y evolución molecular. En A. Sebastián, A. Pascual-García, *Bioinformática con Ñ* (pp. 57-85). Zaragoza, España: Scribd. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/301558498\\_Filogenia\\_y\\_Evolucion\\_Molecular](https://www.researchgate.net/publication/301558498_Filogenia_y_Evolucion_Molecular)
- Agudelo, N., Torres, M., Álvarez, C. & Vélez, L. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos Hoy*, 23(36), 186-205. Recuperado de <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/356/306>
- AMBIEM Ltda. (2018a) Tecnología EM en la Avicultura. Recuperado de: [http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base\\_datos/uso\\_em\\_%20en\\_avicultura.pdf](http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base_datos/uso_em_%20en_avicultura.pdf) (Último acceso 28 de Febrero 2018)
- AMBIEM Ltda. (2018b). Tecnología EM en la porcicultura. Recuperado de: [http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base\\_datos/em\\_en\\_porcicultura.pdf](http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base_datos/em_en_porcicultura.pdf) (Último acceso 28 de Febrero 2018)
- Angmo, K., Kumari, A., Monika, Savitri & Chand, B. T. (2016a). Antagonistic activities of lactic acid bacteria from fermented foods and beverage of Ladakh against *Yersinia enterocolitica* in refrigerated meat. *Food Bioscience*, 13(26-31). Doi: 10.1016/j.fbio.2015.12.004

- Angmo, K., Kumari, A., Savitri & Chand, B.T. (2016b). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-Food Science and Technology*, 66(428-435).  
Doi: 10.1016/j.lwt.2015.10.057
- Ahn, Y. T., Kim, G. B., Lim, K. S., Baek, Y. J., & Kim, H. U. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal*, 13(303–311).
- Álvarez, G., & Azpiroz, F. (2015). Empleo de probióticos y prebióticos en atención primaria. *Nutrición Hospitalaria*, 31(s01), 59-63.).  
Doi: 10.3305/nh.2015.31.sup1.8708
- Al-Samarai, F. R. & Al-Kazaz, A. A. (2015). Molecular Markers: An Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology* 9(3).  
Doi: 10.13187/ejmb.2015.9.118
- Axelsson L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: S. Salminen, A. von Wright y A. Ouwehand. *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. 3rd Edición. (pp. 1–66). New York, EU: Marcel Dekker Inc.
- Balciunas, E., Castillo, F., Dimitrov, S., Gombossy, B. Converti, A. & De Souza, O. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134-142. Doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025
- Barbés C. (2008). Lactobacilli, En J. Versalovic, M. Wilson (Ed). *Therapeutic Microbiology*. (p 19-33). Washington, DC: ASM Press. Doi: 10.1128/9781555815462.ch3
- Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 625-651. Doi: 10.1016/j.femsre.2004.09.003

- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1729-1738. Doi: 10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006
- Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M. & Raffatellu, M. (2013). Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(3). Doi: 10.1101/cshperspect.a010074
- Beristain S. C., Palou, E. & López, A. (2012). Bacteriocinas: Antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos* 6(2), 64-78. Recuperado de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Beristain-Bauza-et-al-2012.pdf>
- Bi, J., Liu, S., Du, G. & Chen, J. (2016). Bile salt tolerance of *Lactococcus lactis* is enhanced by expression of bile salt hydrolase thereby producing less bile acid in the cells. *Biotechnology letters*, 38(4), 659-665. DOI: 10.1007/s10529-015-2018-7
- Biomériux (1989) API 50CHL Medium Sistema de identificación para *Lactobacillus* y microorganismos próximos. No. 50410. Biomériux S.A. (de.). **Marcy l'Etoile**, Francia. 10-12 pp. (Último acceso 28 de Febrero 2018)
- Blajman, J., Gaziano, C., Zbrun, M. V., Soto, L., Astesana, D., Berisvil, A., Romero Scharpen, A., Signorini, M. & Frizzo, L. (2015). In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria toward their selection as a probiotic in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.*, 101, pp. 50–56. Doi: 10.1016/j.rvsc.2015.05.017
- Bou, G., Fernández, O. A., García, C., Sáez, N., J. A. & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.

*Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. Doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012

Breidt, F., Pérez, D. I., McFeeters, R. & Lee C. (2013). Fermented Vegetables, En M. Doyle, R. Buchanan (Ed), *Food Microbiology*. (p 841-855). Washington, DC: ASM Press. Doi: 10.1128/9781555818463.ch33

Bustos, A.Y., Font de Valdez, G., Raya, R. & Taranto, M.P. (2016). Genetic characterization and gene expression of bile salt hydrolase (bsh) from *Lactobacillus reuteri* CRL 1098, a probiotic strain. *Int J Genomics Proteomics Metabolomics Bioinformatics*. 1(1), 1-8.

Cai Y., Ohmomo S., Ogawa M. & Kumai S. (1997). Effect of NaCl-tolerant lactic acid bacteria and NaCl on the fermentation characteristics and aerobic stability of silage. *Journal of Applied Microbiology*, 83(3), 307-313. Doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00229.x

Cai, Y., Pang, H., Kitahara, M. & Ohkuma, M. (2012). *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1140-4. Recuperado de <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.031781-0#tab2>

Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. & Velázquez, O. (2009). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. 2a (Ed.) Facultad de Química, UNAM. México, D. F.

Castro, L. Á., & De Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37(4), 308-314. Recuperado de <http://biblat.unam.mx/en/revista/colombia-medica/articulo/probioticos-utilidad-clinica>

- Chahrour, W., Merzouk, Y., Henni, J. E., Haddaji, M., & Kihal, M. (2013). Screening and identification of lactic acid bacteria isolated from sorghum silage processes in west Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 12(14). Recuperado de: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/128851>
- Chen, Y. S., Yanagida, F. & Shinohara, T. (2004). Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology* 2005, 40 (195–200). Doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01653.x
- Chen, Y-S., Wu, H-C. & Yanagida, F., (2010). Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 916-921. Doi: S1517-83822010000400010
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 269-280. Doi: 10.1111/j.1574-6968.1987.tb02465.x
- Cóndor, G. A. F., González P. P. & Lokare, C. (2007). Microorganismos eficaces: ¿Mito o realidad? *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 315-319. Doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v14i2.1837>
- Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Rendón, A. B. & Rocha, M. M. G. (Comps.). (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México: Semarnat. Recuperado de: [http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/new.portada.html?id\\_tema=&idb=710&img=710.jpg](http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/new.portada.html?id_tema=&idb=710&img=710.jpg)
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*. 16 (22), 10881-10890.

- Cortés, M. L. E. & Gómez, T. F. A. (2011). Eficiencia de microorganismos (EM) en el mejoramiento funcional del sistema digestivo de cerdos en fase prelevante. *Spei Domus*, 7(15). Recuperado de: <http://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/606>
- Cueto, V. M. C., Acuña M., Y. & Valenzuela, R. J. (2012). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actual Biol*, 32(93), 129-138.
- Díaz, G, & Wachter, C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Rev Latinoam Microbiol* 45, 30-40. Recuperado de: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=1156>
- Difco & BBL Manual. (2009). *Manual of Microbiological Cultura Media*. 2a (Ed.) Recuperado de: [http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobbblmanual\\_2nded\\_lowres.pdf](http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobbblmanual_2nded_lowres.pdf) Pág. 289-290. ISBN 0-9727207-1-5
- Dolz M. C. (2008). Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*; 28(3), 20-37. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3309741>. ISSN 0211-6057
- Duong T. & Klaenhammer T. (2008). Functional Genomics of Lactic Acid Bacteria, En J. Versalovic, M. Wilson (ed), *Therapeutic Microbiology*. p 193-204. Washington, DC: ASM Press. Doi: 10.1128/9781555815462.ch15
- Durango Z., M., Sepúlveda V. U., Gutiérrez, B., M., Londoño Z., A. (2012). Caracterización de ácidos grasos, Diacetilo y acetoína en queso colombiano. *Vitae*, 19(1), 376-378.

- EMRO Japan. (2018). Emrojapan.com. Recuperado de <http://emrojapan.com/>. (Último acceso 28 de Febrero 2018)
- Erickson, K. L. & Hubbard, N. E. (2000). Probiotic immunomodulation in health and disease. *The Journal of nutrition*, 130(2), 403-409. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10721915>
- Fhoula, I., Najjari, A., Turki, Y., Jaballah, S., Boudabous, A., & Ouzari, H. (2013). Diversity and antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from rhizosphere of olive trees and desert truffles of Tunisia. *BioMed research international*, 2013. P.14. Doi: 10.1155/2013/405708
- Florou-Paneri, P., Christaki, E. & Bonos, E. (2013). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. En J. Marcelino Kongo (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. (pp. 589-614). In Tech. Doi: 10.5772/47766.
- Fontana, L., Bermúdez, B. M., Plaza D. J., Muñoz Q. S. & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, pp S35-S50. Doi: 10.1017/S0007114512004011
- Forbes B. A. (2009) *Diagnostico Microbiológico* 12a. Ed. Madrid, España: Médica Panamericana
- Fuller, R. (1995). Probiotics: their development and use. *In Old Herborn University Seminar Monograph* 8, 1-8.
- Ganguly, N. K., Bhattacharya, S. K., Sesikeran, B., Nair, G. B., Ramakrishna, **B. S., Sachdev, H. P. S., ... Hemalatha, R. (2011). ICMR-DBT Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food. *The Indian Journal of Medical Research*, 134(1), 22–25.**

García C, A., Henríquez A, P., Retamal R, C., Pineda C, S., Delgado Sch, C., & González C, C. (2009). Propiedades probióticas de *Lactobacillus* spp aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. *Revista médica de Chile*, 137(3), 369-376. Doi: 10.4067/S0034-98872009000300007

García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L., Nicoli, J. R., Moreira-Silva, J., Rodríguez, Z., Fuertes, H., Nuñez, O., Albelo, N. & Halaihel, N. (2016). Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in Veterinary Science*, 108(125-132). Doi: 10.1016/j.rvsc.2016.08.009

Genetic ID NA, Inc (2017). Genomic DNA Extraction Kit. Fairfield, Iowa, USA: Fast ID. Recuperado de: [http://www.fastidkit.com/Products/Genomic\\_DNA\\_Extraction\\_Kit/Protocol](http://www.fastidkit.com/Products/Genomic_DNA_Extraction_Kit/Protocol) (último acceso 28 de Febrero 2018).

Geng, W., & Lin, J. (2016). Bacterial bile salt hydrolase: an intestinal microbiome target for enhanced animal health. *Animal Health Research Reviews*, 17(2), 148-158. Doi: 10.1017/S1466252316000153

Giraldo-Carmona J, Narváez-Solarte W, Díaz-López E. (2015). Probióticos en cerdos: resultados contradictorios. *Revista Biosalud* 14(1): 81-90. Doi: 10.17151/biosa.2015.14.1.9

Godoy, J.A. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18 (1): 23-33. DOI: 10.13187/ejmb.2015.9.118

Google earth Disponible en:  
<https://www.google.com.mx/maps/place/Colegio+de+Postgraduados+Campus+Puebla/@19.1294401,-98.3560148,11z/data=!4m5!1m2!2m1!1suniversidad+de+postgraduados+y+cerca+de+Volc%C3%A1n+Iztaccihuatl,+Puebla!3m1!1s0x85cfc6c695555555:0xb8fccdc72692d64> [Último acceso el 24 de Febrero de 2018].

Goyal, R., Dhingra, H., Bajpai, P. & Joshi, N. (2012). Characterization of the *Lactobacillus* isolated from different curd samples. *African Journal of Biotechnology* 11(79), 14448–14452. Doi: 10.5897/AJB11.310.

Gueimonde, M. & Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38, S242-S247. Doi: 10.1016/S1590-8658(07)60003-6

Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular biology and evolution*, 30(5), 1229-1235. Doi: 10.1093/molbev/mst012

Hao, W., Ji, F., Wang, J., Wang, Y., Zhang, Y., & Bao, Y. (2017). Metabolic Engineering of *Bacillus sp.* for Diacetyl Production. *Process Biochemistry*. Doi: 10.1016/j.procbio.2017.04.015

Harzallah, D., & Belhadj, H. (2013). Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. En J. Marcelino Kongo (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. (pp. 197-216). Doi: 10.5772/50732

Higa, T., & Parr, J. F. (1994). Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. Atami, Japan: International Nature Farming Research Center.

- Higa, T. & G. N. Wididana 1991. The concept and theories of effective microorganisms. p. 118-124. In Parr, S.B. Hornick, and C.E. Whitman (ed.) Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., USA.
- Higuchi, M., Yamamoto, Y., & Kamio, Y. (2000). Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. *Journal of bioscience and bioengineering*, 90(5), 484-493. Doi: 10.1016/S1389-1723(01)80028-1
- HiMedia Laboratories. (2012). Nystatin NS 100 Units, Technical Data. Recuperado de: <http://himedialabs.com/TD/SD025.pdf>
- Holzapel, W. H. N., & Wood, B. J. B. (2012) The genera of lactic acid bacteria Vol. 2. Springer Science & Business Media. pp 7-18.
- Hoyos, H. D., Alvis G. N., Jabib R. L., Garcés B. M., Pérez F, D. & Mattar V. S., (2008). Utilidad de los microorganismos eficaces (EM<sup>®</sup>) en una explotación avícola de córdoba: parámetros productivos y control ambiental. *Revista MVZ Córdoba*, 13(2):1369-1379. Recuperado de: <http://revistas.unicordoba.edu.co/ojs/index.php/mvz/article/view/240>
- Iñiguez-Palomares, C., & Acedo-Félix, E. (2006). Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de Bifidobacterium. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7(2). Recuperado de: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=13250>.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(29), 8787-8803. Doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787

- Janssen P. (2008). New Cultivation Strategies for Terrestrial Microorganisms. En Zengler K. (ed), *Accessing Uncultivated Microorganisms*. p 173-192. Washington, DC. ASM Press Doi: 10.1128/9781555815509.ch10.
- Jarocki, P., Podlesny, M., Glibowski, P. & Targonski, Z. (2014) A New Insight into the Physiological Role of Bile Salt Hydrolase among Intestinal Bacteria from the Genus *Bifidobacterium*. *PLoS ONE* 9(12): e114379. Doi: 10.1371/journal.pone.0114379
- Jeevaratnam, K., Jamuna, M. & Bawa, A.S. (2005). Biological preservation of foods- bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*. 4: 446-454. Recuperado de: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5759>
- Jini R, Swapna HC, Amit Kumar Rai, Vrinda R, Halami PM, Sachindra NM & Bhaskar N. (2011). Isolation and characterization of potential lactic acid bacteria (LAB) from freshwater fish processing wastes for application in fermentative utilization of fish processing waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42 (4):1516–1525. Doi: 10.1590/S1517-838220110004000039
- Jyoti, B. D., Suresh, A. K., & Venkatesh, K. V. (2003). Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(5), 509-514. Doi: 10.1023/A:1025170630905
- Jurado, G. H., Aguirre, F. D. & Ramírez, T. C. (2009). Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. *Revista MVZ Córdoba*, 14(2), 1723-1735. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682009000200009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682009000200009&lng=es&tlng=es).

- Karovičová, J., & Kohajdová, Z.** (2003). Lactic acid fermented vegetable juices. *Horticultural Science*, 30(4), 152-158. Recuperado de: <http://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/51936.pdf>
- Kaur, S., Pal H. & Kanchan (2015). Evaluation of Antibacterial Activity of Bacteriocin Produced from *Lactobacillus Sp.* Isolated from Rhizosphere Soil. *Int. J. Pure App. Biosci.* 3 (3): 136-142. Recuperado de: <http://www.ijpab.com/form/2015%20Volume%203,%20issue%203/IJ-PAB-2015-3-3-136-142.pdf>
- Krupkin, M., Matzov, D., Tang, H., Metz, M., Kalaora, R., Belousoff, M. J., Zimmerman, E., Bashan, A. & Yonath, A. (2011). A vestige of a prebiotic bonding machine is functioning within the contemporary ribosome. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 366(1580), 2972-2978. DOI: 10.1098/rstb.2011.0146
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., ... & Yadav, H. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental diabetes research*, 2012. Doi:10.1155/2012/902917
- Ladino, O. G. & Rodríguez P., J. A. (2009). Efecto de *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodopseudomona palustris* (microorganismos eficientes em) y melaza en la ganancia de peso de tilapias (*Oreochromis sp*) en condiciones de laboratorio. *Orinoquia*, 13(1):30-35.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S. & Wright, A. (2011). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. FI: CRC Press.

- Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M. E., & Gardini, F. (2003). Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food microbiology*, 20(5), 537-543. Doi: 10.1016/S0740-0020(02)00159-4
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948. Doi: 10.1093/bioinformatics/btm404
- Liong, M. T. (2015). Beneficial Microorganisms in Agriculture, Aquaculture and Other Areas (29). Suiza: Springer. Doi: 10.1007/978-3-319-23183-9
- Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *International Dairy Journal*, 15(4), 391-398. Doi: 10.1016/j.idairyj.2004.08.007
- López B., M. & Domingo, D. (2007). *Antibioticoterapia con probióticos*. *Rev Esp Quimioterap*, 20(2), 170-181. Recuperado de: [http://seq.es/seq/0214-3429/20/2/lopez\\_brea\\_revision1.pdf](http://seq.es/seq/0214-3429/20/2/lopez_brea_revision1.pdf)
- Madden, T. (2013). The BLAST Sequence Analysis Tool. In: The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information. US.
- Marroki, A., Zúñiga, M., Kihal, M. & Pérez, M. G. (2011). Characterization of Lactobacillus from Algerian goat's milk based on phenotypic, 16S rDNA sequencing and their technological *properties*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1), 158-171. Doi: 10.1590/S1517-83822011000100020

- Meydani, S. N. & Ha, W. K. (2000). Immunologic effects of yogurt. *The American journal of clinical nutrition*, 71(4), 861-872. Recuperado de: <http://ajcn.nutrition.org/content/71/4/861.short>
- Mishra, S., & Imlay, J. (2012). Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?. *Archives of biochemistry and biophysics*, 525(2), 145-160. Doi: 10.1016/j.abb.2012.04.014
- Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., ... & Yadav, H. (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive Diseases*, 9(4), 190-198. Doi: 10.1111/j.1751-2980.2008.00345.x
- Mondragón P. G., EscalanteMinakata, P., Osuna C. J. A., Ibarra J. V., Morlett C. J. A., Aguilar, G. C. N. & Rodríguez, H. R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia* (59), 64-70. ISSN: 1665-4412
- Morelli L. & Capurso L. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *J Clin Gastroenterol*. 46(Suppl): S1-2. Doi: 10.1097/MCG.0b013e318269fdd5
- Naidu, A. S., Bidlack, W. R. & Clemens, R. A. (1999). Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39: 1, 13-126. Doi: 10.1080/10408699991279187
- Ndonga, R. K., Friedel, J. K., Spornberger, A., Rinnofner, T., & Jezik, K. (2011). '**Effective Micro-organisms**' (EM): An Effective Plant Strengthening Agent for Tomatoes in Protected Cultivation. *Biological Agriculture & Horticulture*, 27(2), 189-203. Doi: 10.1080/01448765.2011.9756647
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). Lehninger. Principios de Bioquímica. 5ª edición. Ed. Omega. Pág. 1075-1079.

- Nigatu, A., Ahrné, S. E. I. & Molin, G. (2000). Temperature-dependent variation in API 50 CH fermentation profiles of *Lactobacillus* species. *Current Microbiology*, 41, 21–26. Doi: 10.1007/s002840010085
- Noriega, P. L., Cuevas, I., Margolles, B. A., & Reyes G. C. G. (2006). Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. *International Dairy Journal*, 16(8), 850-855. Doi: 10.1016/j.idairyj.2005.09.008
- Olle, M., & Williams, I. H. (2013). Effective microorganisms and their influence on vegetable production—a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 88(4), 380-386. Doi: 10.1080/14620316.2013.11512979
- Otero, R. W., Trespacios, A. A., & Otero, E. (2009). *Helicobacter pylori*: Tratamiento actual un importante reto en gastroenterología. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 24(3), 279-292. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcg/v24n3/v24n3a10.pdf> (último acceso 28 de Febrero 2018)
- Ouwehand, A. C. & Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: S. Salminen, A. von Wright y A. Ouwehand. *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. 3rd Edición. (pp. 375-395.). New York, EU: Marcel Dekker Inc.
- Parra H. R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Rev. Bio. Agro*, 8(1), 93-105. ISSN 1692-3561.
- Patrón de turbidez BBL preparado (2005). Recuperado de: [http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)\\_es.pdf](http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf) (último acceso 8 de Febrero 2018)

Pepper, I.L., Gerba, C.P. & Gentry, T.J. (2015). *Environmental Microbiology*. (3da. Ed.). Elsevier Academic Press. Recuperado de: <http://store.elsevier.com/Environmental-Microbiology/isbn-9780123946263/>

Pérez, T. R., González, M. T. & Muñoz R. J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3). Recuperado de: <http://reibci.org/publicados/2014/agosto/3300118.pdf>

Pérez, R. H., Pérez, M. T. M., & Elegado, F. B. (2015). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Fermentative Production, Uses, and Prospects. *International Journal of Philippine Science and Technology*, 8(2), 61-67. Recuperado de: <http://philscitech.org/2015/1/2/027.html>

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2004). *Microbiología*. 5ª Ed. España: Mc Graw Hill Interamericana.

Ramírez G., R. M., Luna M., B., Velásquez M., O., Vierna G., L., Mejía C., A., Tsuzuki R., G., Hernández G., L., Muggenburg, I., Camacho C. A. & Urzúa H., M del C. (2013). *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Sexta edición. Distrito Federal. UNAM.

Rentaría A., M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En *Ecología molecular* (541-566). México: Instituto Nacional de Ecología, Semarnat.

Reyes-Nava LA, Garduño-Siciliano L, Estrada de los Santos, P., Hernández-Sánchez H, Arauz J., Muriel, P. & Rivera-Espinoza Y. (2016) Use of bile acids as a selection strategy for lactobacillus strains with probiotic potential. *J Food Nutr Disor* 5(1). Doi: 10.4172/2324-9323.1000187

- Rivas C., Mota M. (2006). Bacterias anaerobias. En M., Macedo, & S. Mateos (Ed.) Temas de bacteriología y virología médica. (pp. 355-380.) Oficina del libro FEFMUR (Fundación de Ediciones de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República). ISBN 9974-31-194-2.
- Rodicio, M. R. & Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245. Doi: 10.1016/S0213-005X(04)73073-6
- Rodríguez, J. M. (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutrición Hospitalaria*, 31(s01), 33-47. Doi: 10.3305%2Fnh.2015.31.sup1.8705
- Rogosa M., Mitchell J.A. & Wiseman R. F. (1951) A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J Bacteriol* 62, 132–133. Doi: 10.1177/00220345510300051201
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M. J., Laurencio, M. & Pérez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus sp.* procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Cienc. Technol. Aliment.* 6(1) 56-63. Doi: 11358120809487628
- Rykers, L. J. F., & Theron, M. M. (2012). Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains in vitro. *Foodborne pathogens and disease*, 9(12), 1126-1129. Doi:10.1089/fpd.2012.1220.
- Sánchez, M. J. I. (2005). Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. (Tesis doctoral). Universidad De Oviedo, España
- Recuperado de:

<http://digital.csic.es/bitstream/10261/4796/1/Tesis%20JORGE%20I%20SANCHEZ%20MARTINEZ.pdf>

- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425. Doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T, Bassole, I. H. N. & Traore, A. S. (2004). Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of nutrition*, 3(3), 174-179. Doi: 10.3923/pjn.2004.174.179
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N. & Traore, A. S. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African journal of biotechnology*, 5(9), pp. 678-683. Recuperado de: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/42771>
- Serrazanetti, D. I., Gottardi, D., Montanari, C. & Gianotti, A. (2013). Dynamic Stresses of Lactic Acid Bacteria Associated to Fermentation Processes. En J. Marcelino Kongo (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. (pp. 539-570). In Tech. Doi: 10.5772/51049.
- Sherwood, L. (2011). *Fisiología humana: De las células a los sistemas*. (7ma ed.) México. Cengage Learning. ISBN: 9780495391845
- Sivieri, K., Bedani, R., Cardoso, D., Cavallini, U. & Rossi, E. A. (2013). Probiotics and Intestinal Microbiota: Implications in Colon Cancer Prevention. En J. Marcelino Kongo (Ed.), *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (pp. 217-242). Croacia: InTech, Doi: 10.5772/51696.

- Stanier, R. Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L & Painter, P.R. (1996). Relaciones entre estructura y función en las células procariotas. En *Microbiología* 2da ed. (pp 155-178). España: Reverté.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., & Coppola, R. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS microbiology letters*, 244(1), 129-137. Doi: 10.1016/j.femsle.2005.01.037
- Taheri, P., Samadi, N., Ehsani, M. R., Khoshayand, M.R. & Jamalifar, H. (2012). An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp lactis* ST1 isolated from goat milk. *Braz J Microbiol*, 43(4): 1452-1462. Doi: 10.1590/S1517-838220120004000029
- Tamura K. & Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10:512-526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729. Doi: 10.1093/molbev/mst197
- Temmerman, R., Huys, G., & Swings, J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7), 348-359. Doi: 10.1016/j.tifs.2003.12.007

Teneva A. T. & Beshkova, D. (2016). Non-traditional sources for isolation of lactic acid bacteria. *Annals of microbiology*, 66(1), 449-459  
Doi: 10.1007/s13213-015-1127-9

Theron, J. & Cloete, T. E. (2008). Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments, *Critical Reviews in Microbiology*, 26: 1, 37-57. Doi: 10408410091154174

Tulip Group. (2010). Soil Microbiology: Important Aspects. *Journal of Hygiene Sciences*, 3, 2-6. Recuperado de: [http://www.tulipgroup.com/Common\\_New/HS\\_magazine\\_PDF/Hygiene\\_sciences%2013.pdf](http://www.tulipgroup.com/Common_New/HS_magazine_PDF/Hygiene_sciences%2013.pdf)

Usman & Hosono, A. (1999). Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *Journal of Dairy Science*, 82(2), 243-248. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75229-X

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438. Recuperado de: <http://mibr.asm.org/content/60/2/407.short>

Vásquez, M. S.M., Suárez, M. H. & Zapata, B.S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. de Nut.*, 36(1): 64-71. Recuperado de: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182009000100007&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182009000100007&script=sci_abstract)

Vedamuthu, E. R. (1994). The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 77(9), 2725-2737. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77215-5

- Ventura M, Turrone F, Ribbera A, Foroni E & Sinderen D. (2008). Bifidobacteria: *The Model Human Gut Commensal*. En J. Versalovic, M. Wilson (ed), *Therapeutic Microbiology*. p 35-51., Washington, DC: ASM Press. Doi: 10.1128/9781555815462.ch4
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic **bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance**. *Food Research International*, 36(9), 895-904. Doi: 10.1016/S0963-9969(03)00098-X
- Volke, S. T. & Velasco T. J. A. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. México: Instituto Nacional de Ecología -SEMARNAT.
- Volke, S. T., Velasco T. J. A. & Rosa P. D. A. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. México: Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT.
- Walker, D. K. & Gilliland, S. E. (1993). Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of dairy science*, 76(4), 956-961. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77422-6
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of bacteriology*, 173(2): 697-703. Recuperado de: <http://jb.asm.org/content/173/2/697.short>
- Yang J., Cao Y., Cai Y. & Terada F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 93 :3136–3145. Doi: 10.3168/jds.2009-2898.

Yusuf, M. A., & Hamid, T. H. (2013). Lactic acid bacteria: bacteriocin producer: A mini review. *IOSR J Pharm*, 3, 44-50. Recuperado de: <http://irep.iium.edu.my/37062/>

## APÉNDICE

### Apéndice A

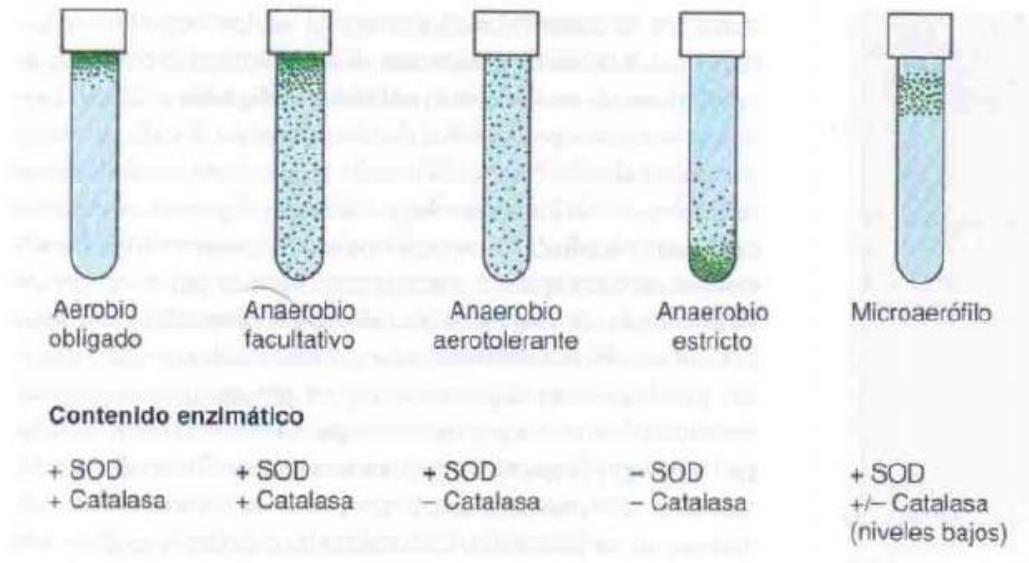


Figura 10. Crecimiento microbiano en relación con la cantidad de oxígeno disuelto en el medio y el contenido enzimático. La cantidad de oxígeno va disminuyendo conforme a la profundidad del medio (Prescott *et al.*, 2004).

## Apéndice B

### Tinción de Gram

Esta técnica permite agrupar a las bacterias en dos grupos, de acuerdo con la composición de la pared celular: Bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas (Prescott *et al.*, 2004).

Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de péptido glicano o mureína (20-80 nm de grosor) sobre la membrana citoplasmática las cuales retendrán el primer colorante (el cristal violeta). Las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa (7-8 nm de grosor, compuesta de lipopolisacáridos-lipoproteína) rodeando a una capa delgada de peptidoglicano (2-7 nm de grosor) que se sitúa por encima de la membrana citoplasmática de la célula (Prescott *et al.*, 2004).

La membrana externa es removida por el alcohol-acetona en dicha técnica y estas células son diferenciadas más tarde al agregar la safranina. El yodo es agregado después del primer colorante y actúa como mordente aumentando la interacción del primer colorante con la célula (Prescott *et al.*, 2004).

## Apéndice C

Composición de la galería API 50 CH (Biomériux, 1989).

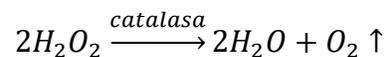
Tubo	Ensayo	Componente activo	Tubo	Ensayo	Componente activo
0		Testigo	25	ESC	ESculina citrato férrico
1	GLY	GLIcerol	26	SAL	SALicina
2	ERY	ERItritol	27	CEL	D-CElobiosa
3	DARA	D-ARAbinosa	28	MAL	D-MALtosa
4	LARA	L-ARAbinosa	29	LAC	D-(origen bovino)
5	RIB	D-RIBosa	30	MEL	D-MELibiosa
6	DXYL	D-XILosa	31	SAC	D-SACarosa
7	LXYL	L-XILosa	32	TRE	D-TREhalosa
8	ADO	D-ADOnitol	33	INU	INULina
9	MDX	Metil-βD-Xilopiranosida	34	MLZ	D-MeLeZitosa
10	GAL	D-GALactosa	35	RAF	D-RAFinosa
11	GLU	D-GLUcosa	36	AMD	AlmiDón
12	FRU	D-FRUctosa	37	GLYG	GLIcóGeno
13	MNE	D-MamNosA	38	XLT	XILiTol
14	SBE	L-SorBosA	39	GEN	GENTIobiosa
15	RHA	L-RHAMnosa	40	TUR	D-TURanosa
16	DUL	DULcitol	41	LYX	D-LIXosa
17	INO	INOsitol	42	TAG	D-TAGatosa
18	MAN	D-MANitol	43	DFUC	D-FUCosa
19	SOR	D-SORbitol	44	LFUC	L-FUCosa
20	MDM	Metil-αD-Manopiranosida	45	DARL	D-ARAbitoL
21	MDG	Metil-αD-Glucopiranosida	46	LARL	L-ARAbitoL
22	NAG	N-AcetilGlucosamina	47	GNT	GlucNaTo potásico
23	AMY	AMIGdalina	48	2KG	2-CetoGluconato potásico
24	ARB	ARButina	49	5KG	5-CetoGluconato potásico

## Apéndice D

### Prueba catalasa

La prueba consiste en añadir peróxido de hidrógeno al 3% a una pequeña colonia. Si la colonia posee catalasa, se producirán moléculas de oxígeno que visualmente las identificaremos como pequeñas burbujas, además de moléculas de agua (prueba positiva). En caso contrario no ocurrirá absolutamente nada (prueba negativa) (Forbes, 2009)

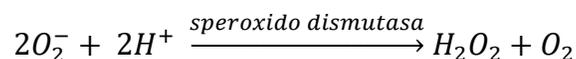
La reacción que se lleva a cabo es:



## Apéndice E

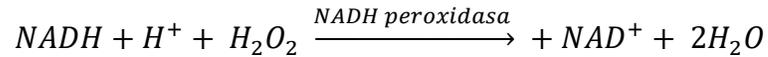
- Super oxido dismutasa (SOD)

La enzima lleva a cabo una reacción de dismutación del anión super óxido ( $O_2^-$ ) el cual es una especie muy inestable y produce peróxido de hidrógeno y oxígeno, el oxígeno producido de esta reacción vuelve a formar parte de otra reacción hasta convertirlo en peróxido de hidrógeno o agua (Condon, 1987; Higuchi *et al.*, 2000).



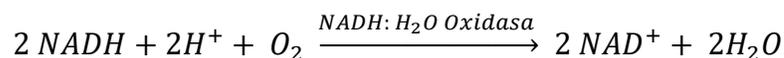
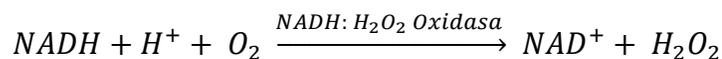
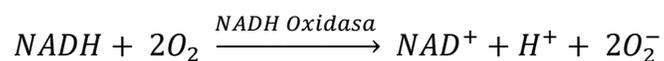
- NADH peroxidasa

Algunas BAL producen esta enzima la cual cataliza la reacción para producir agua a partir de peróxido de hidrógeno (Condon, 1987; Higuchi *et al.*, 2000).

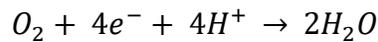
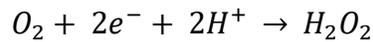
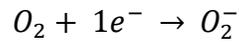


- NADH oxidasa

La NADH oxidasa oxida a la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH, este compuesto proviene de la célula) mediante la reducción del oxígeno molecular que provienen del medio. Existen tres tipos, las cuales cataliza reacciones diferentes: una al formar el anión super óxido ( $O_2^-$ ), otra al formar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y la otra al formar agua ( $H_2O$ ) (Condon, 1987; Higuchi *et al.*, 2000).

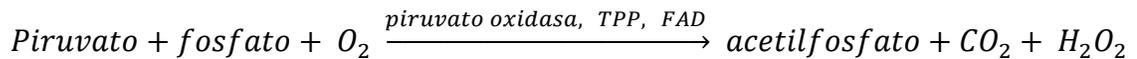


Estas enzimas NADH oxidasa catalizan la transferencia de uno, dos o cuatro electrones de  $O_2$  a  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  o  $H_2O$  (Condon, 1987; Higuchi *et al.*, 2000).



- Piruvato oxidasa

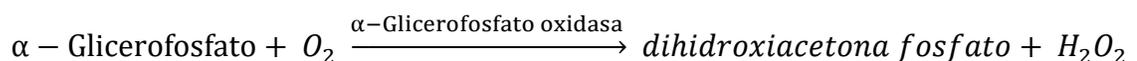
Esta enzima produce peróxido de hidrogeno al reaccionar el piruvato con el oxígeno molecular (Condon, 1987; Higuchi *et al.*, 2000).



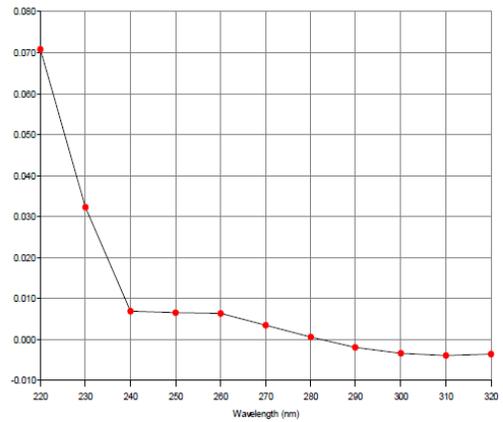
TPP = tiamina pirofosfato; FAD = flavin adenin dinucleotido

- $\alpha$ -Glicerofosfato oxidasa

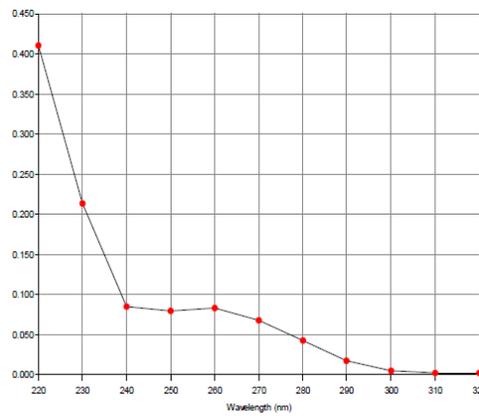
Es una enzima que contiene FAD y se encuentra en algunas especies ácido lácticas que utilizan el glicerol como fuente de carbono dependiente de oxígeno, como los *enterococcus*, *lactobacillus*, *Pediococcus pentosaceus* (Condon, 1987; Higuchi *et al.*, 2000).



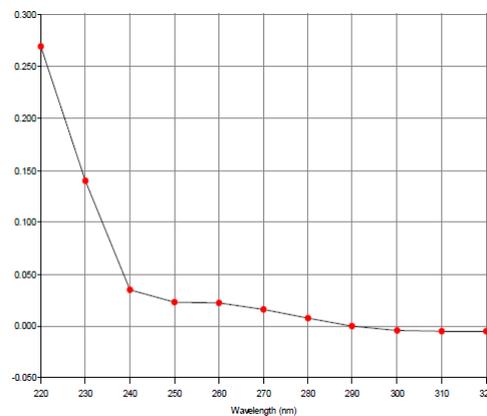
## Apéndice F



Ceba 2

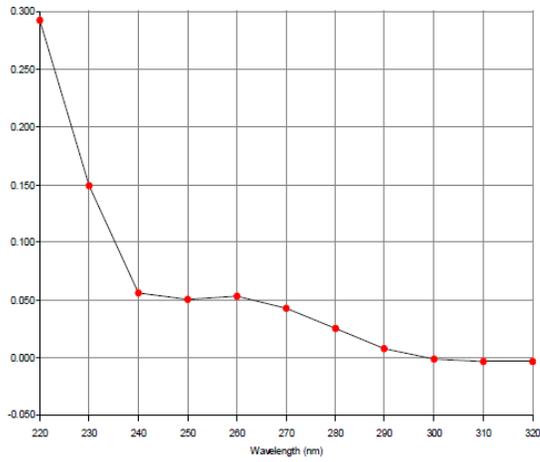


Ceba 3

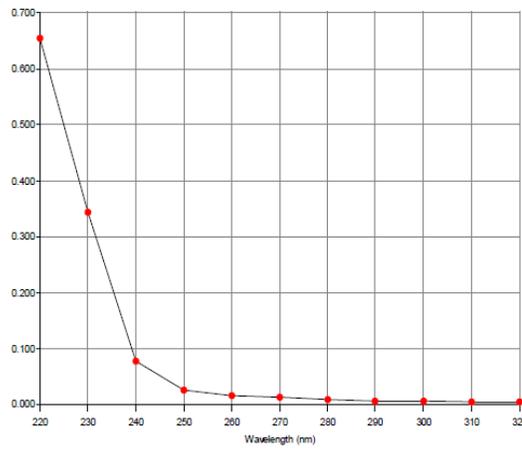


Ceba 6

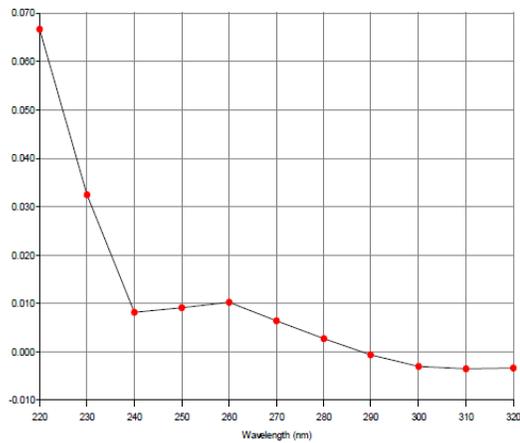
Imagen 12. Cuantificación de la extracción de ADN de las cepas a una absorbancia de  $A_{260}/A_{280}$  nm (absorbancia=f(longitud de onda))



Ceba 7

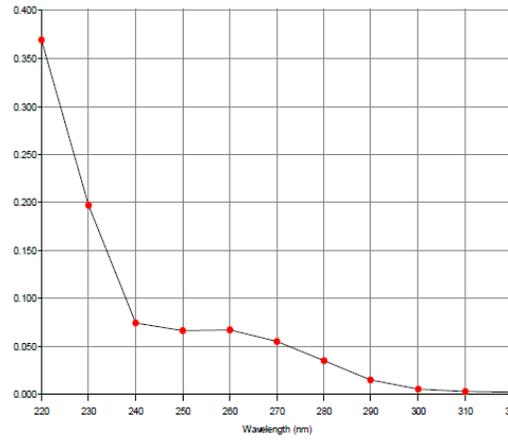


Ceba 8

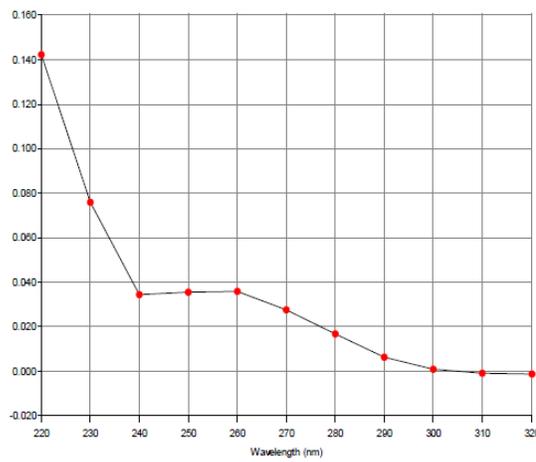


Ceba 11

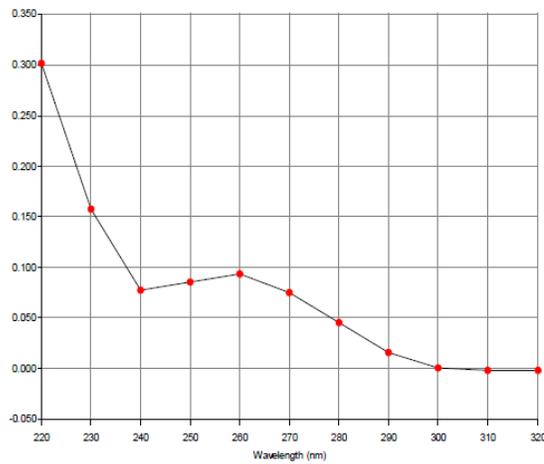
Imagen 13. Cuantificación de la extracción de ADN de las cepas a una absorbancia de A260/A280 nm (absorbancia=f(longitud de onda)).



Ceba 12



Ceba 13



Ceba 15

Imagen 14. Cuantificación de la extracción de ADN de las cepas a una absorbancia de  $A_{260}/A_{280}$  nm (absorbancia=f(longitud de onda)).

La pureza del ADN se determina mediante espectrofotometría. Los ácidos nucleicos absorben a una longitud de onda de 260 nm y las proteínas lo hacen a 280 nm. En las Imágenes 12, 13 y 14 se puede ver que el pico de absorbancia a 260 nm es superior que el de 280 nm, por lo que se considera que la extracción de ADN fue buena y no tiene impurezas de proteínas.