UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE RATÓN PARA SU USO EN LA SALUD ANIMAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

IVONNE LIZETH SANDOVAL MOSQUEDA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. ADRIANA LLORENTE BOUSQUETS

(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. SILVINA GRACIELA FADDA AREDES

(CENTRO DE REFERENCIA PARA LACTOBACILOS-CONICET)

DR. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA

(FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN)

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO (FES CUAUTITLÁN), MAYO 2023

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

DEDICATORIAS

Leonardo Damian Ortiz Sandoval

Hijo mío, te dedico mis logros con todo mi amor.

Tu eres el hermoso regalo que el universo me dio, cuando llegaste a mi vida te convertiste en el motor de mi todo y gracias a tu existencia yo evolucione. Dami, la vida está llena de momentos bellos y momentos difíciles, aprende de ambos y trabaja duro para cumplir tus sueños.

Tu propósito en la vida es encontrar tu propósito y poner todo tu corazón y tu alma en él.

Siddharta Gautama Buda

AGRADECIMIENTOS

Programa de **Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal** de la **UNAM**, gracias por permitirme crecer profesionalmente.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) agradezco la beca **639637**, otorgada durante el periodo de 2019-1 al 2023-1.

Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT-DGAPA, gracias por apoyo con clave **IN230820** para el proyecto "Evaluación *in vitro* del potencial antagónico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de ratón".

Programa Interno de Apoyo para proyectos de Investigación PIAPI-FESC, gracias por el apoyo con clave **CI2239**.

Dra Adriana Llorente Bousquets, desde el fondo de mi corazón muchas gracias por el obsequio de ser mi tutora. Son años de trabajo y dedicación, que han dejado en mi el compromiso de devolver a mis futuros alumnos el profesionalismo que usted me ha enseñado.

Dra. Silvina Fadda, mi perspectiva sobre el tamaño del mundo se hizo pequeña gracias a que la conocí y a su apoyo. Muchas gracias por ser mi tutora y por compartir su experiencia para lograr este trabajo.

Dr. Juan Carlos Del Río García, muchas gracias por su apoyo y el tiempo que ha dedicado a este proyecto, ha sido una dicha tenerlo como profesor y como tutor ejemplar.

M. en C. Jorely Palma Clemente, amiga, sonrío cada vez que recuerdo los experimentos que realizamos en el laboratorio, muchas gracias por tu amistad, tu compañía y el apoyo tan profesional para este trabajo, te quiero mucho.

El presente proyecto fue realizado en el **Laboratorio 7 de Bioconservación**, de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la FESC, Campo 4.

Diversos aspectos de esta tesis fueron incluidos en el siguiente artículo:

Sandoval-Mosqueda, I.L., Llorente-Bousquets, A., Soto, C., Márquez, C.M., Fadda, S., Del Río García, J.C. (2023). *Ligilactobacillus murinus* strains isolated from mice intestinal tract: molecular characterization and antagonistic activity against food-borne Pathogens. *Microorganisms*, **11**(4), 942, 1-17. https://doi.org/10.3390/microorganisms11040942

el cual se incluye en los anexos.

ÍNDICE DE TESIS

página

ÍNDICE DE CUADROS ..... *IX*

ÍNDICE DE FIGURAS ..... *XI*

RESUMEN *14*

ABSTRACT *16*

INTRODUCCIÓN *18*

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO *21*

1.1. Salud y Bienestar (ODS, ONU) **22**

1.2. Una Salud (FAO-OMS-OIE) **22**

1.3. Enfermedades zoonóticas **22**

1.4. *Campylobacter spp*. **23**

1.4.1. Aspectos clínicos **24**

1.4.2. *Epidemiología* **25**

1.4.3. Factores de transmisión **25**

1.5. *Escherichia coli* **26**

1.5.1. *E. coli* EPEC **27**

1.5.2. Patogénesis **27**

1.5.3. Aspectos clínicos **28**

1.5.4. Epidemiología **29**

1.5.5. Factores de transmisión **29**

1.6. *Listeria monocytogenes* **29**

1.6.1. Aspectos clínicos **29**

1.6.2. Epidemiología **30**

1.6.3. Factores de transmisión **30**

1.7. *Staphylococcus aureus* **31**

1.7.1. Enfermedad **31**

1.7.2. Epidemiología **32**

1.7.3. Factores de transmisión **32**

1.8. Probióticos **32**

1.8.1. Control de patógenos **34**

1.8.2. Mantenimiento de la barrera epitelial **40**

1.8.3. Actividad inmunomoduladora 41
1.8.4. Efectos nutricionales 41
1.9. Uso de probióticos en la producción animal 42
1.10. Directrices de evaluación de cepas con potencial probiótico 43
1.10.1. Identificación del género y especie 43
1.10.2. Estudios *in vitro* para la selección de probióticos 44
1.10.3. Estudios *in vivo* 45
1.10.4. Consideraciones de seguridad 45
1.11. Principales microorganismos utilizados como probióticos 45
1.11.1. Bacterias Lácticas (BL) 46
1.11.2. Taxonomía de las BL 46
1.11.3. Reclasificación del género *Lactobacillus* 46
1.11.4. Género *Ligilactobacillus* 47
1.12. Antecedentes de la línea de investigación 47
***HIPÓTESIS* 48**
***OBJETIVO GENERAL* 49**
***OBJETIVOS ESPECÍFICOS* 49**
***CAPÍTULO II: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL* 50**
2. Identificación microbiológica y molecular de las 18 cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón 51
2.1. Identificación microbiológica y conservación de las cepas de BL 52
2.2. Identificación molecular por PCR y caracterización filogenética mediante el gen 16S rRNA 52
2.2.1. Extracción de DNA 52
2.2.2. Diseño de primers 52
2.2.3. Condiciones de la PCR 54
2.2.4. Purificación y secuenciación de los amplificados de la PCR 54
2.2.5. Edición y alineamiento de secuencias en Ribosomal Data Project y BLAST-NCBI ... 54
2.2.6. Matriz de porcentajes de identidad 55
2.2.7. Construcción del Árbol filogenético 55
2.3. Identificación de los fenómenos de antagonismo de las 18 cepas de BL aisladas frente a patógenos de interés clínico y zoonótico (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Campylobacter jejuni* y *E. coli* REPEC O103) 56
2.3.1. Cinéticas de crecimiento de las cepas de BL 57

2.3.2. Parámetros cinéticos bacterianos 57

2.3.3. Manejo de microorganismos de prueba 58

2.3.4. Actividad antagónica por ensayos de difusión en agar 58

2.3.4.1. Actividad antagónica por ensayos de difusión en agar de *L. murinus* B1 frente a *E. coli* y *C. jejuni* 59

2.4. Actividad bacteriolítica de los sobrenadantes 60

2.4.1. Obtención de los sobrenadantes en fase logarítmica 60

2.4.2. Precipitación de proteínas 60

2.4.3. Cuantificación de proteínas 61

2.4.4. Perfil electroforético SDS-PAGE 61

2.4.5. Zimogramas de actividad *in situ* 61

2.5. Identificación de proteínas con actividad lítica de *L. murinus* B1 por la técnica de huella peptídica por UPLC-MS 62

2.5.1. Preparación de geles SDS-PAGE 63

2.5.2. Preparación de las muestras 63

2.5.3. Análisis por UPLC-MS 64

2.6. Pruebas de sensibilidad a antibióticos mediante ensayos de difusión en agar de las 18 cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón 66

2.6.1. Ensayos de difusión en agar 67

2.7. Ensayos *in vitro* de sobrevivencia a condiciones simuladas de tracto gástrico e intestinal de la cepa *Ligilactobacillus murinus* B1 68

2.7.1. Sobrevivencia a condiciones de medio gástrico 69

2.7.2. Sobrevivencia a condiciones de medio intestinal 69

2.8. Estimación de la capacidad de formación de biopelículas y adherencia a mucinas de *Ligilactobacillus murinus* B1 70

2.8.1. Formación de biopelículas 71

2.8.2. Adherencia a mucinas 72

CAPÍTULO III: RESULTADOS 73

3.1. Identificación de las cepas de BL aisladas por técnicas de microbiología clásica 74

3.2. Identificación molecular por PCR mediante el gen 16S rRNA y caracterización filogenética mediante el gen 16S rRNA 77

3.2.1. Análisis de secuencias de los amplificados 78

3.2.2. Alineamiento de las secuencias en el programa RDP 78

3.2.3. Alineamiento de las secuencias en el programa BLAST del NCBI 79

3.2.4. Registro de secuencias en GenBank 80

3.2.5. Matriz de porcentajes de identidad 81

3.2.6. Árbol filogenético 82

3.3. Identificación de los fenómenos de antagonismo de las 18 cepas de BL aisladas frente a patógenos de interés clínico y zoonótico (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Campylobacter jejuni* y *E. coli* REPEC O103) 83

3.3.1. Construcción de cinéticas de crecimiento de las 18 cepas de BL aisladas..... 83

3.3.2. Parámetros cinéticos bacterianos..... 87

3.3.3. Actividad antagónica de las células de BL mediante ensayos de difusión en agar .. 88

3.3.4. Actividad antagónica por ensayos de difusión en agar de *L. murinus* B1 frente a *E. coli* y *C. jejuni* 91

3.3.5. Actividad bacteriolítica de los sobrenadantes 92

3.3.6. Cuantificación de proteínas en fase logarítmica de las 18 cepas de BL aisladas 93

3.3.7. Análisis electroforético SDS-PAGE de las proteínas 94

3.3.8. Zimogramas de actividad *in situ* de las 18 cepas de BL aisladas 95

3.4. Identificación de proteínas con actividad lítica de *L. murinus* B1 mediante la técnica de huella peptídica UPLC-MS 98

3.4.1. Análisis de geles glicina y tricina SDS-PAGE y Zimogramas para la obtención de bandas con actividad lítica 98

3.4.2. Análisis por UPLC-MS..... 99

3.5. Pruebas de sensibilidad a antibióticos mediante ensayos de difusión en agar de las 18 cepas aisladas de tracto intestinal de ratón 102

3.6. Ensayos *in vitro* de sobrevivencia a condiciones simuladas de tracto gástrico e intestinal de *Ligilactobacillus murinus* B1 104

3.6.1. Sobrevivencia al pH ácido del medio gástrico 104

3.6.2. Sobrevivencia a las sales biliares del medio intestinal 104

3.7. Capacidad de formación de biopelículas y adherencia a mucinas de *Ligilactobacillus murinus* B1 105

3.7.1. Formación de biopelículas por el método de tinción con cristal violeta 105

3.7.2. Capacidad de adherencia a mucinas 106

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... 108

4.1. Identificación molecular por PCR y caracterización filogenética mediante el gen 16S rRNA..... 109

4.2. Identificación de los fenómenos de antagonismo de las 18 cepas de BL aisladas frente a patógenos de interés clínico y zoonótico..... 110

4.3. Sensibilidad a los antibióticos de las 18 cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón….. 114

4.4. Sobrevivencia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de *L. murinus* B1……. 115

4.5. Capacidad de formación de biopelículas y adherencia a mucinas de *L. murinus* B1 . 117

CONCLUSIONES 119

RECOMENDACIONES*.....*121

LITERATURA CITADA*.....*122

ANEXOS*.....*133

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Variantes patógenas de *E. coli* diarreogénica 26
Cuadro 2. Clasificación de Bacteriocinas 37
Cuadro 3. Cepas con potencial probiótico estudiadas en la producción animal 43
Cuadro 4. Primers especie-específicos utilizados para la identificación de cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón 53
Cuadro 5. Categorías interpretativas y puntos de corte de diámetro de zona 67
Cuadro 6. Clasificación de secuencias de *Ligilactobacillus* (RDP Naive Bayesian rRNA versión 2.11) 79
Cuadro 7. Identificación molecular (BLAST-NCBI) de cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón 80
Cuadro 8. Matriz de identidad, valores de similitud calculados de la región variable V2 del gen 16S rRNA de cada cepa aislada. 81
Cuadro 9. Parámetros cinéticos de las cepas de BL. 88
Cuadro 10. Halos de inhibición en placa de agar (mm) de cepas de BL aisladas. 91
Cuadro 11. Concentración de proteína de los sobrenadantes precipitados de cepas de BL. 93
Cuadro 12. Masa molecular aparente de las bandas encontradas en los perfiles electroforéticos de las proteínas de sobrenadantes (1 mL) de cultivo de 4 h 95
Cuadro 13. Péptidos identificados por UPLC-MS 101
Cuadro 14. Patrón de sensibilidad o resistencia a antibióticos de las cepas de BL por ensayos de difusión en agar 103
Cuadro 15. Cinéticas de crecimiento de las cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón 139
Cuadro 16. Cinéticas de crecimiento de las cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón 140
Cuadro 17. Preparación de soluciones para SDS-PAGE (Laemmli) 143
Cuadro 18. Preparación de soluciones para geles tricina SDS-PAGE 145
Cuadro 19. Sobrevivencia de *L. murinus* B1 (log UFC mL-1) a condiciones en medio gástrico simulado. 146
Cuadro 20. Porcentaje de sobrevivencia de *L. murinus* B1 en medio gástrico simulado. 146

Cuadro 21. Sobrevivencia de *L. murinus* B1 (log UFC mL-1) a condiciones en medio intestinal simulado. 147
Cuadro 22. Porcentaje de sobrevivencia de *L. murinus* B1 en medio intestinal simulado.. 147
Cuadro 23. Formación de biopelículas en placas de poliestireno. 148
Cuadro 24. Formación de biopelículas en tubos de vidrio. 148
Cuadro 25. Adherencia a mucinas inmovilizadas en placas de poliestireno 149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del proceso de la lesión tipo A/E (adherencia/destrucción) causadas por *E. coli* EPEC en las células intestinales. 28
Figura 2. Metabolitos con actividad antimicrobiana producidos por bacterias lácticas 35
Figura 3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas 37
Figura 4. Estructura del peptidoglicano y especificidad por sustrato de las Peptidoglicano Hidrolasas 39
Figura 5. Resumen metodológico para la identificación y caracterización molecular de las 18 cepas de BL aisladas 51
Figura 6. Resumen metodológico para identificar los fenómenos de antagonismo de las 18 cepas de BL aisladas frente a patógenos de interés clínico y zoonótico 56
Figura 7. Curva de crecimiento bacteriano. 57
Figura 8. Resumen metodológico de los ensayos de difusión en agar para determinar la sensibilidad de las 18 cepas de BL a diferentes antibióticos de uso humano y veterinario . 66
Figura 9. Resumen metodológico de la sobrevivencia a condiciones gástricas e intestinales de *Ligilactobacillus murinus* B1 68
Figura 10. Resumen de la metodología para determinar la capacidad de formación de biopelículas y adherencia a mucinas de *Ligilactobacillus murinus* B1 70
Figura 11. Cultivo en agar MRS y tinción de Gram de las 18 capas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón 76
Figura 12. Productos obtenidos por PCR con los primers de *Ligilactobacillus animalis* para las 18 cepas de BL aisladas 77
Figura 13. Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud de las 18 cepas aisladas de tracto intestinal 82
Figura 14. Cinéticas de crecimiento de 18 cepas de BL 86
Figura 15. Análisis estadístico de cinéticas de crecimiento de las 18 cepas de BL aisladas 87
Figura 16. Ensayos de difusión en agar de las 18 cepas de BL aisladas *vs*. *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *E. coli* REPEC 89

Figura 17. Ensayo de difusión en agar de las 18 cepas de BL aisladas *vs. Campylobacter jejuni* ATCC 49943 90
Figura 18. Ensayo de difusión en agar con diferentes condiciones de *Ligilactobacillus murinus* B1 frente *E. coli* REPEC y *Campylobacter jejuni*. 92
Figura 19. Proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivo de 4 h de las cepas de BL aisladas..... 94
Figura 20. Zimogramas de actividad *in situ* de los sobrenadantes de cultivo de 4 h de las cepas de BL aisladas copolimerizados con *Micrococcus lysodeikticus, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni* 97
Figura 21. Zimogramas de las proteínas de los sobrenadantes de cultivo de las cepas de BL aisladas, copolimerizados con las células de *Campylobacter jejuni* 98
Figura 22. SDS-PAGE y zimograma de sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* B1 con *E. coli* REPEC O103 copolimerizadas..... 99
Figura 23. UPLC-MS de la actividad lítica 100
Figura 24. Sobrevivencia de *Ligilactobacillus murinus* B1 a condiciones simuladas de tracto gástrico e intestinal 105
Figura 25. Formación de biopelículas en placas de poliestireno y superficie de vidrio ... 106
Figura 26. Adherencia de *Ligilactobacillus murinus* B1 a mucinas inmovilizadas en placas de poliestireno..... 107
Figura 27. Curva estándar con Albúmina Sérica Bovina 141

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

$\lambda_{595\ nm}$: Longitud de onda de 595 nm

$\lambda_{600\ nm}$: Longitud de onda de 600 nm

A: Absorbancia

ATCC: American Type Culture Collection

BL: Bacterias Lácticas

BSA: Bovine Serum Albumine

$CaCl_2$: Cloruro de Calcio

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DO: Densidad Óptica

FAO: Food and Agriculture Organization

ECDC: European Centre for Desease Prevention and Control

EFSA: European Food Safety Authority

EPEC: Enteropathogenic *Escherichia coli*

g: gramo

h: horas

H_2Od: Agua destilada

HCl: Ácido Clorhídrico

***L.*:** *Lactobacillus*

mA: miliamperios

µg: microgramo

µl: microlitro

mM: milimol

MPM: Marcador de Peso Molecular

NaOH: Hidróxido de sodio

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

PCR: Polimerase Chain Reaction

pH: potencial de Hidrogeniones

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

***spp*:** especies

STEC: Shiga Toxin producing *Escherichia coli*

UFC mL^{-1}: Unidades formadoras de colonias por mililitro

UN: United Nations

WHO: World Health Organization

RESUMEN

Considerando los Objetivos de desarrollo sostenible (ODS) tercero "Buena salud y bienestar" y el enfoque de "Una Salud" (FAO-OMS-OIE) para el desarrollo de estrategias eficaces aplicadas a la resistencia bacteriana, los peligros para la inocuidad de los alimentos y los riesgos de zoonosis, este proyecto exploró el potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de tracto intestinal de ratones recién destetados. Se realizó la identificación y caracterización a nivel molecular y filogenético de las 18 cepas aisladas, así como la evaluación de su potencial antagónico, aplicando pruebas cualitativas de actividad inhibitoria frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos de interés clínico y zoonótico, además de ensayos de resistencia a diferentes antibióticos. Se estandarizaron las técnicas de sobrevivencia a condiciones simuladas de tracto gastrointestinal, capacidad de formación de biopelículas y adherencia a mucinas. Para la identificación molecular se utilizaron cebadores específicos del gen 16S rRNA y mediante BLAST-NCBI se identificaron y registraron en el GenBank 16 cepas de *Ligilactobacillus murinus*, un *Ligilactobacillus animalis* y un *Streptococcus salivarius* tras la confirmación de su porcentaje de identidad y el análisis filogenético. Como resultado en las pruebas de difusión en agar, las células viables de las 18 cepas aisladas, en fase logarítmica (7-9 log UFC mL^{-1}), mostraron actividad antibacteriana con halos de inhibición contra *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (13 a 17 mm), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (13 a 16 mm), *Escherichia coli* O103 enteropatógena (18 a 25 mm) y *Campylobacter jejuni* ATCC 49943 (36 a 44 mm) de diámetro. Al evaluar sus sobrenadantes de cultivo mediante técnicas electroforéticas y zimográficas se confirmó la presencia de bandas líticas con una masa molecular aparente de 24 kDa y otra de 107 kDa en las 16 cepas de *Ligilactobacillus murinus*. La proteína con actividad litica de 107 kDa analizada mediante UPLC-MS reveló la presencia de una peptidoglicano hidrolasa de tipo N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa implicada en la citolisis y considerada una enzima bacteriolítica con actividad antimicrobiana. La banda de 24 kDa mostró similitud con un fragmento de proteína con función de aminopeptidasa. En los ensayos de sensibilidad a diferentes antibióticos utilizando el método de difusión en agar, las cepas de *Ligilactobacillus murinus* A2, B1, E2, E3 y F1 mostraron el mejor perfil de sensibilidad, mientras que *Ligilactobacillus animalis* H2 presentó el mayor número de resistencias. Al evaluar la cepa

de *Ligilactobacillus murinus* B1 demostró capacidad de sobrevivencia a condiciones gástricas tras dos horas de incubación con pH 2 (6.00±0.4 log UFC mL^{-1}) y pH 4 (6.41±0.1 log UFC mL^{-1}) y a condiciones de medio intestinal tras cuatro horas de incubación en concentraciones de sales biliares al 0.3%, se obtuvieron cuentas de (5.78±0.3 log UFC mL^{-1}) y 0.6% (5.64±0.2 log UFC mL^{-1}), además de poseer mayor capacidad de formación de biopelículas en superficies abióticas y la misma capacidad de adherencia a mucinas comparada con *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 utilizada como control en el ensayo. Se espera que estos hallazgos ofrezcan una alternativa en la búsqueda de nuevas cepas con potencial probiótico, para inhibir patógenos que promuevan la salud y bienestar animal y en consecuencia también la salud humana.

ABSTRACT

Considering the objectives of Sustainable Development Goals (SDG) third "Good health and well-being" and the comprehensive approach "One Health" (FAO-WHO-OIE) for the development of effective strategies to apply against bacterial resistance, food safety dangers and zoonosis risks, this project explored the probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from the intestinal tract of recently weaned mice. The identification and characterization at the molecular and phylogenetic level of the 18 isolates was carried out, as well as the evaluation of their antagonistic potential, using qualitative tests of inhibitory activity against Gram-positive and Gram-negative pathogens of clinical and zoonotic interest, as well as tests of resistance tests to different antibiotics. The techniques of tolerance to conditions of the gastrointestinal tract, capacity for biofilm formation and adherence to mucins were standardized. For molecular identification, specific primers of the 16S rRNA gene were used and 16 strains of *Ligilactobacillus murinus*, one *Ligilactobacillus animalis* and one *Streptococcus salivarius* were identified and registered in the GenBank by means of BLAST-NCBI after confirmation of their percentage identity and phylogenetic analysis. As a result of the agar diffusion tests, the viable cells of the 18 isolated strains, in logarithmic phase (7-9 log UFC mL-1), showed antibacterial activity with inhibition halos against *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (13 to 17 mm), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (13 to 16 mm), enteropathogenic *Escherichia coli* O103 (18 to 25 mm), and *Campylobacter jejuni* ATCC 49943 (36 to 44 mm) of diameter. When evaluating their culture supernatants by electrophoretic and zymographic techniques, the presence of lytic bands with an apparent molecular mass of 24 kDa and another of 107 kDa in the 16 strains of *Ligilactobacillus murinus*. UPLC-MS analysis allowed the identification of a 107 kDa lytic protein as an N-acetylmuramoyl-L-amidase involved in cytolysis and considered as a bacteriolytic enzyme with antimicrobial activity. The 24 kDa stripe displayed similarity with a fragment of protein with aminopeptidase function. In the susceptibility tests to different antibiotics using the agar diffusion method, *Ligilactobacillus murinus* A2, B1, E2, E3 and F1 strains showed the best susceptibility profile, while *Ligilactobacillus animalis* H2 presented the highest number of resistances. When evaluating *Ligilactobacillus murinus* B1 strain, it demonstrated survival capacity under gastric conditions after two hours of incubation at pH 2 (6.00±0.4 log UFC mL^{-1}) and pH 4 (6.41±0.1 log UFC mL^{-1}) and at intestinal medium conditions after four hours

of incubation at concentrations of bile salts at 0.3% (5.78±0.3 log UFC mL^{-1}) and 0.6% (5.64±0.2 log UFC mL^{-1}), in addition to having a greater capacity for biofilm formation on abiotic surfaces and the same capacity for adherence to mucins compared to *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 used as a control in the assay. These findings are expected to offer an alternative in the search for new strains with probiotic potential, to inhibit pathogens to promote animal health and well-being and, subsequently, human health as well.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades zoonóticas, los peligros de la inocuidad de los alimentos y la resistencia bacteriana, son problemas de salud pública prioritarios en cuanto a su atención, además están interconectados ya que afectan a humanos y animales. En este sentido, las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) principalmente las zoonóticas son responsables de estadísticas críticas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. De acuerdo con la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA y ECDC, 2021), *Campylobacter* s*pp*., es el agente causal zoonótico más importante de enfermedad diarreica notificado con mayor frecuencia, con 120 946 casos, 8,605 hospitalizaciones y 45 muertes, lo cual representó más del 60% de los casos reportados para el 2020 en la Unión Europea. Así mismo, *E. coli* es reconocido como el agente causal más importantes de enfermedad diarreica aguda en niños menores de 4 años y la *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) la cepa mayormente asociada como responsable, con 4,446 reportes, 652 hospitalizaciones y 13 muertes. *Listeria monocytogenes* es el agente patógeno responsable de la Listeriosis, enfermedad más severa, con 1,876 reportes, 780 hospitalizaciones y 167 muertes, además de las altas tasas de fatalidad del 30%, el número de brotes asociados con *L. monocytogenes* se ha incrementado en los últimos 4 años. Entre las ETA, *Staphylococcus aureus* es el microorganismo aislado con mayor frecuencia en casos de intoxicación alimentaria aguda y considerado uno de los principales patógenos en las infecciones hospitalarias, con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Matuszewska *et al*. 2020). De acuerdo con el CDC, en 2017 en los E.U., se reportaron aproximadamente 119,247 infecciones del torrente sanguíneo por *S. aureus,* con 19,832 muertes asociadas. De acuerdo con estos reportes, durante el periodo del 2005 al 2012 las tasas de infección del torrente sanguíneo por *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) de inicio hospitalario disminuyeron 17% anualmente, sin embargo, se ha observado que esta disminución se desaceleró durante el periodo del 2013 al 2016 (Kourtis *et al*. 2019).

Se ha documentado que el uso indiscriminado de antimicrobianos en las producciones pecuarias, además de provocar la aparición de bacterias resistentes que causan infecciones en humanos, y que los animales excretan un porcentaje significativo (75%–90%) de antimicrobianos sin ser metabolizados, los cuales son dispersados en el medio ambiente (WHO, 2021).

El incremento de resistencia a los antibióticos asociado con estos patógenos, es uno de los principales factores que contribuye en la gravedad de las enfermedades producidas por ellos, como se ha observado recientemente en aislamientos humanos y animales de cepas de *Campylobacter* spp., *E. coli* y *S. aureus* multi-resistentes (WHO, 2021; Sarno *et al*. 2021).

Debido a que la buena salud es fundamental para el desarrollo sostenible, la Agenda 2030 de las Naciones Unidas, estableció los "Objetivos de Sostenibilidad", entre los que destaca el tercer objetivo de lograr "Salud y bienestar". Se puede identificar la complejidad e interconexión de ambos enfoques (WHO-ONU), además teniendo en cuenta las prioridades de salud global emergentes, como es el caso de la resistencia a los antimicrobianos (United Nations 2015). Entre las estrategias clave para abordar el problema constante de enfermedades infecciosas y los desafíos emergentes, es considerado the objetivo de lograr "Salud y bienestar" y el enfoque "Una Salud", debido a que son enfoques multisectoriales esenciales para construir una buena salud para todos.

Entre el desarrollo de alternativas para disminuir el uso de los antimicrobianos se encuentra el uso de vacunas, terapia con fagos y probióticos (WHO, 2021). Las bacterias lácticas (BL) con propiedades probióticas se han utilizado con el objetivo de controlar a los microorganismos patógenos y mejorar los mecanismos naturales de defensa de humanos y animales. Se ha sugerido que su uso en la produccion animal pueden reducir el riesgo de transferencia de patógenos de los alimentos de origen animal a los humanos, además de ser una alternativa al uso de antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, disminuyendo el desarrollo de resistencia bacteriana (Yang *et al*. 2014).

Las BL son un grupo heterogéneo de microorganismos caracterizados por la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. A lo largo de la historia, se han utilizado principalmente en la producción y conservación de alimentos fermentados (Lahtinen *et al*. 2012) y en 1988, el Código Federal de Regulaciones les denominó microorganismos con *status* GRAS (Generally Regarded as Safe) (Cod. Fed. 1988). La conservación de los alimentos por BL se atribuye a la producción de diversos metabolitos con actividad antimicrobiana, como son los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, reuterina, diacetilo y compuestos de naturaleza proteica como las bacteriocinas, peptidoglycan hydrolases (PGH) o bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) (Siedler *et al*. 2019; Magnusson, 2003) entre otros. En diversos estudios se ha demostrado que las BL y

sus metabolitos son capaces de inhibir microorganismos patógenos, tales como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* entérica y *E. coli*, por lo que representan una línea de investigación muy importante entre distintos grupos, que buscan la caracterización de los fenómenos de antagonismo bacteriano como herramienta contra estos patógenos resistentes para su aplicación en la producción animal, de alimentos inocuos y en la medicina (Gao *et al*. 2019).

Las BL han sido aisladas de una gran variedad de nichos, generalmente plantas y alimentos (De Albuquerque *et al*. 2018), de la microbiota de humanos y animales (Oyewole *et al*. 2018; Sorplang y Piyadeatsoontorn, 2016), así como de suelos (Yanagida *et al*. 2006) y sedimentos marinos (Elayaraja *et al*. 2014). El tracto gastrointestinal de animales comprende la fuente con mayor potencial para la obtención de BL, principalmente del género *Lactobacillus spp*, además de que se ha identificado la importancia de este género en la prevención de la disbiosis intestinal (Morikawa *et al*. 2016).

En cuanto a esta línea de investigación previa, en el Laboratorio 7 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FES Cuautitlán, Ríos y Villanueva (2019) aislaron cepas de *Lactobacillus* de tracto intestinal de ratón de cuatro semanas de edad, las cuales se identificaron por pruebas microbiológicas primarias y bioquímicas, obteniendo como resultado, 18 cepas aisladas Gram positivas con forma de bacilos, catalasa y oxidasa negativas. Se obtuvo su perfil de oxidación/fermentación utilizando cinco carbohidratos (sacarosa, glucosa, lactosa, xilosa y sorbitol), se estableció el perfil de fermentación de carbohidratos con el sistema API 50 CHL y la identificación de los posibles géneros y especies de las cepas de BL aisladas mediante el sistema API web™. Adicionalmente, se verificó la producción negativa de hemolisinas, como criterio de seguridad para cepas con potencial probiótico, según FAO-OMS (2002).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se propuso la identificación y caracterización a nivel molecular y filogenético de las 18 cepas de *Lactobacillus* aisladas de tracto intestinal de ratón, así como su evaluación del potencial probiótico *in vitro* de actividad antagónica frente a *L. monocytogenes, S. aureus, E. coli* y *C. jejuni*, de resistencia a diferentes antibióticos, sobrevivencia a condiciones de tracto gastrointestinal y capacidad de adherencia, con el objetivo de utilizarlas en el control de estos patógenos de interés clínico y zoonótico como alternativa al uso de antibióticos en la producción animal.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Salud y Bienestar (ODS, ONU)

La ONU en 2015, aprobó la Agenda 2030 sobre el "Desarrollo Sostenible", una oportunidad para que los países y sus sociedades emprendan un nuevo camino para mejorar la vida de todos, sin dejar a nadie atrás. La Agenda cuenta con 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), de los cuales destaca el objetivo 3 "Salud y Bienestar" que busca garantizar una vida sana y promover el bienestar de todos. Los aspectos destacables del objetivo 3 incluyen metas dirigidas a luchar contra las enfermedades infecciosas y no infecciosas, además de abarcar la seguridad sanitaria, la salud reproductiva y la cobertura sanitaria universal, indispensables para la construcción de sociedades prósperas (United Nations 2015).

1.2. Una Salud (FAO-OMS-OIE)

El enfoque integral Una Salud (One Health), es reconocido por las organizaciones internacionales, como la necesidad prioritaria de desarrollar estrategias efectivas y novedosas aplicadas en todos los problemas de salud global, con el objetivo de obtener una salud óptima en las personas, los animales y el medio ambiente (Rabozzi *et al*. 2012). En este sentido, las enfermedades zoonóticas, la inocuidad de los alimentos y la resistencia a los antibióticos, son temas interconectados que afectan directamente a humanos y animales. Se estima que más del 60% de las enfermedades infecciosas son zoonóticas (OIE, 2015), las cuales han tenido un impacto importante y creciente en la salud pública, por lo que, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en colaboración de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE), trabajan con el enfoque "One Health" para promover respuestas multisectoriales en la prevención y control de estas enfermedades (WHO, 2012; Bidaisee y Macpherson, 2014).

1.3. Enfermedades zoonóticas

De acuerdo con la OMS, las zoonosis se definen "como cualquier enfermedad causada por bacterias, parásitos, hongos, virus o agentes no convencionales, transmisibles de animales vertebrados a humanos y viceversa" (Rabozzi *et al*. 2012). Su evaluación a menudo es un desafío, ya que estas tienen un gran impacto en la salud humana y de los animales, además de las importantes perdidas económicas en torno a ellas (Grace *et al*. 2012).

El impacto que tienen las zoonosis en la salud humana es evaluado por la carga global de enfermedades (GBD, por sus siglas en inglés), en términos de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD). Con base en esto, se estima que las zoonosis son responsables del

26% del AVAD debido a enfermedades infecciosas en los países en vías de desarrollo (Matilla *et al*. 2018). La carga global de las enfermedades zoonóticas es estimada en dos categorías: 1) zoonosis transmitidas por los alimentos causantes de enfermedades gastrointestinales y 2) zoonosis no transmitidas por los alimentos (Grace *et al*. 2012). De este modo, se estima que las enfermedades zoonóticas transmitidas por alimentos (ETA), son responsables de 72.8 millones de AVAD (4.8%), además de ser estimadas las causas más altas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. De acuerdo con la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, pos sus siglas en ingles), *Campylobacter spp*., es el agente zoonótico causante de enfermedad diarreica notificado con mayor frecuencia, con 120,946 casos, 8,605 hospitalizaciones y 45 muertes, lo cual representa más del 60% de los casos reportados para el 2020 en la Unión Europea, seguida de las infecciones por *Salmonella spp*, y *Yersinia spp*. Por otro lado, *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) ocupó el cuarto lugar con 4,446 reportes, 652 hospitalizaciones y 13 muertes. Mientras que *Listeria monocytogenes* se consideró la enfermedad más severa, con 1,876 reportes, 780 hospitalizaciones y 167 muertes, la cual, además de la alta tasa de fatalidad (30%), en los últimos 4 años se ha observado un incremento en el número de brotes asociados con esta enfermedad (EFSA y ECDC, 2021).

El impacto económico de las zoonosis es estimado por las pérdidas directas (costos de tratamiento) e indirectas (baja productividad). De esta forma, a nivel global, las pérdidas económicas se han estimado en más de 220 mil millones de dólares durante la última década, de los cuales 20 mil millones de dólares correspondieron a perdidas directas y 200 mil millones a pérdidas indirectas (WHO, 2012). Además, del impacto económico de las zoonosis en la salud humana, estas enfermedades al afectar a la salud animal pueden causar importantes pérdidas y limitaciones económicas para las comunidades afectadas que dependen de los animales, los campos de trabajo, el transporte, como fuente de proteína o como fuente de ingreso tras su venta (Grace *et al*. 2012).

1.4. *Campylobacter spp*.

Actualmente, *Campylobacter spp.* es la zoonosis transmitida por los alimentos con mayor número de reportes y es considerada como la causa bacteriana mas frecuente de gastroenteritis en el mundo (WHO, 2018). El género *Campylobacter spp.* pertenece a la

familia *Campylobacteriaceae* y son bacterias gram negativas con forma curva o en espiral que presentan un solo flagelo polar, flagelos bipolares o sin flagelo según la especie (Kaakoush *et al*. 2015), con un tamaño de 0.2 a 0.9 µm de ancho y 0.2 a 5 µm de largo, no formadoras de esporas, microaerofílicos; capaces de crecer en atmósferas con 5% de O_2 y 10% de CO_2. Se han identificado 32 especies y 13 subespecies de este género (Chlebicz y Śliżewska, 2018), muchas de estas son patógenos conocidos en humanos y animales, principalmente *C. jejuni, C. coli, C. lari* y *C. upsaliensis,* estas últimas consideradas termotolerantes, debido a que la mayoría crecen a 42ºC (Hansson *et al*. 2018).

1.4.1. Aspectos clínicos

Entre las principales causas establecidas de diarrea en humanos se encuentran la presencia de *C. jejuni* y *C. coli* como agentes causales, con dosis infecciosas óptimas de $9x10^4$ UFC mL^{-1}, sin embargo, se sabe que una dosis infecciosa de $8x10^2$ UFC mL^{-1}, son suficientes para causar la enfermedad (Chlebicz y Śliżewska, 2018). El tiempo de incubación de la enfermedad es de entre 1 y 7 días después de la ingestión. Los síntomas van desde diarrea acuosa hasta sanguinolenta, fiebre, vómito, dolor abdominal y deshidratación, que duran en promedio de 5 a 7 días (García *et al*. 2018). Las infecciones por *Campylobacter* suelen ser auto limitantes durante una semana, sin embargo, algunos pacientes pueden requerir tratamiento médico y hospitalización. En la terapia antimicrobiana, la eritromicina se considera el fármaco de elección. Anteriormente las fluoroquinolonas (ciprofloxacino y ácido nalidíxico) eran utilizadas como antibióticos, sin embargo, en muchos países los aislamientos de *Campylobacter* son cada vez más resistentes a este grupo de antibióticos (Hansson *et al*. 2018; García *et al*. 2018).

Las complicaciones de la Campilobacteriosis ocurren en el 1% de los casos, una infección aguda puede desencadenar consecuencias a largo plazo, como el Síndrome de Guillain-Barré (SGB), el cual es un trastorno neurológico caracterizado por debilidad de las extremidades, posible participación de los músculos respiratorios, anemia y pérdida sensorial. El Síndrome de Miller Fisher (variante del SGB), el Síndrome del Intestino Irritable (SII), la artritis reactiva y septicemia también están reportadas por su relación con Campilobacteriosis (WHO, 2012; Chlebicz y Śliżewska, 2018).

1.4.2. *Epidemiología*

La Campilobacteriosis tiene una incidencia global. Si bien la infección por *C. jejuni* o *C. coli* puede ocurrir en pacientes de todas las edades, en los países en desarrollo, donde *Campylobacter* es endémico, la infección generalmente se limita a niños con edades de 1 a 4 años, debido a que la enfermedad disminuye con la edad, la exposición temprana a estos agentes etiológicos podría conducir al desarrollo de la inmunidad protectora (Kaakoush *et al.* 2015). En los países desarrollados, los casos informados por diagnóstico de cultivo abarcan distintos grupos de edad (0-4 años), (20-25 años) y (más de 65 años) (Hansson *et al*. 2018). Además, esta enfermedad está asociada con la gastroenteritis del viajero, de acuerdo con un estudio realizado por Lääveri *et al* (2018), el 8% de los casos de Campilobacteriosis están asociados con los viajes internacionales.

1.4.3. Factores de transmisión

En la mayoría de los casos humanos, *Campylobacter* es transmitido por vía fecal-oral, comúnmente después de ingerir carnes contaminadas o poco cocidas, leche no pasteurizada y productos elaborados con ella, agua no tratada o vegetales sin lavar (García *et al*. 2018).

Las aves de corral (pollos, pavos y patos) son identificados como el hospedero natural de las especies de C*ampylobacter*. Los principales sitios de colonización en las aves son el tracto gastrointestinal, por lo que *Campylobacter* suele encontrarse en abundancia en las granjas avícolas y en el entorno que las rodea incluyendo suelos, fuentes de agua, el polvo, superficies de construcción y el aire, lo cual resulta en la transmisión horizontal hacia las aves, otros animales y el humano. Además de que puede promoverse una contaminación cruzada durante el sacrificio de las aves, así como durante su manejo, comercialización y procesamiento (Hansson *et al.* 2018). De acuerdo con algunos reportes, la prevalencia de carne de pollo contaminada con *Campylobacter spp*. comercialmente disponible, oscilan entre el 53% y 80% para los países europeos, 71% para EE. UU y 90% en Australia (Walker *et al*. 2019).

Otras fuentes comunes de infección son por contacto directo con personas infectadas o animales como las mascotas (especialmente perros y gatos), los animales silvestres y animales de granja que sirven como vectores de la infección (Goni *et al*. 2017).

1.5. *Escherichia coli*

E. coli pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo que forma parte de la microbiota de humanos y animales. Entre estas, las cepas de *E. coli* diarreogénicas son un grupo heterogéneo de patógenos intestinales, con diversas características en cuanto a estructura antigénica y factores de virulencia. Los antígenos O (lipopolisacárido) y H (flagelar) son utilizados para la clasificación serológica de las cepas patógenas, sin embargo, debido a la diversidad de estos antígenos (187 antígenos O, 53 antígenos H), la serotipificación es considerada una herramienta diagnóstica poco confiable, debido a la reactividad cruzada entre diferentes serogrupos (Mare *et al*. 2021). Los protocolos diagnósticos recientes recomiendan la identificación de *E. coli* diarreogénica por métodos moleculares, identificando los factores de virulencia de estas cepas, las cuales se clasifican en 6 variantes patógenas principales y uno híbrido **(Cuadro 1)**.

Cuadro 1. Variantes patógenas de *E. coli* diarreogénica

Variante patogénica	Acrónimo	Factores de virulencia	Genes para diagnóstico por PCR	Enfermedad	Síntomas clínicos
E. coli enteropatógena	EPEC	*Locus* de borramiento de enterocitos (LEE), intimina, Bfp	*eae, bfp*A	Diarrea aguda/persistente en niños	Diarrea acuosa, vómito
E. coli enterohemorrágica (productora de toxina Shiga)	STEC	Toxina Shiga 1 y/o 2, LEE, adhesinas (EHEC)	*stx1, stx2, eae, ehxA, bfp*	Síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica	Diarrea con sangre
E. coli enteroinvasiva	EIEC	Toxina Shiga, hemolisinas, invasión celular, Ipa	*ipa*H, *ipa*	Sindrome similar a la Shigelosis	Diarrea acuosa y con sangre
E. coli adherente invasiva	AIEC	Fimbrias Tipo 1, invasión celular	no	Asociado con Enfermedad de Crohn	Inflamación intestinal persistente
E. coli enterotoxigénica	ETEC	Toxinas termolábiles y termoestables, factores de colonización (CFAs)	*elt, est*	Diarrea del viajero	Diarrea acuosa, vómito
E. coli adherente difusa	DAEC	Adhesinas	adhesinas *Afa*/Dr	Diarrea en niños	Diarrea acuosa

E. coli enteroagregativa	EAEC	Adhesinas, toxinas y secreción de proteínas	*pAA, AggR, AAFs*	Diarrea en niños	Diarrea y vómito (con moco)

(Mare *et al*. 2021)

1.5.1. *E. coli* EPEC

Las cepas de EPEC se definen con base en sus factores de virulencia, como cepas diarreogénicas de *E. coli* que producen lesiones histopatológicas de tipo A/E (adherencia/destrucción) en las células intestinales y que son incapaces de producir toxina Shiga. Las cepas de EPEC se consideran 'típicas', las cuales presentan el plásmido de virulencia *EAF* (*E. coli*-adherence-factor) que codifica para el Bfp (bundle-forming pilus), mientras que las cepas EPEC 'atípicas' no poseen dicho plásmido (Varela *et al*. 2007).

1.5.2. Patogénesis

Las lesiones del tipo A/E son lesiones localizadas causadas por la interacción entre EPEC y las células del huésped. Los determinantes genéticos para producir esta lesión se encuentran en el *locus* LEE (*locus* de enterocyte effacement) que contiene los genes *eae* que codifican para la síntesis de intimina, los genes *esp* (*E. coli* secreted proteins), el gen *Tir* (translocated intimin receptor) y los genes para la síntesis del sistema de secreción tipo III. La lesión A/E se describe como un proceso de cuatro etapas (**Figura 1**). En la primera etapa de infección, las cepas de EPEC producen Bfp, un pili de adherencia tipo IV y filamentos de superficie EspA, utilizados en la segunda etapa para la adherencia al epitelio intestinal formando micro colonias densas en la superficie de la célula. El sistema de secreción de tipo III (T3SS) crea un poro, lo que permite que la bacteria inyecte Tir y una gran cantidad de moléculas efectoras (desde 25, hasta 50 proteínas) en la célula huésped. Estos efectores activan las vías de señalización de la célula huésped, provocando la alteración del citoesqueleto, lo que lleva a la pérdida de las microvellosidades. Después de que la proteína tirosina cinasa y la proteína cinasa A modifican Tir, esta última se inserta en la membrana de la célula huésped. En la tercera etapa, las células bacterianas pierden los filamentos de EspA de su superficie. La intimina bacteriana se une a la Tir modificada, provocando la unión íntima de la bacteria a la célula huésped y la destrucción de las microvellosidades de los enterocitos. En esta fase, la actina y los elementos del citoesqueleto se acumulan cerca del sitio de adherencia bacteriana. Un sistema de autotransporte T5SS (sistema de secreción tipo V), media la secreción de

EspC, una proteína involucrada en la citotoxicidad de las células epiteliales, en la replicación bacteriana y la formación de biopelículas. En la cuarta etapa, los elementos del citoesqueleto acumulados cerca del sitio de unión, conducen a la formación de la estructura de pedestal, la cual es una característica de EPEC. Finalmente, las moléculas efectoras (translocadas de las bacterias) interrumpen los procesos celulares y conducen a la muerte celular (Mare *et al*. 2021).

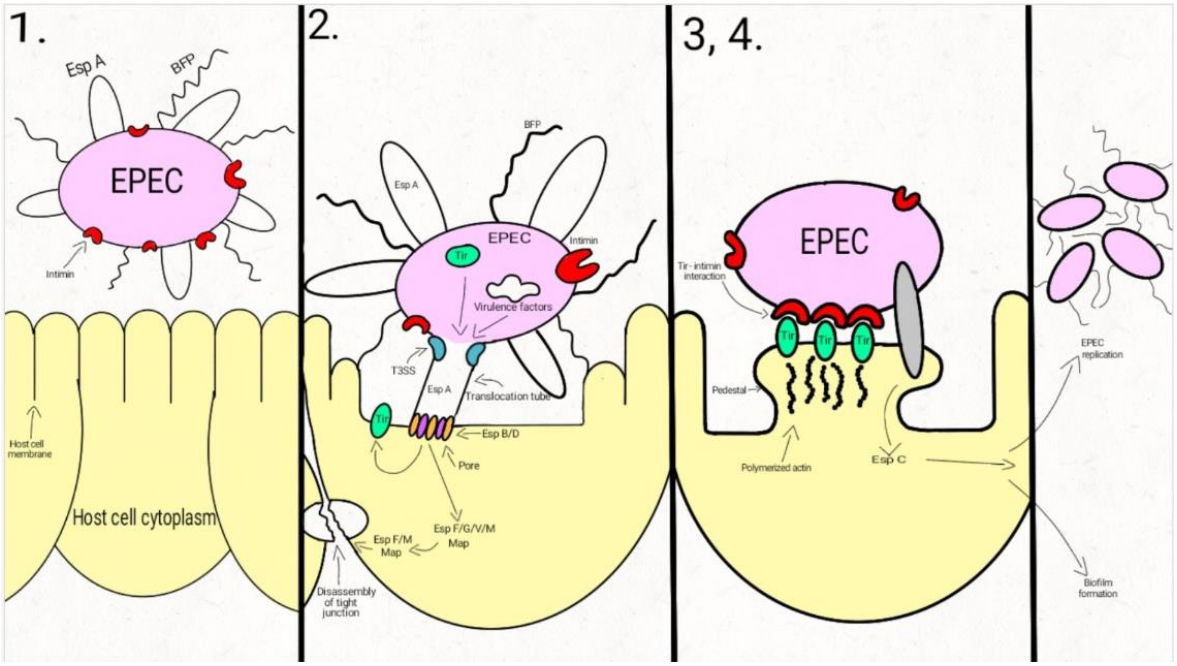


Figura 1. Etapas del proceso de la lesión tipo A/E (adherencia/destrucción) causadas por *E. coli* EPEC en las células intestinales (Mare *et al*. 2021).

1.5.3. Aspectos clínicos

EPEC causa diarrea acuosa aguda o persistente asociada con fiebre, vómitos, deshidratación, que pueden causar la muerte en pocos días, especialmente en niños menores de dos años, por lo cual suele ser necesaria la hospitalización. En las infecciones agudas por EPEC, los síntomas aparecen unas horas después de la ingestión de bacterias, por otro lado, en los casos persistentes se informa que la diarrea puede durar más de dos semanas con complicaciones como la deshidratación y desnutrición (Varela *et al*. 2007).

1.5.4. Epidemiología

Las cepas de EPEC son responsables de numerosos casos esporádicos de diarrea acuosa infantil, así como brotes con importantes tasas de morbilidad en América Latina, África y Asia, además de altas tasas de mortalidad en las comunidades más pobres de África y el Sudeste Asiático (Gómez, 2014). Además, este patógeno es considerado como uno de los principales responsables de la gastroenteritis del viajero, de acuerdo con un estudio reciente, Lääveri *et al*. (2018) identificaron mediante técnicas moleculares la presencia de *E. coli* EPEC en adultos, en el 55% de los reportes de los viajes internacionales (Shamloo *et al*. 2019).

1.5.5. Factores de transmisión

La transmisión de EPEC es por vía fecal-oral, fluidos contaminados, superficies y una fuente importante de infección son los portadores asintomáticos. Para las cepas típicas de EPEC, los humanos (sintomáticos/asintomáticos) son el principal reservorio conocido, mientras que las cepas atípicas se aíslan con frecuencia de animales (Mare *et al*. 2021).

1.6. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes perteneciente a la familia *Listeriaceae.* Es una bacteria Gram positiva, intracelular, microaerófilica, psicotrófica, no formadora de esporas, catalasa positiva, con forma de bastón. Es considerado un patógeno emergente transmitido por los alimentos (ETA), responsable de enfermedades graves en humanos y animales (Beier *et al*. 2019).

1.6.1. Aspectos clínicos

La Listeriosis puede presentarse en dos tipos de enfermedad (no invasiva e invasiva). La forma no invasiva es una forma leve de la enfermedad causante de gastroenteritis, cuya manifestación clínica más común es la diarrea, fiebre leve, náuseas y vómitos. La Listeriosis invasiva es una forma más grave de la enfermedad con altas tasas de mortalidad entre 20 y 30%. Los síntomas incluyen fiebre, mialgia, aborto o parto inmaduro en el embarazo, septicemia y meningitis (WHO, 2018). Actualmente, la terapia de elección para la Listeriosis humana es una combinación de ampicilina o amoxicilina con gentamicina. Sin embargo, se han demostrado altos niveles de resistencia de *L. monocytogenes* a diferentes antibióticos en

los aislamientos cínicos. Por ejemplo, Abdollahzadeh *et al*. (2016), demostraron porcentajes de resistencia del 100% para la ampicilina y cefotaxima, mientras que, para el caso de la penicilina, la tasa de resistencia fue del 71,4 %, concluyendo que la resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados para tratar la Listeriosis aumenta el peligro potencial de la salud de los individuos.

1.6.2. Epidemiología

L. monocytogenes es un patógeno oportunista que causa graves problemas de salud presentados de forma esporádica o en epidemia. Los brotes de Listeriosis son detectados principalmente en los países industrializados, posiblemente debido a las costumbres alimentarias y medios de conservación de los alimentos (Reda *et al*. 2016). Este patógeno afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos, como aquellos con cáncer, leucemia o pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), además de adultos mayores de 65 años, mujeres embarazadas y niños. Se ha observado que la infección muestra una tendencia estacional, con picos de mortalidad entre julio y octubre (Shamloo *et al*. 2019).

1.6.3. Factores de transmisión

L. monocytogenes se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, como el agua, suelos, la vegetación, así como en humanos y animales, los cuales pueden contaminar los productos alimenticios. A diferencia de otros patógenos causantes de ETA, *L. monocytogenes* tiene la capacidad de adaptarse y sobrevivir a temperaturas de refrigeración, congelación, incluso sobrevivir a varios ciclos de congelación-descongelación en los alimentos. La enfermedad se transmite principalmente a través del consumo de alimentos como la leche y otros productos lácteos, así como carne, aves y productos listos para su consumo (ready to eat, RTE). Este patógeno puede sobrevivir en las superficies y equipos utilizados en las áreas de procesamiento de la industria alimentaria, causando importantes pérdidas económicas (Bolocan *et al*. 2017).

1.7. *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un coco Gram positivo que se agrupa en forma de racimos, no móvil, no forma esporas, es *β*-hemolítico, catalasa y coagulasa positivo. Se encuentra de forma ubicua en el medio ambiente y como parte de la microbiota de los seres humanos, principalmente en la piel y en la mucosa del tracto respiratorio superior (Guo *et al.* 2020). Aproximadamente el 30% de la población humana es portadora de esta bacteria de forma asintomática, sin embargo, *S. aureus* puede causar enfermedad en piel y tejidos blandos cuando se rompen las barreras epiteliales (Sakr *et al*. 2018). Es considerado uno de los principales patógenos en las infecciones hospitalarias y aislado con mayor frecuencia en casos de intoxicación alimentaria con gran importancia en las ETA (Matuszewska *et al*. 2020).

1.7.1. Enfermedad

Este patógeno puede causar una amplia variedad de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas moderadamente graves, hasta infecciones del tracto respiratorio, sitio quirúrgico, prótesis articular, infecciones cardiovasculares, neumonía, así como bacteriemia nosocomial. Una forma importante en la que *S. aureus* mantiene la infección es mediante la formación de biopelículas. Estas pueden formarse en el material abiótico como los dispositivos médicos, pero también en las superficies de los tejidos, como en las válvulas cardíacas en el caso de la endocarditis.

La intoxicación alimentaria es un caso especial de infección aguda por *S. aureus*, en la que se ingieren alimentos contaminados que contienen enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C_1, C_2, C_3, D, E, G, H e I). La producción de estas toxinas depende principalmente de la naturaleza del alimento y del proceso a los cuales fue sometido (crudo, cocido, fermentado, etc.).

Las infecciones por *S. aureus* son un problema difícil en el tratamiento clínico, debido a que es considerado un patógeno multi-resistente, entre los cuales, S. *aureus* MRSA es el mas importante clínicamente (Cheung *et al*. 2021). Los aislados de *S. aureus* pueden mostrar alta resistencia a las penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol, lincomicina, aminoglucosidos, tetraciclinas, macrólidos, quinoftalonas, sulfonamidas y rifampicina. Por lo que actualmente, los medicamentos utilizados como elección en las infecciones graves son la vancomicina, daptomicina y linezolida (Guo *et al.* 2020).

1.7.2. Epidemiología

De acuerdo con los reportes en pacientes de hospitales en México, la prevalencia de SARM para el 2018 fue del 26%, similar al 28% reportado en un estudio previo en el año 2013. En cuanto al género se ha observado que los pacientes del sexo masculino tienen una probabilidad cuatro veces mayor (70.5%) de presentar infecciones por SARM (Martínez *et al*. 2020).

De acuerdo con la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica de México, la mortalidad de pacientes infectados con *S. aureus* varía del 5 al 70%, la información proveniente de los hospitales generales indicó que este patógeno ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto en mortalidad durante el periodo de 1997 a 2003 (García *et al*. 2019). Recientemente, un informe mostró un incremento de casi 4%, cada año entre el 2012 y el 2017 en las infecciones por *S. aureus*, las cuales han sido adquiridas fuera de los entornos hospitalarios en los E.U. (CDC, 2019).

1.7.3. Factores de transmisión

Las infecciones por *S. aureus* generalmente se originan a partir de una colonización asintomática, particularmente en el ámbito hospitalario, a partir de fómites infectados o transferencia de otros individuos. Las narinas se consideran como el principal sitio de colonización, aunque *S. aureus* puede colonizar muchos sitios de la piel además del intestino (García *et al.* 2019).

S. aureus puede adquirirse de animales, especialmente en la industria ganadera. La mastitis es una infección asociada a la producción de biopelículas mediadas por *S. aureus*, la cual representa un problema importante de transmisión en la industria de la leche y la carne (Cheung *et al*. 2021).

1.8. Probióticos

El grupo de trabajo FAO-OMS (2002), define a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, ejercen un efecto benéfico sobre la salud del huésped” (Guarner y Schaafsma, 1998).

Elías Metchnikoff (1907) identificado como el padre de las bacterias lácticas, en su libro "La prolongación de la vida" recomendó el consumo de leche fermentada con cultivos de *Lactobacillus bulgaricus* capaces de vivir, crecer y producir efectos favorables en el tracto digestivo. Metchnikoff fue el primer investigador en desarrollar un producto terapéutico utilizando *Lactobacillus* en forma de cápsula para su administración vía enteral.

Debido a que las cepas probióticas han estado en contacto cercano con humanos durante siglos y tienen una larga historia de consumo seguro en alimentos fermentados sin efectos adversos aparentes, ha aumentado un considerable interés en su uso como aditivos alimentarios (Lahtinen, 2012; Davis, 2014).

Actualmente, los probióticos son considerados como ejemplo de "Eubiótico", cuyo término derivado de la palabra griega "eubiosis", se refiere al equilibrio de la microbiota intestinal, por lo tanto, es utilizado como un término general que cubren los enfoques que apuntan a una microbiota intestinal saludable. Además de los probióticos, otros aditivos alimentarios como los aceites esenciales, ácidos orgánicos, enzimas exógenas, hierbas y los prebióticos son ejemplos de Eubióticos (Pattanaik *et al*. 2022).

Debido a la prohibición de los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, los eubióticos, especificamente los probióticos están ganando popularidad en su consumo. Tanto la investigación científica como el mercado de los probióticos ha crecido sustancialmente, con ventas estimadas en 2018 en US$ 49.4 billones, con un alcance proyectado en US$ 69.3 billones para 2023 (Research y Markets, 2019). Dado que la tasa de descubrimiento de nuevos microorganismos con beneficios terapéuticos está progresando rápidamente, debe haber un estricto cumplimiento de los requisitos en su evaluación para determinar su validez como probiótico (Reid *et al*. 2019).

Los probióticos son capaces de ejercer una gran variedad de efectos benéficos en el huésped ya sea humano o animal, los cuales incluyen el control sobre patógenos, efectos inmunológicos como el mantenimiento de la barrera intestinal y actividad inmunomoduladora, además de proveer efectos nutricionales. A continuación se describe cómo es que actúan estos microorganismos probióticos sobre el huésped.

1.8.1. Control de patógenos

Exclusión competitiva. Las bacterias probióticas pueden contribuir a la función de la barrera intestinal evitando que se establezcan microorganismos patógenos al competir por los sustratos disponibles en la luz intestinal, así como los sitios de unión de las células epiteliales, por lo que las bacterias patógenas no disponen de un medio propicio para su desarrollo (Min Tze, 2011).

Se ha demostrado que algunas cepas de *Lactobacillus* son capaces de competir con bacterias patógenas incluyendo *S. entérica*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* STEC y *E. coli* EPEC, para los sitios de unión de células epiteliales. Uno de los mecanismos estudiados, por los cuales, las cepas probióticas inhiben la adherencia de patógenos bacterianos y virales a las células intestinales, es la competencia por los sitios de unión, por ejemplo, la proteina de la capa superficial (Capa S) de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, cuyo papel crucial es ayudar a la adherencia de las bacterias a las células del huésped, mediante su unión a receptores moleculares glico-conjugados ubicados en la superficie de las celulas epiteliales en el tracto gastrointestinal (Fina *et al*. 2019).

Efecto bactericida o bacteriostático. Las bacterias probióticas, especialmente las BL, son capaces de producir metabolitos primarios y secundarios con actividad antimicrobiana (**Figura 2**), los cuales incluyen principalmente la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, reuterina, diacetilo, péptidos cíclicos y compuestos de naturaleza protéica (Lahtinen, 2012; Siedler *et al*. 2019).

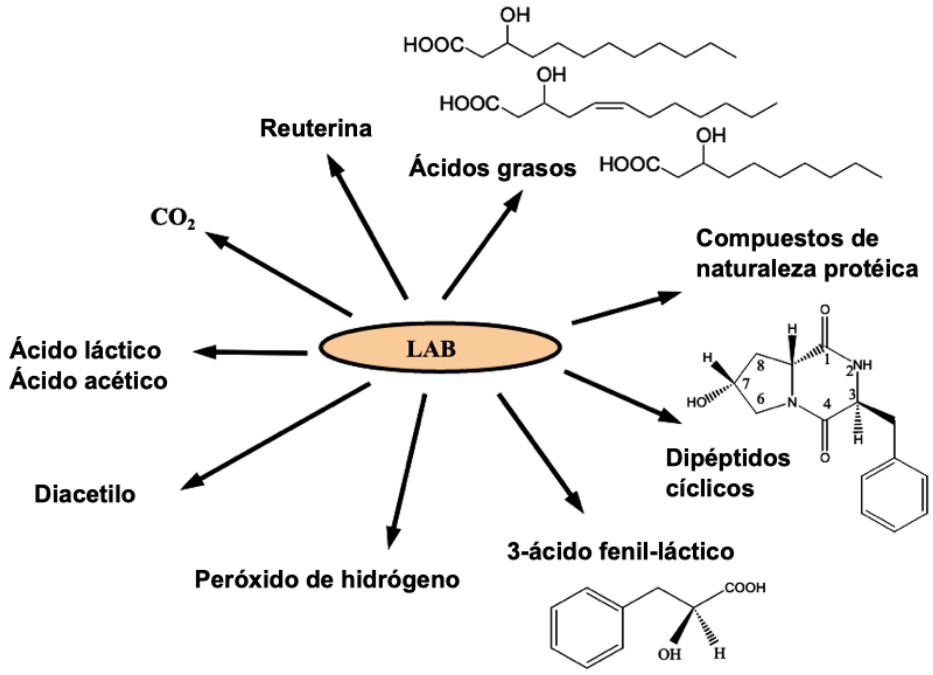


Figura 2. Metabolitos con actividad antimicrobiana producidos por bacterias lácticas **(**Magnusson, 2003)

Ácidos orgánicos. La producción de ácidos orgánicos (ácido láctico, acético y propiónico), es el principal mecanismo antagónico microbiano de las BL, como resultado de la fermentación de los carbohidratos disponibles en los alimentos. Cuando éstos se producen, el pH del medio disminuye y en consecuencia, los ácidos orgánicos no disociados con naturaleza lipofílica atraviesan las membranas bacterianas, causando acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas (Magnusson, 2003). En general, los ácidos orgánicos tienen una fuerte actividad inhibitoria contra las bacterias gram negativas (Musikasang *et al.* 2009), levaduras, hongos y bacterias gram positivas (Guimarães, 2018; Siedler *et al*. 2019).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La mayoría de las cepas probióticas poseen la enzima NADH peroxidasa, que permite producir H_2O_2 en presencia de oxígeno y debido a que estas cepas no producen la enzima catalasa para disociarlo, este se acumula en el medio (Magnusson, 2003). Su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilos causando la desnaturalización de enzimas y la peroxidación de membranas, aumentando su permeabilidad. Además, el H_2O_2 puede ser el precursor para la producción

de radicales libres como el superóxido (O_2^-) e hidróxido (OH^-), los cuales dañan el DNA (Parra, 2010), cuyo efecto antimicrobiano abarca a bacterias gram positivas, negativas y levaduras (Siedler *et al*. 2019).

Reuterina. Se produce en condiciones anaerobias por algunas especies de *Lactobacillus*, originalmente de *L. reuteri*. La reuterina se forma durante la utilización del glicerol e inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en la síntesis del DNA. Este componente antimicrobiano es activo contra bacterias Gram positivas y negativas, así como levaduras, hongos y protozoos (Magnusson, 2003; Mu *et al.* 2018).

Diacetilo. Es un metabolito volátil común en los productos lácteos, encargado de proporcionar el aroma a la mantequilla. Es producido principalmente por *Lactococcus*, *Lactobacillus* y levaduras como producto intermediario de la descarboxilación reductora del exceso de piruvato, obtenido del metabolismo de azúcares o del citrato (Mukisa *et al*. 2016). Se ha demostrado que el diacetilo a concentraciones de 100 y 200 μg/mL tiene actividad contra mohos y levaduras (Aunsbjerg *et al*. 2015), además tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas (Siedler *et al*. 2019).

Compuestos antifúngicos. Las cepas de *L. coryniformis*, *L. plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*, tienen la capacidad de producir metabolitos como dipéptidos cíclicos (ciclo-PhePro y cicloPheOHPro) y ácidos grasos (3-hidroxidecanoico, 3-hidroxi-5-dodecenoico y 3-hidroxi-tetradecanoico), con actividad antifúngica contra *Aspergillus, Penicillium commune, Fusarium sporotrichioides* y *Rhodotorula musilaginosa* (Magnusson, 2003). Además, algunas especies de *Lactobacillus* como *L. crispatus* son capaces de producir ácido fenil-láctico capaz de inhibir a especies fúngicas como *Candida albicans* (Abdul *et al*. 2021).

Bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos bioactivos sintetizados por los ribosomas con efecto bactericida o bacteriostático sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Field, 2018). Las bacteriocinas tienen diferentes mecanismos de acción **(Figura 3)**. Estos pueden dividirse en aquellos que actúan sobre la membrana citoplasmática inhibiendo la síntesis del

peptigloglicano o formando poros y aquellos mecanismos que están activos dentro de la célula, afectando la expresión génica y el metabolismo de las proteínas (Cotter *et al*. 2013).

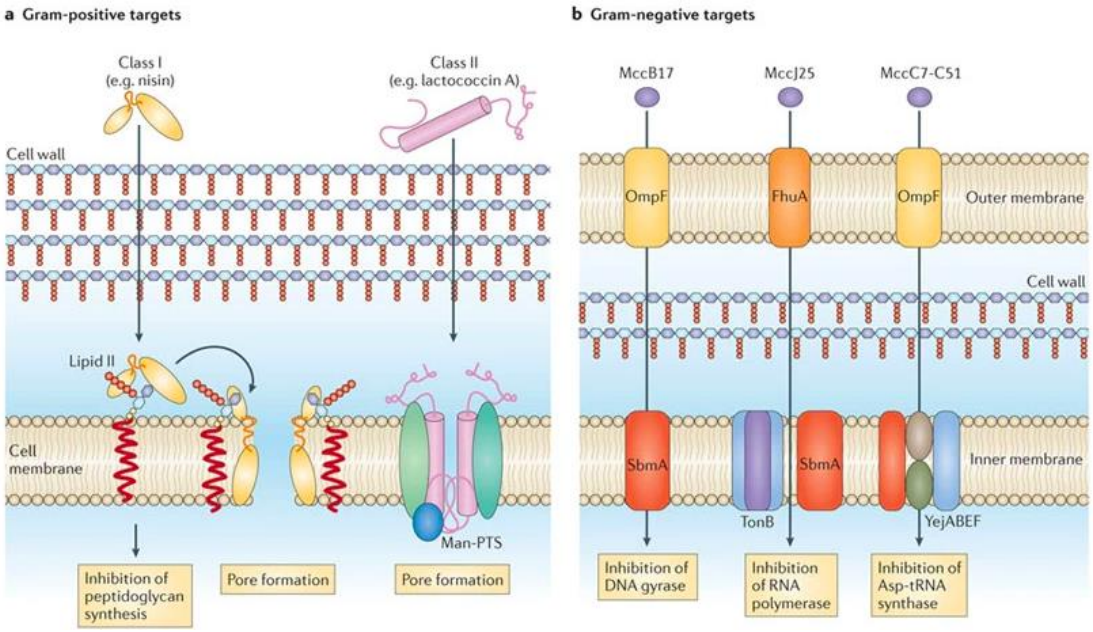


Figura 3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Cotter *et al.* 2013)

Las bacteriocinas son clasificadas de acuerdo con sus características bioquímicas y genéticas. Según Cotter *et al*. (2005), estas comprenden cuatro grupos descritos a continuación (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Clasificación de Bacteriocinas

Clase	Características	Subcategorías	Ejemplo	Microorganismos susceptibles
Clase I Lantibióticos	Péptidos (<5 kDa) termolábiles tienen aminoácidos modificados (lantionina, B-lantioninato)	- Subclase Ia (moléculas lineales)	- Nisina	- *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium spp*.
		- Subclase Ib (moléculas globulares)	- Mersacidina	- *S. aureus* (Kumariya *et al.* 2019)
Clase II No lantibióticos	Péptidos (<10 kDa) lineales	- Subclase II a (pediocina-antilisteria)	- Pediocina, enterocina	- *L. monocytogenes*
		- Subclase II b	- Plantaricina 35d	

	no modificados, termoestables actúan a nivel de membrana	(compuestos de dos péptidos) - Subclase II c (otras bacteriocinas)	- Divergicina A	- *S. aureus, L. monocytogenes, Aeromonas hydrophila* - *L. monocytogenes* (Messi *et al.* 2001)
Clase III	Péptidos grandes (30>kDa) termolábiles	- Subclase III a (Bacteriolíticas)	- Helveticina M, Helveticina J	- *S. aureus, S. saprophyticus, Enterobacter cloacae* (Sun *et al.* 2018)
Clase IV	Péptidos cíclicos que requieren fracciones de lípidos y carbohidratos para su actividad		- Reutericina 6	- *Lactobacillus acidophilus, L. delbrueckii*

Peptidoglicano Hidrolasas (PGH). Las enzimas con actividad de PGH son producidas por todos los grupos de organismos vivos y también por virus. En los humanos, animales y vegetales, estas enzimas juegan un papel importante en el control de infecciones bacterianas como parte de la inmunidad innata (Szweda *et al.* 2012). En el caso de las bacterias, las PGH están encargadas de hidrolizar los enlaces del peptidoglicano (PG), el cual es el principal componente de la pared celular en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Layec *et al*. 2008). El PG está formado por cadenas de residuos alternados de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y acido N-acetilmurámico (MurNAc), unidos por enlaces B-1,4 y entrecruzados por péptidos formados por L- y D-aminoácidos. Estas se clasifican de acuerdo con el tipo de enlace que son capaces de romper en el peptidoglicano en: **N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas** que rompen el enlace amida entre MurNAc y la L-alanina del péptido, las **peptidasas** que hidrolizan el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos (carboxipeptidasas), o rompen los puentes formados por los péptidos (endopeptidasas), las **N-acetilglucosaminidasas** y **N-acetilmuraminidasas** que hidrolizan los enlaces b-1,4 de la cadena, dejando libre el extremo GlcNAc ó MurNAc reductor respectivamente (**Figura 4**).

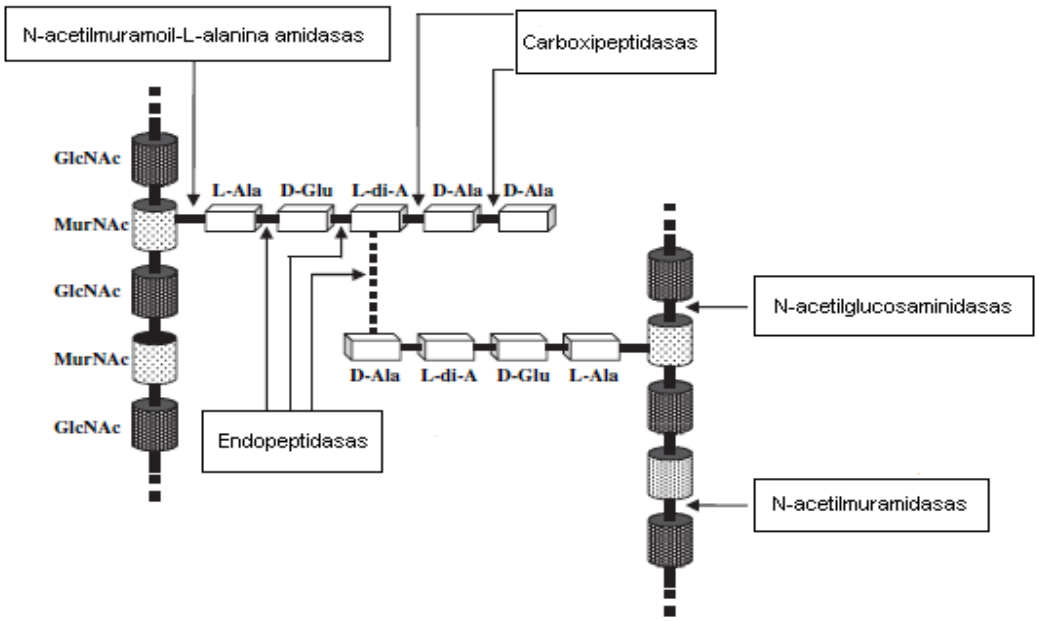


Figura 4. Estructura del peptidoglicano y especificidad por sustrato de las Peptidoglicano Hidrolasas (Layec *et al*. 2008)

Las PGH están involucradas en funciones como la regulación del crecimiento de la pared celular, la separación de las células hijas durante la división y en la autolisis (Layec *et al*. 2008). Sin embargo, debido al tipo de hidrólisis que presentan, se ha reportado que las PGH producidas por diferentes BAL presentan actividad bacteriolítica sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, con potencial de uso como agentes antibacterianos (Sharma *et al*. 2016). Por ejemplo, la lisostafina es una de las PGH de tipo peptidasa más estudiada, producida por *Staphylococcus simulans*. En su forma activa, la lisostafina corta el enlace peptídico entre los residuos de glicina tercero y cuarto del entrecruzamiento de pentaglicina en el PG de *Staphylococcus aureus*. La lisostafina ha demostrado ser eficaz en modelos animales para el tratamiento de la mastitis bovina, colonización nasal en ratones y en infecciones causada por *Staphylococcus spp.* (Jayakumar *et al*. 2020).

Sustancias inhibitorias similares a bacteriocinas (BLIS). BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances, por sus siglas en inglés) es un término aplicado a las sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica de bajo peso molecular, cuyo mecanismo de acción no está completamente definido o que no cumple con alguno de los criterios de la definición

de bacteriocinas. Las BLIS suelen tener un espectro de acción más amplio que las bacteriocinas, ya que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y/o levaduras (Olvera *et al*. 2015). Por ejemplo, Esmail *et al*. (2014), identificaron y caracterizaron dos sustancias BLIS producidas por las cepas probióticas de *L. brevis* LB32 y *L. pentosus* LP05, con masa molecular aparente de 4.5 y 6 kDa en su análisis de SDS-PAGE, las cuales demostraron actividad antagónica por ensayos de difusión en agar frente a *L. monocytogenes, S. enteritidis, Shigella dysenteriae, S. aureus* y *S. pneumoniae.* En otro estudio, Piazentin *et al*. (2022) evaluaron la producción de BLIS de *Enterococcus faecium* 135, la cual demostró susceptibilidad al ser incubada en tripsina y a altas temperaturas, con actividad inhibitoria hasta los 90ºC frente a *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Salmonella enterica* y *S. enterica* serovar Typhimurium mediante ensayos de difusión en agar.

1.8.2. Mantenimiento de la barrera epitelial

Uno de los efectos benéficos de las cepas probióticas es el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal. Esta barrera es un mecanismo de defensa que permite mantener la integridad del epitelio mediante la producción de mucina, péptidos antimicrobianos como las defensinas y la presencia del complejo de adhesión de las uniones epiteliales, protegiendo así al organismo frente a la acción de agresiones externas. Numerosos estudios reportan que algunas cepas probióticas mejoran estos mecanismos, por ejemplo, Ciro *et al.* (2015), evaluaron el efecto de la adición de la cepa probiótica *Enterococcus faecium* sobre la producción de mucinas en lechones recién destetados, obteniendo en el grupo control una producción de mucinas en el día uno (185.4 μm) y en el día 30 (202.7 μm), mientras que en el grupo al cual se adicionaron probióticos se obtuvo en el día uno (186.7 μm) y un aumento altamente significativo ($P<0.01$) al día 30 con (242.7 μm), concluyendo que la adición de *E. faecium* en la dieta promueve la secreción de mucinas que puede verse reflejado en la salud intestinal de los animales y en la mejora de la productividad. En otro estudio, Ohland (2010) estudiaron el efecto de la cepa *L. rhamnosus* HN001 en la alimentación de ratas, obteniendo un incremento de ß-defensinas en colon, las cuales están englobadas en la inmunidad innata en todas las especies, con actividad antimicrobiana contra una amplia variedad de bacterias, hongos y virus.

1.8.3. Actividad inmunomoduladora

La evidencia sugiere que las bacterias probióticas en el lumen intestinal son reconocidas para su procesamiento por el sistema inmune a través de varias rutas. La adhesión de estos microorganismos a las células epiteliales a través de receptores TLR-2 induce la liberación de IL-6 de las células epiteliales intestinales. Los probióticos también pueden ser reconocidos e internalizados por las células dendríticas y células M de los linfonódulos agregados a través de receptores TLR-2 y/o TLR-4, incrementando el número de citocinas anti y proinflamatorias, así como los niveles de anticuerpos IgA (Granier *et al*. 2013). Por ejemplo, Moreno *et al*. (2013) evaluaron la capacidad inmunomoduladora de la cepa *L. paracasei* y *L. rhamnosus* en ratones, encontrando incrementos significativos en las concentraciones de IFN-γ e IL-10 en los fluidos intestinales, cuyas observaciones sugieren que la administración de estas cepas probióticas, al inducir la producción de IFN-γ, mejora la capacidad fagocítica de los macrófagos y la eficiente actividad por parte de las células NK (Natural Killer), las cuales ayudan a prevenir el desarrollo de enfermedades infecciosas y neoplásicas. En otro estudio, Baldasarre *et al.* (2016) evaluaron el efecto de un producto probiótico (*L. paracasei* DSM 24733, *L. plantarum* DSM 24730, *L. acidophilus* DSM 24735 y *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 24734, *Bifidobacterium longum* DSM 24736, *B. breve* DSM 24732 y *B. infantis* DSM 24737) administrado a 66 mujeres lactantes durante 30 días, tras evaluar el perfil de citocinas y niveles de IgA, se obtuvo como resultado un incremento significativo en los valores medios de las citocinas IL-6 en calostro y en los valores medios de IL-10 y TGF-β1 (Transforming Growth Factor-β, por sus siglas en inglés) en leche materna. Además, se observó que los valores de IgA fecal fueron mas altos en los recien nacidos cuyas madres tomaron el producto probiótico (1.35 log mg/dl), comparados con el grupo control (0.9 log mg/dl).

1.8.4. Efectos nutricionales

Los probióticos tienen la capacidad de intervenir en la digestión de algunos componentes de la dieta, mejorando su disponibilidad en la luz intestinal y asimilación en el hospedero, creando así, un efecto simbiótico entre ambos. Gracias al aporte enzimático, las cepas probióticas contribuyen a mejorar la digestión de las proteínas transformándolas en polipéptidos y aminoácidos. Por otra parte, los azúcares de la dieta no absorbidos, son

fermentados por la microbiota intestinal, obteniendo como productos ácidos volátiles (acetato, propionato y butirato), los cuales son una fuente de energía para los enterocitos (Quigley, 2010).

También las grasas sufren una transformación por la enzima lipasa de los probióticos, que las hidrolisan en ácidos grasos y glicerol. Por ejemplo, Yang *et al*. (2021) evaluaron los efectos probióticos de *L. fermentum* ZJUIDS06 y *L. plantarum* ZY08 en hámsteres dorados hiperlipidémicos durante 8 semanas. Los resultados mostraron que la suplementación con *L. fermentum* ZJUIDS06, disminuyó los niveles séricos de lipoproteínas de baja densidad, colesterol total y triglicéridos.

El efecto sobre nutrimentos también ocurre sobre las vitaminas, se ha demostrado que ciertas cepas probióticas tienen la capacidad de sintetizar vitaminas del grupo B como riboflavina, folatos, tiamina y cobalamina, cuya actividad es útil para la función fisiológica del aparato gastrointestinal (LeBlanc *et al*. 2020).

1.9. Uso de probióticos en la producción animal

Las cepas probióticas son utilizadas en las producciones pecuarias debido a la gran cantidad de beneficios a la salud, especialmente en el contexto de una producción animal ecológica y libre de antibióticos. Diferentes autores han evaluado cepas con potencial probiótico en la nutrición animal, con el objetivo de mejorar el equilibrio de la microbiota intestinal, eliminar los patógenos intestinales perjudiciales, mejorar el funcionamiento e inmunidad del tracto gastrointestinal y en consecuencia, mejor salud de los animales (**Cuadro 3**). Además, se ha demostrado que el uso de cepas probióticas en la producción animal reduce la incidencia de enfermedades intestinales y la eliminación fecal de patógenos, reduciendo el riesgo de transferencia de patógenos de los alimentos de origen animal destinados al consumo humano (Mahesh *et al*. 2021).

Cuadro 3. Cepas con potencial probiótico estudiadas en la producción animal

BL	Aplicación	Modo de acción	Referencia
Limosilactobacillus reuteri KUB-AC5	Pollos	-modificación del microbioma cecal	Nakphaichit *et al.* (2011)
L. reuteri LB1-7	Terneros	-Actividad antimicrobiana frente a *E. coli* O157:H7	Bertin *et al.* (2017)
L. acidophilus *Lacticaseibacillus casei* *E. faecium* *Bifidobacterium bifidium*	Pollos	-Estimulación de la inmunidad adaptativa -Modificación del microbioma cecal -Producción de metabolitos (ácidos orgánicos y bacteriocinas)	Talebi *et al*. (2008)
Lactobacillus *Bifidobacterium* *Enterococcus* *Pediococcus*	Pollos, Cerdos	-Producción de bacteriocinas -Modificación del microbioma	Mountzouris *et al*. (2007) Getachew (2016)
Lactiplantibacillus plantarum ZLP001	Cerdos	-activación de la inmunidad innata (modulación de péptidos intestinales con actividad antibacteriana)	Wang *et al*. (2019)

1.10. Directrices de evaluación de cepas con potencial probiótico

Debido a la gran diversidad de géneros y especies de bacterias con potencial probiótico y la multitud de centros de investigación en los que se evalúa, se ha tenido la necesidad de establecer diversos criterios de selección y controles de calidad que son considerados prioridad para permitir su uso. En 2002, el comité mixto de FAO-OMS publicó las directrices para evaluar las propiedades probióticas e incluyen los métodos de prueba.

1.10.1. Identificación del género y especie

Dado que las propiedades probióticas están relacionadas con las cepas y no pueden ser atribuidos de forma generalizada, se recomienda que se realicen primero ensayos fenotípicos, seguidos de la identificación genética por PCR de secuencias del RNA 16S y el análisis de los amplificados utilizando el Ribosomal Database Project (RDP) u otros métodos reconocidos internacionalmente para confirmar la identidad de género y especie (FAO-OMS, 2002).

1.10.2. Estudios *in vitro* para la selección de probióticos

Deben realizarse estudios *in vitro* apropiados para establecer los posibles beneficios de los probióticos para la salud antes de emprender ensayos *in vivo* (FAO-OMS, 2002). Dentro de estos criterios de selección, se incluyen las siguientes pruebas:

Producción de sustancias antimicrobianas

Es necesario demostrar el efecto antagónico de los microorganismos, determinando las características de producción de compuestos antimicrobianos (bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, etc.) los cuales son criterios importantes para conferir el efecto probiótico (FAO-OMS, 2002).

Sobrevivencia al pH ácido y sales biliares

Las bacterias probióticas deben presentar sobrevivencia a condiciones de tracto gastrointestinal, para asegurar su colonización y evidencia de su efecto probiótico. La sobrevivencia al pH ácido en el estómago y a las altas concentraciones de sales biliares en el intestino delgado, son un requisito previo para la colonización y la actividad metabólica de las bacterias probióticas en el huésped (Musikasang *et al*. 2009).

Capacidad de adherencia a las células intestinales

La adherencia de las cepas probióticas es una característica deseable, requerida para la colonización del tracto gastrointestinal; también es un requisito previo importante para la exclusión competitiva de microorganismos patógenos e inmunomodulación en el huésped (Jampaphaeng *et al*. 2017). Debido a que los experimentos de adhesión *in vivo* son difíciles de realizar, se han desarrollado métodos *in vitro* para determinar las propiedades de adherencia de las cepas. La capacidad de formación de biopelículas sobre superficies abióticas, da un indicio de la capacidad de las cepas para adherirse a la mucosa intestinal (Perelmuter *et al*. 2008). Por otra parte, el uso de cultivos celulares a partir de epitelios intestinales normales, son considerados buenos modelos de estudio, debido a que simulan la capacidad de adherencia *in vivo* de cepas probióticas, y a que se ha encontrado que la unión inicial de las bacterias, a menudo es medida por el reconocimiento de restos de azúcares

presentes en las superficies de las células intestinales (incluidos los glicolípidos y las glicoproteínas), como se ha visto para algunos géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Cencic y Langerholc, 2010).

1.10.3. Estudios *in vivo*

Dentro de las pruebas *in vivo*, debe de considerarse que las cepas probióticas deben estar vivas en un número apropiado cuando se administran, generalmente concentraciones de 10^6-10^8 UFC mL^{-1}/UFC g^{-1} han sido aceptadas como la dosis diaria mínima de células probióticas viables. Las pruebas *in vivo* deben ser realizadas para determinar el posible mecanismo de acción de los probióticos. En cuanto al control de patógenos intestinales, algunos mecanismos a estudiar son; la producción de sustancias antimicrobianas, exclusión competitiva de la fijación del patógeno, la competencia por los nutrientes y mecanismos inmunomoduladores. Deben realizarse estudios de tamaño y diseño adecuados, ser claros y realizarse a nivel molecular (FAO-OMS, 2002), donde se utilice la cepa o cepas en el huésped al que se destinan los probióticos (humanos, ganado, animales de compañía etc.) (Reid *et al*. 2019).

1.10.4. Consideraciones de seguridad

Es posible que los microorganismos con potencial probiótico puedan comportarse como patógenos oportunistas causando infección en el huésped, por tal razón se recomienda que las cepas sean sometidas a pruebas que demuestren la no producción de toxinas, ni actividad hemolítica. Por otra parte, se reconoce la necesidad de elaborar ensayos para establecer perfiles de resistencia antimicrobiana a los antibióticos, la cual pueda estar relacionada con genes localizados en el cromosoma, plásmidos o transposones (Jampaphaeng *et al*. 2017).

1.11. Principales microorganismos utilizados como probióticos

Las especies bacterianas mayormente utilizadas como probióticos pertenecen al grupo de las BL. A lo largo de la historia, la leche y los productos lácteos fermentados han constituido una fuente importante de BL con propiedades probióticas, en particular bacterias de los géneros *Lactobacillus spp., Lactococcus spp, Leuconostoc spp., Pediococcus spp.* y *Streptococcus spp.* (Sorrondegui *et al*. 2012; Mahesh *et al*. 2021)

1.11.1. Bacterias Lácticas (BL)

Las BL conforman un grupo de bacterias gram positivas que comparten ciertas características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Este grupo, presenta forma de cocos o bastones, no producen esporas, son anaerobias o microaerofílicas, no móviles, carentes de catalasa y de citocromos (Lahtinen *et al*. 2012). Las BL se encuentran generalmente en plantas y animales, así como en la leche, carne, vegetales y cereales o derivados de estos. Algunas especies también forman parte de la microbiota de humanos y animales (Wedajo, 2015).

De acuerdo con su metabolismo, las BL pueden obtener energía a través de dos vías fermentativas básicas: vía homofermentativa (o de Embden- Meyerhof-Parnas), basada en la glucólisis cuyo producto principal es la producción de ácido láctico, y la vía heterofermentativa (de la pentosa fosfoquinasa), que además del ácido láctico, produce cantidades significativas de CO_2 y acetato (Lahtinen *et al*. 2012).

1.11.2. Taxonomía de las BL

Las BL pertenecen al Filo Firmicutes, clase *Bacilli* y orden *Lactobacillales*. Las diferentes familias incluyen *Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*. Los géneros incluidos son: *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactococcus, Streptococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Aerococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* y *Weisella* (https://www.uniprot.org/taxonomy/186826).

1.11.3. Reclasificación del género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* conformado por 261 especies (hasta marzo 2020), han demostrado gran diversidad a nivel fenotípico, genotípico y ecológico. Gracias a los estudios filogenéticos realizados por Zheng *et al*. (2020), utilizando genes únicos como el gen 16S rRNA, se agruparon a estas especies en clados filogenéticos y, por otro lado, la filogenia del genoma central permitió establecer la heterogeneidad filogenética de los diferentes clados, caracterizados por rasgos fenotípicos y ecológicos en común.

De acuerdo con la reclasificación taxonómica de *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae,* el genero *Lactobacillus* ahora comprende 23 nuevos géneros: *Holzapfelia, Amylolactobacillus, Bombilactobacillus, Companilactobacillus, Lapidilactobacillus, Agrilactobacillus, Schleiferilactobacillus, Loigolactobacilus, Lacticaseibacillus, Latilactobacillus, Dellaglioa, Liquorilactobacillus, Ligilactobacillus, Lactiplantibacillus, Furfurilactobacillus, Paucilactobacillus, Limosilactobacillus, Fructilactobacillus, Acetilactobacillus, Apilactobacillus, Levilactobacillus, Secundilactobacillus* y *Lentilactobacillus* (Zheng *et al*. 2020).

1.11.4. Género *Ligilactobacillus*

Las especies del género *Ligilactobacillus* (de ligare, unir), son *Lactobacillus* con estilo de vida asociado a un huésped. Son bacilos Gram positivos, homofermentativos, mesófilos, no formadores de esporas y algunas especies incluyen cepas que son móviles. La mayoría de las especies tienen la capacidad de sintetizar ureasa, la cual es una enzima utilizada por los *Lactobacillus* para resistir la acidez gástrica, asociada con un estilo de vida adaptado al huésped vertebrado. Las especies de *Ligilactobacillus* han sido aisladas comúnmente de animales, humanos y de alimentos fermentados (Zheng *et al*. 2020).

En particular, las especies de *Ligilactobacillus murinus*, son bacilos inmóviles, mesófilos, aislados principalmente de tracto intestinal de ratón, de otros mamíferos y de masas fermentadas. Las cepas se caracterizan por fermentar lentamente la ribosa y arabinosa, no hidrolizan la urea ni el hipurato, además de que la riboflavina es un factor de crecimiento necesario. El tamaño del genoma de la cepa tipo (313=DSM 20452=NBRC 14221) es de 2.20 Mbp y el contenido molecular de G+C del ADN es de 40.1% (Söhngen *et al*. 2014).

1.12. Antecedentes de la línea de investigación

El Laboratorio 7 de Bioconservación de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM-FESC-UNAM) se enfoca en el estudio multidisciplinario de BL, con el objetivo de lograr el aislamiento y caracterización de microorganismos con aptitud probiótica, que permitan diseñar nuevas estrategias bioprotectoras para la inhibición efectiva de microorganismos patógenos zoonóticos y de interés clínico, así como la evaluación del potencial probiótico para su aplicación en la salud animal. En el proyecto PAPIIT-IN230820 “Evaluación *in vitro* del potencial antagónico de cepas de *Lactobacillus* aisladas de ratón” cordinado por la Dra.

Adriana Llorente Bousquets, se realizó el aislamiento de BL de tracto intestinal de ratón y su caracterización bioquímica (Ríos y Villanueva, 2019). Como resultado se obtuvieron 18 cepas de BL aisladas de ratón CD1 de cuatro semanas de edad, las cuales se identificaron mediante pruebas microbiológicas primarias de cultivo y observación colonial en placa de agar MRS, tinción de Gram y morfología celular por microscopía óptica. Se aislaron 20 cepas, de las cuales 18 eran bacilos Gram positivos. Se utilizaron para realizar las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa, así como de oxidación/fermentación utilizando cinco carbohidratos (sacarosa, glucosa, lactosa, xilosa y sorbitol). Se estableció el perfil de fermentación de carbohidratos con el sistema API 50 CHL y la identificación de los posibles géneros y especies de las cepas de BL aisladas, mediante el sistema API web™. Adicionalmente, se verificó la no producción de hemolisinas, como criterio de seguridad para cepas con potencial probiótico, según FAO-OMS (2002). Para dar continuidad a la caracterización de la aptitud probiótica de estas cepas, se realizó la presente investigación doctoral.

HIPÓTESIS

Especies del género *Lactobacillus* aislados de tracto intestinal de ratón son capaces de producir metabolitos con actividad antimicrobiana contra patógenos de interés clínico y zoonótico, propiedad que junto a otras (resistencia o sensibilidad a los antibióticos, sobrevivencia a condiciones de tracto gástrico e intestinal y capacidad de adherencia) constituyen su potencial probiótico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón, que puedan ser utilizadas como promotores de crecimiento en la alimentación animal, a fin de proponerla como alternativa al uso de antibióticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a nivel molecular las cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón y mediante el uso de herramientas bioinformáticas, realizar el registro en GenBank de las secuencias de los amplificados secuenciados, obtenidos por PCR, para obtener el árbol filogenético.

2. Establecer la actividad antibacteriana *in vitro* de las células y los sobrenadantes de cultivo de las cepas de BL aisladas frente a los microorganismos de prueba *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatógena y *Campylobacter jejuni*, mediante pruebas de difusión en agar, zimogramas de actividad *in situ* e identificar los compuestos protéicos responsables de la inhibición por el método de huella peptídica por UPLC-MS uniprot.org.

3. Evaluar la resistencia y la sensibilidad de cepas de BL aisladas del tracto intestinal de ratón, a antibióticos de uso en humanos y animales, mediante ensayos de difusión en agar.

4. Evaluar la sobrevivencia a condiciones simuladas de tracto gástrico e intestinal *in vitro* de *Ligilactobacillus murinus* aislada de tracto intestinal de ratón.

5. Estimar la capacidad de formación de biopelículas y de adherencia a mucinas de *Ligilactobacillus murinus* aislada de tracto intestinal de ratón, para evaluar su potencial de colonización a nivel intestinal.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2. Identificación microbiológica y molecular de las 18 cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón

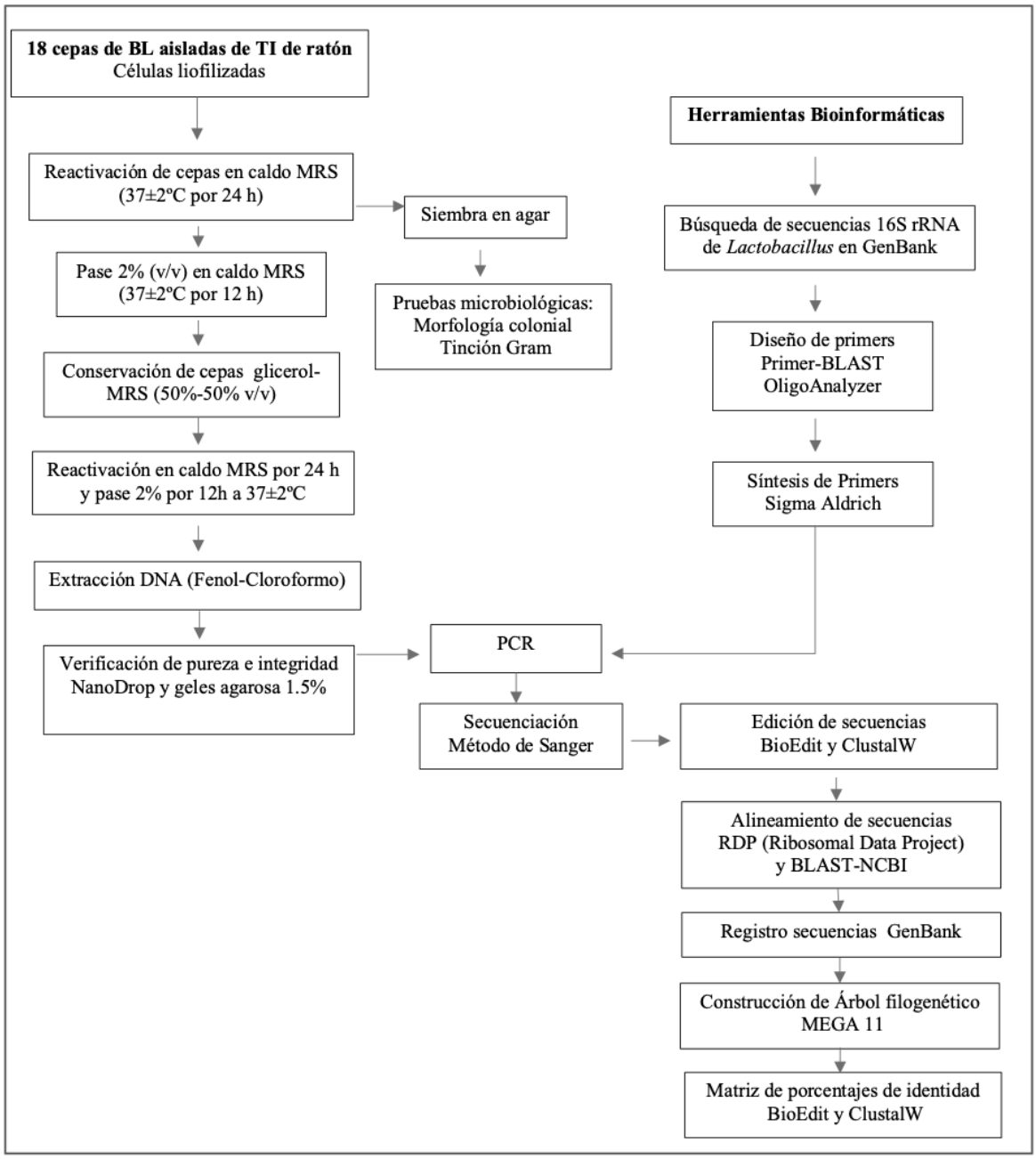


Figura 5. Resumen metodológico para la identificación y caracterización molecular de las 18 cepas de BL aisladas

2.1. Identificación microbiológica y conservación de las cepas de BL

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las 18 cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón, conservadas por liofilización. Para verificar su pureza, las cepas se identificaron por pruebas microbiológicas primarias, para lo cual cada una de ellas se reactivó en 30 mL de caldo MRS a 37±2ºC por 24 h, con un pase del 2% (v/v) en el mismo medio e incubadas por 12 h, se realizó la observación colonial en placa de agar MRS, tinción de Gram y morfología celular por microscopía óptica (Olympus Biological Microscope CX31, USA).

Para conservar su viabilidad y asegurar que en todas las pruebas se emplearan bacterias provenientes del mismo cultivo, las células de cada uno de los cultivos de 12 h, se obtuvieron por centrifugación 5000 g, 10 min a 4ºC (Centrífuga Centurion Scientific, K2015), se realizaron dos lavados consecutivos con agua peptonada estéril y se resuspendieron en medio MRS-glicerol (80%-20%, v/v), las cuales fueron almacenadas a -20ºC hasta su uso.

2.2. Identificación molecular por PCR y caracterización filogenética mediante el gen 16S rRNA

2.2.1. Extracción de DNA

Para la extracción del DNA se utilizaron cultivos puros de 12 h de cada una de las cepas de BL aisladas mediante la técnica de fenol-cloroformo (Burbano, 2006), se corroboró la pureza y concentración de este en espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000) a una $A_{260\text{-}280\,nm}$, además de su integridad en geles de agarosa al 1.5%. Como controles en los ensayos se utilizó el DNA de las cepas *Lactococcus lactis* ATCC 0205V y *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 53103 cultivadas de la misma forma.

2.2.2. Diseño de primers

Se diseñaron primers especie-específicos de cepas de BL (**Cuadro 4**), a partir de las cepas reportadas en la literatura, habitualmente encontradas en microbiota intestinal de ratones. De cada una de estas, se obtuvieron las secuencias parciales o totales del gen 16S rRNA de la base de datos del GenBank®. Estas secuencias se utilizaron para el diseño de primers en el programa Primer-BLAST estableciendo los siguientes parámetros: longitud de 18 a 25 nucleótidos, porcentaje de guanina-citosina (%GC) entre 40% y 50% y diferencia de

temperatura de fusión (Tm) menor o igual a 5ºC. Los primers diseñados fueron sintetizados por Sigma Aldrich Química S de RL de CV.

Cuadro 4. Primers especie-específicos utilizados para la identificación de cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón

Nombre de BL	Id primer	Secuencia (5´→ 3´)	Longitud del amplificado (pb)	Ta (ºC)
Lactobacillus intestinalis	Lbinte-F	GTACAACGAGAAGCGAGCCT		
	Lbinte-R	CACATAAGTGGTTAGGCCACC	213	58
Ligilactobacillus animalis	Lbanim-F	GAGTAACACGTGGGCAACCT		
	Lbanim-R	TGTCTCAGTCCCAATGTGGC	224	57
Limosilactibacillus reuteri	Lbreute-F	AGTCACGGCTAACTACGTGC		
	Lbreute-R	TTCGGTTAAGCCGAGTTTCCA	127	57
Lactobacillus delbrueckii spp. *bulgaricus*	Lbdelb1-F	CCAAGGCAATGATGCGTAGC		
	Lbdelb1-R	TTGCTCCATCAGACTTGCGT	127	56
Lactobacillus acidophilus	Lbacid-F	ACGTCAAGTCATCATGCCCC		
	Lbacid-R	TTAGACGGCTCCTTCCCGAGT	277	59
Limosilactobacillus fermentum	Lbferm-F	TCTTGCGCCAACCCTAGAGA		
	Lbferm-R	GACTCGGTGTTTGGGTGTTACAAAC	446	63
Lactococcus lactis spp. *lactis*	Lclact1-F	GAGCGCTGAAGGTTGGTACT		
	Lclact1-R	TGTCTCAGTCCCAATGTGGC	272	57
Lactococcus lactis spp. *cremoris*	Lclact2-F	GGCGTGCCTAATACATGCAA		
	Lclact2-R	CCGTTCGCTGCTCTTCAAAT	70	55
Lactobacillus gasseri	Lbgass-F	GAGCGAGCTTGCCTAGATGA		
	Lbgass-R	CTCTAGACATGCGTCTAGTGTT	163	58
Ligilactobacillus murinus	Lbmuri-F	AAGAGTTGAGCTGAGCGAACG		
	Lbmuri-R	CGTAGAAGTTTGGGCCGTGTTT	268	60
Lactobacillus crispatus	Lbcris-F	GTACCAAGCCAAAGCAAGAC		
	Lbcris-R	GTTTGAAGCCTTTACGTAAGTC	383	55
Lactiplantibacillus plantarum	Lbcris-F	CCGTTTATGCGGAACACCTA		
	Lbcris-R	TCGGGATTACCAAACATCAC	318	55

2.2.3. Condiciones de la PCR

Para realizar la PCR se calculó temperatura de alineamiento (Ta) de cada par de primers (**Cuadro 4**) de acuerdo con Ausubel (2007). La reacción de PCR se realizó con un volumen final de 25 µL de acuerdo a las especificaciones del kit Master Mix (Promega©) y 5 µL de la muestra de DNA (~150 ng). El ciclo de temperatura se controló de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 95ºC por 5 min, seguida de 35 ciclos a 95ºC por 30 s, con temperatura de alineamiento (Ta) para cada primer (**cuadro 4**) por 30 s, 72ºC por 30 s y un paso de extensión final a 72ºC por 5 min. Los productos de la PCR fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, a 90 V por 1 h, utilizando como estándar de peso molecular GeneRuler™ (DNA Ladder Mix).

2.2.4. Purificación y secuenciación de los amplificados de la PCR

Para la limpieza enzimática de cada producto de PCR se utilizó Exo-Sap IT™ (PCR Product Cleanup Reagent), el cual hidroliza el exceso de primers y nucleótidos (dNTPs), como requisito para su envío a secuenciación, al laboratorio de Bioquímica molecular de la UBIPRO, FES Iztacala, UNAM, con el método de Sanger.

2.2.5. Edición y alineamiento de secuencias en Ribosomal Data Project y BLAST-NCBI

Las secuencias 16S rRNA obtenidas de los cromatogramas de cada aislamiento bacteriano, se editaron utilizando el software BioEdit 7.2. Las secuencias sentido y anti-sentido de cada cepa se alinearon con ayuda del programa ClustalW Multiple Sequence Alignment- EMBL-EBI, con las cuales se elaboró una secuencia consenso a las que se quitaron los primers (Lbanim-F y Lbanim-R). Cada secuencia consenso correspondiente a la región variable V2 [120-330], fue alineada en el programa Ribosomal Data Project (RDP), en BLAST del NCBI y comparadas con las secuencias de la base de datos del GenBank NCBI, tras lo cual, las secuencias consenso de cada cepa aislada se registraron en la base de datos del GenBank con el uso de la herramienta BankIt-NCBI.

2.2.6. Matriz de porcentajes de identidad

La matriz de identidad de las cepas de BL aisladas se realizó con el objetivo de conocer el porcentaje de similitud entre las secuencias, el cual es un resultado directo de la observación de un alineamiento cuantificado en porcentajes (Hall, 1999). Se utilizó el programa BioEdit 7.2 (Informer Techologies, Inc.) en donde se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias con ClustalW, el cual se utilizó para aplicar la opción del logaritmo de matriz de identidad.

2.2.7. Construcción del Árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron las secuencias de las 18 cepas de BL aisladas, además de 12 secuencias de referencia obtenidas del alineamiento en el programa BLAST del NCBI. Ambas secuencias se descargaron de la base de datos del GenBank y editaron en el software BioEdit 7.2 con el objetivo de corroborar que todas las secuencias mantuvieran la misma longitud de nucleótidos. El análisis filogenético se realizó con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA11), con el método de Máxima verosimilitud del modelo sugerido de Jukes-Cantor (Tamura *et al*. 2011). El soporte de la topología interna de las ramas del árbol filogenético fue determinado por análisis de bootstrap con 1000 repeticiones.

2.3. Identificación de los fenómenos de antagonismo de las 18 cepas de BL aisladas frente a patógenos de interés clínico y zoonótico (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Campylobacter jejuni* y *E. coli* REPEC O103)

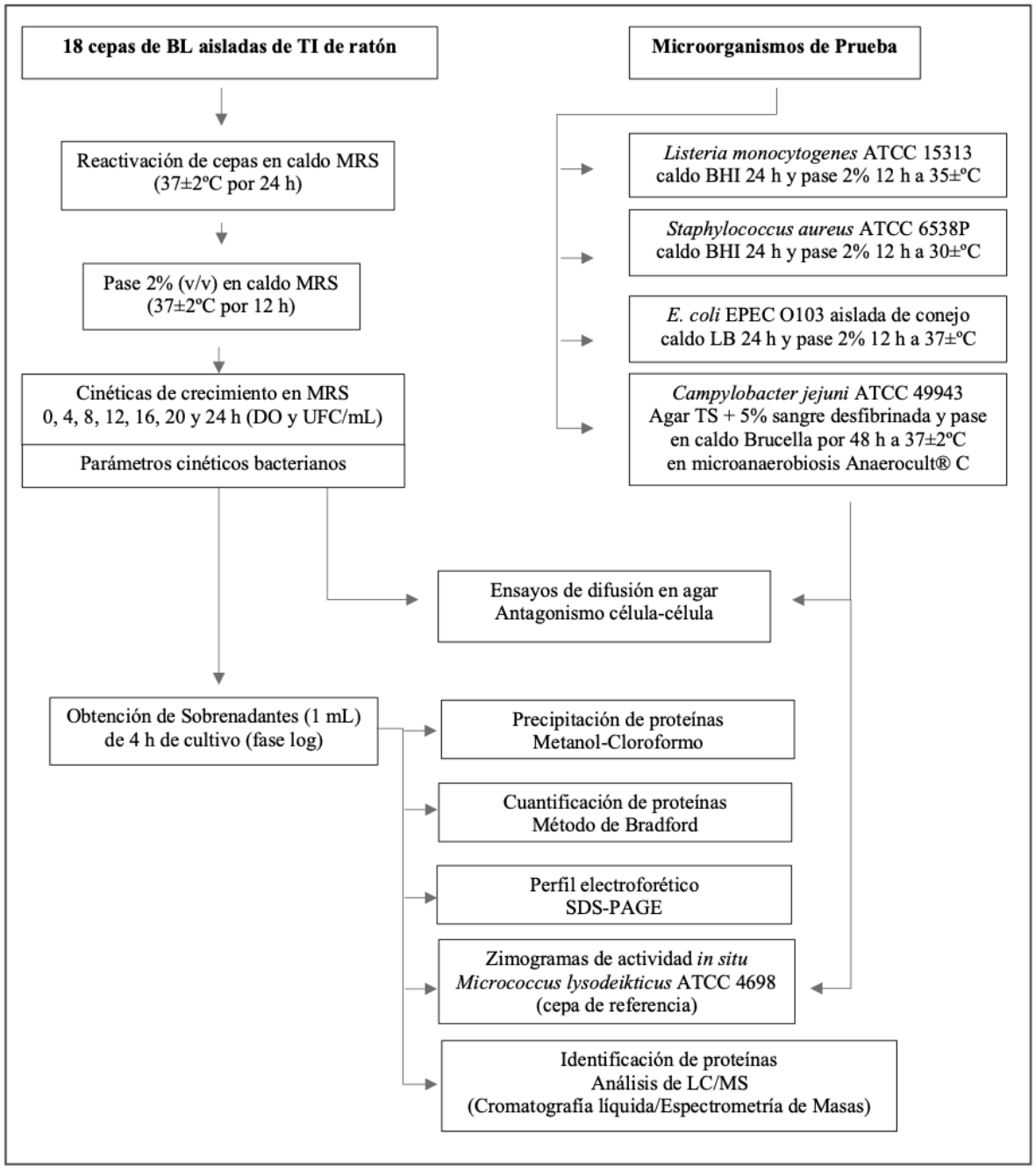


Figura 6. Resumen metodológico para identificar los fenómenos de antagonismo de las 18 cepas de BL aisladas frente a patógenos de interés clínico y zoonótico

2.3.1. Cinéticas de crecimiento de las cepas de BL

Las cinéticas de crecimiento de las cepas de BL aisladas se realizaron con el objetivo de conocer sus fases de crecimiento, su interacción con el medio donde se cultivan y obtener los parámetros cinéticos de cada una. Para la construcción de estas, cada una de las cepas liofilizadas, se reactivó a 37±2ºC por 24 h, con un pase del 2% (v/v) incubadas durante 12 h. Se transfirió una alícuota del 2% (v/v) en tubos con 5 mL de caldo MRS, con DO de cada cultivo inicial ajustado a 0.1 unidades (A_{600nm}). La viabilidad se determinó por el método de diluciones seriadas decimales (10^{-1} a 10^{-6}) y cuenta en placas de agar MRS, los resultados se expresaron como UFC mL^{-1}. También se determinó el crecimiento celular mediante densidad óptica (DO A_{600nm}) en espectrofotómetro (BioPhotometer™, Eppendorf) a las 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h.

2.3.2. Parámetros cinéticos bacterianos

Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de los datos obtenidos de las cinéticas de crecimiento (UFC mL^{-1}) en fase logarítmica (**Figura 7**), utilizando las siguientes fórmulas (Kushkevych *et al*. 2019):

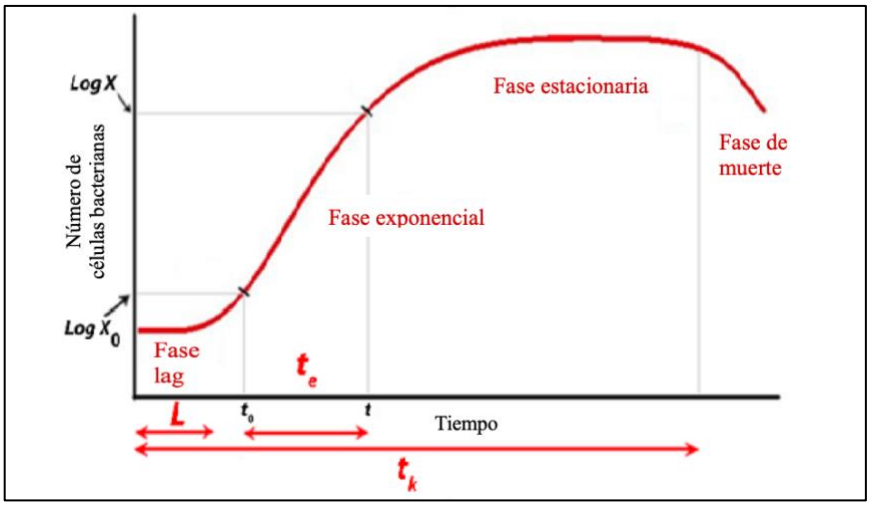


Figura 7. Curva de crecimiento bacteriano.

(**Log X**, **Log X_0**, **t** y **t_0**) marcan la ubicación de los valores para obtener los parámetros de crecimiento bacteriano. (**Tk**) Tiempo del experimento. (**t_e**) Tiempo de la fase exponencial. (**L**) Tiempo de la fase Lag.

Tasa específica de crecimiento (μ): Tasa de crecimiento por unidad de UFC, relacionado con el tiempo de crecimiento de la población

$$\mu = 2.3 \cdot (\text{Log } X - \text{Log } Xo) / t - to$$

Tiempo de duplicación (τ): Tiempo requerido para formar una generación de células

$$\tau = \text{Log } 2 \cdot (t - to / \text{Log } X - \text{Log } Xo)$$

2.3.3. Manejo de microorganismos de prueba

Listeria monocytogenes ATCC 15313 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P se reactivaron en caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco™), cada cepa se incubó a 35±2ºC y 30±2ºC respectivamente por 24 h con un pase del 2% incubadas durante 12 h.

E. coli enteropatógena (EPEC) O103 aislada de conejo (REPEC, Dr. Navarro, CINVESTAV) se obtuvo de la Unidad de Morfología, FESC-UNAM (Oliver *et al*. 2008), a partir de un cultivo puro en caja de agar LB (Luria Bertani, Difco™), se realizó un pase en caldo LB durante 24 h a 37±2ºC en agitación orbital a 150 rpm (Incubadora Lab-Line, EU), con un pase del 2% (v/v) incubada por 12 h.

Campylobacter jejuni ATCC 49943 liofilizada se resuspendió en 5 mL de caldo LB, inóculos de 100 μL se colocaron en cajas de agar Tripticasa de Soya (TS, Difco™) con 5% (v/v) de sangre desfibrinada de bovino (Gañan *et al*. 2009), las cajas se incubaron a 40±2ºC por 48 h en condiciones de microanaerobiosis (6-16% O_2, 7-10% CO_2) en jarras de 2.5 L (Gas Pak 100, BD™) con el sistema de Anaerocult® C.

De cada una de las cepas de prueba se obtuvo su cinética de crecimiento, para identificar la fase logarítmica. Todas las cepas se conservaron en su medio respectivo: caldo BHI para *L. monocytogenes* y *S. aureus*, caldo LB para *E. coli* REPEC y caldo Brucella para *C. jejuni*, con glicerol (10%, v/v) en crioviales estériles de 2 mL, los cuales se almacenaron a -20ºC.

2.3.4. Actividad antagónica por ensayos de difusión en agar

La actividad antagónica se evaluó mediante ensayos de difusión en agar como primer enfoque para determinar el potencial inhibidor de las 18 cepas de BL aisladas frente a los diferentes patógenos. Se utilizaron placas con agar base MRS al 1.5% (p/v), sobre la cual se colocaron

alicuotas de 5µl de un cultivo de 12 h de cada una de las 18 cepas de BL (correspondientes a 7-9 log 10 UFC mL^{-1}). En paralelo, para cada prueba se preparó una sobrecapa con 10 mL de agar suave (0.6% p/v), agar BHI para *L. monocytogenes* y *S. aureus*, agar LB para *E. coli* y agar Brucella para *C. jejuni,* a las cuales se adicionó 100 µL de cultivo de cada patógeno en fase logarítmica. La sobrecapa de agar con cada microorganismo de prueba se vertió inmediatamente sobre las placas de agar MRS. Las placas se dejaron enfriar 15 minutos y se incubaron a 37±2ºC durante 24 h.

Para los ensayos realizados con *C. jejuni*, la sobrecapa se preparó dispersando las células colectadas de una siembra por estría, de media caja de agar TS con 5% de sangre desfibrinada de 48 h e incubadas en condiciones de microanaerobiosis (5-7% O_2, 8-10% CO_2) con el sistema de Anaerocult® C a 40±2ºC. Debido a la amplitud de los halos de inhibición obtenidos, se ensayó cada BL por caja de agar, además de que la visualización de los halos de inhibición se realizó a las 48 y 72 h de incubación.

2.3.4.1. Actividad antagónica por ensayos de difusión en agar de *L. murinus* B1 frente a *E. coli* y *C. jejuni*

Con el objetivo de evaluar la naturaleza de la inhibición, para este ensayo se utilizaron cultivos de 12 h de *L. murinus* B1, con DO_{600nm} ajustada a 0.1, equivalente a 7 log 10 (UFC mL^{-1}) y como microorganismo de prueba se utilizaron cultivos de *E. coli* REPEC y *C. jejuni* en fase logarítmica, estas cepas de prueba se utilizaron debido a que en los ensayos previos se observaron halos de inhibición de mayor tamaño frente a estos microorganismos Gram negativos.

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con Orihuel *et al.* (2018) con algunas modificaciones. A fin de evidenciar los potenciales mecanismos de inhibición hacia *E. coli* REPEC y *C. jejuni,* se evaluaron las siguientes condiciones de la cepa de *L. murinus* B1: **1) cultivo completo** (para evaluar las células vivas, más los productos metabólicos presentes en el medio), **2) células viables**, centrifugadas y lavadas con Solución Salina Fisiológica SSF (0.9%) estéril para retirar el efecto inhibitorio del sobrenadante, **3) células no viables**, las células se lavaron con agua destilada y se calentaron a 95ºC durante 15 min. **4) células tratadas con lisozima**, las células lavadas con SSF se incubaron con una solución de lisozima (2 mg/mL) a 37ºC durante 2 h. **5) sobrenadante libre de células** estéril por

filtración (MF-Millipore, 0.22 µm) para evaluar factores solubles capaces de inhibir el patógeno, **6) sobrenadante neutralizado** a pH 7 con NaOH, para neutralizar los ácidos orgánicos producidos **y calentado** a 97ºC durante 5 min y **7) ácido láctico** al 2% como control del efecto ácido. Se colocaron alicuotas de 5µl de las células o sobrenadantes tratados sobre una placa de agar MRS al 1.5%. Posteriormente, se adicionó una sobrecapa de 10 mL de agar al 0.6% (p/v), agar LB para *E. coli* REPEC y agar Brucella para *C. jejuni* con 100 µL de cultivo de cada patógeno en fase logarítmica.

Las cajas se incubaron de acuerdo a las condiciones de los ensayos previos con cada patógeno (punto **2.2.4.**) y así poder observar los halos de inhibición.

2.4. Actividad bacteriolítica de los sobrenadantes

Para determinar si las cepas de BL aisladas tienen la capacidad de producir compuestos proteicos con actividad antibacteriana, se evaluaron sus sobrenadantes de cultivo por técnicas electroforéticas SDS-PAGE y zimogramas de actividad *in situ*.

2.4.1. Obtención de los sobrenadantes en fase logarítmica

Fueron utilizados cultivos en fase logarítmica (4 h) de cada cepa de BL. Para obtener los sobrenadantes, los cultivos fueron centrifugados (5000 g, 10 min a 4ºC) (Centrifugue Centurion Scientific, K2015), neutralizados a pH 7 (NaOH 6N) y esterilizados por filtración utilizando membranas MF-Millipore (0.22 µm) (Llorente, 2008).

2.4.2. Precipitación de proteínas

Las proteínas de cada muestra de sobrenadante se precipitaron mediante la técnica de Metanol-Cloroformo (Wessel y Flügge, 1984); la cual consistió en colocar 1000 µL de sobrenadante en tubo eppendorf de 2 mL, se adicionaron 545 µL de metanol, 136 µL de cloroformo y 200 µL de H_2O destilada estéril, agitando con Vortex entre cada adición. Las muestras se centrifugaron 14 000 rpm por 3 min. Se retiró la capa acuosa superior de sobrenadante (en la capa intermedia se encuentran las proteínas), se adicionaron 545 µL de metanol y se centrifugaron de la misma manera. Se decantó el sobrenadante y las muestras se dejaron evaporar en la campana de flujo laminar por 30 minutos para eliminar los residuos de Metanol.

2.4.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de microBradford (Bradford, 1976). Para lo cual, cada muestra de proteína precipitada se resuspendió en 10 µL de agua desionizada mas 190 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad, No cat. 5000205) colocadas en placas de 96 pocillos para determinar la DO (595nm) en un lector de placas (iMArk™ Microplate Absorbance Reader, BioRad). Como control se utilizaron las proteínas precipitadas de caldo MRS estéril (1 mL). En cada ensayo se construyó una curva estándar utilizando Albumina Sérica Bovina ($1mg \cdot mL^{-1}$) (Sigma-Aldrich S.A. de C.V.).

2.4.4. Perfil electroforético SDS-PAGE

El análisis de las proteínas de sobrenadantes de cultivo de las BL se realizó mediante geles de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Laemmli, 1970). Las muestras de proteínas precipitadas a partir de 1 mL de sobrenadantes de cada BL, se resuspendieron en 15 µl de agua desionizada, se mezclaron con 5 µl de buffer de muestra (Laemmli Sample Buffer 4x, Bio Rad™, No cat. 1610747), desnaturalizaron a 95ºC por 5 min y vertieron en cada pocillo del gel. Los geles se procesaron en una cámara de electroforesis (MiniPROTEAN III, Bio-Rad™) a 90 voltios durante 150 minutos y 20 mA (PowerPac Basic, BioRad™). Posteriormente, se tiñeron con azul brillante de Coomassie (Sigma-Aldrich S.A. de C.V.) al 0.25% durante 1 h y se decoloraron con solución decolorante (metanol-ácido acético-agua bidestilada) (200 mL, 150 mL, 650 mL) durante 12 h. Los geles se analizaron en un sistema Gel Logic 100 (Imaging System, KODAK) para establecer el perfil electroforético de las bandas de proteínas de cada sobrenadante.

2.4.5. Zimogramas de actividad *in situ*

La Zimografía es una técnica electroforética basada en SDS-PAGE, que incluye un sustrato copolimerizado con el gel de poliacrilamida para la detección de actividad proteolítica (Vandooren *et al*. 2013). Utilizando este mismo principio, la actividad bacteriolítica de las proteínas contenidas en los sobrenadantes de cultivo se evaluaron mediante técnicas zimográficas de actividad *in situ*.

Para lo cual, las células provenientes de 60 mL de cultivo de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ó de *C. jejuni*, lavadas dos veces con SSF (0.9%) estéril, se utilizaron como sustrato al copolimerizarlas con las mezclas de geles de poliacrilamida al 12%. Por separado se preparó otro gel con la cepa de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 liofilizado (Sigma-Aldrich S.A. de C.V.) al 0.2% (p/v) como control positivo para la identificación de actividad de Peptidoglicano Hidrolasa (PGH) (Mora *et al*. 2003; Llorente, 2008).

Las muestras de proteínas precipitadas y las condiciones de la SDS-PAGE se llevaron a cabo en las mismas condiciones descritas en el punto anterior. Terminada la electroforesis, los geles se desmontaron e incubaron en una solución renaturalizante (Tris-HCl 25 mM, pH 8 con Tritón X-100 (No cat. 1610407 Bio-Rad) al 1% (v/v) durante 12 h con el objetivo de evidenciar la actividad lítica.

Para obtener una mejor definición, los geles se tiñeron durante 1 h con azul de metileno al 1% (p/v) en solución de KOH al 0.1% (p/v) y decoloraron con H_2O destilada estéril.

Debido a que los zimogramas copolimerizados con células de *C. jejuni* evidenciaron actividad lítica difusa, se decidió disminuir el tiempo de renaturalización de 12 a 6 h con solución renaturalizante (Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM y $5CaCl_2$, pH 8 con Tritón al 1% v/v) de acuerdo a Llorente *et al.* (2008).

2.5. Identificación de proteínas con actividad lítica de *L. murinus* B1 por la técnica de huella peptídica por UPLC-MS

El mapeo mediante huella peptídica es una técnica para confirmar la identidad y la caracterización de una proteína específica ó las proteínas de una mezcla compleja, mediante la coincidencia de las masas de péptidos analizados, con las masas de los péptidos teóricos encontrados en las bases de datos de proteínas. Para el análisis, las muestras de proteínas son obtenidas a partir de las bandas de proteínas de los geles de Tris Tricina (SDS-PAGE) de aquellas que evidenciaron actividad lítica en los zimogramas de actividad *in situ.* Se obtuvieron péptidos mediante incubación con proteasas y posteriormente fueron analizados por **UPLC-MS** (Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, por sus siglas en inglés). Posteriormente se realizó un análisis de secuencias homólogas con ayuda del Sofware PLGS (Protein Lynx Global Server, versión 2.5.3, Waters©).

2.5.1. Preparación de geles SDS-PAGE

Para este ensayo, se utilizaron los sobrenadantes de cultivo de la cepa de *L. murinus* B1, esta cepa fue seleccionada debido a que Palma *et al*. (2021), evaluaron los sobrenadantes de cultivo neutralizados y filtrados, mediante técnicas cualitativas y cuantitativas por ensayos de difusión en agar y cinéticas de inhibición en caldo, cuyos resultados demostraron la actividad antagónica frente a *S. aureus* ATCC 6538P.

Se realizó electroforesis SDS-PAGE al 12% se prepararon con las proteínas precipitadas de los sobrenadantes de cultivo en fase logarítmica (4 h) de *L. murinus* B1 y en paralelo se realizaron Zimogramas de actividad *in situ* coopolimerizados con las células de *M. lysodeikticus* y *E. coli* REPEC, descritos previamente en los puntos **2.4.4.** y **2.4.5.**
Adicionalmente se realizó electroforesis en geles de Tricina (No cat. 1610713 Bio-Rad) SDS-PAGE al 16% (49.5% T, 3% C), para evidenciar y obtener separadas las proteínas de bajo peso molecular entre 15 a 30 kDa (Schägger y Jagow, 1987). Los geles preparados se procesaron en una cámara de electroforesis (MiniPROTEAN III, Bio-Rad^{TM}) a 100 voltios durante 100 minutos y 30 mA (PowerPac Basic, BioRad^{TM}). Como requisito previo para la identificación de proteínas, los geles se tiñeron con solución de Coomassie coloidal G-250 al 0.02% (p/v).

2.5.2. Preparación de las muestras

El tratamiento de las muestras para la identificación por espectrometría de masas se realizó de acuerdo con el protocolo desarrollado en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), Facultad de Química, UNAM (Salgado *et al*. 2015). Las bandas protéicas con actividad lítica fueron cortadas de los geles en fragmentos pequeños con ayuda de un bisturí, se colocaron en tubos Eppendorf y se adicionaron 100 µL de solución de desteñido preparada con 80 mg de bicarbonato de amonio, 20 mL H_2O y 20 mL acetonitrilo (grado LC-MS, J.T. Baker) por 15 min a 50 rpm en un agitador orbital (Labnet International, Inc.).
Para reducir y alquilar las proteínas de las muestras, se descartó la fase líquida y adicionaron 5.5 µL de TCEP 0.5 M (Tris-2-Carboxietil-fosfina) y 50 µL de bicarbonato de amonio 25 mM por 10 min a 60ºC. La fase líquida se descartó y las muestras se alquilaron con 200 µL

de iodoacetamida 200 mM (J.T. Baker) por 1 h en agitación (50rpm) en cuarto obscuro. La fase líquida se descartó y las muestras se lavaron con 200 µL de bicarbonato de amonio 25 mM por 5 min. Se descartó la fase líquida y las muestras se deshidrataron con 200 µL de acetonitrilo al 100% por 15 min a 24ºC y secaron por 5 min en un concentrador de vacío (GeneVac^{TM}).

Para la digestión de las muestras se utilizó 1 µL de tripsina (Promega No cat. V528A) de una solución stock preparada (1µg/µL) y 100 µL de bicarbonato de amonio 25 mM durante 18 h a 37ºC. Los péptidos digeridos se obtuvieron de la fase líquida pasando a un nuevo tubo eppendorf. Para extraer los péptidos atrapados en el gel, este se lavó con 50 µL de solución de desteñido por 10 min, finalmente la muestra con los péptidos se secaron por completo en concentrador de vacío por 2 h.

Los péptidos se resuspendieron en 10 µL de solución de H_2O 99.9% y ácido fórmico 0.1% (v/v) y se purificaron por extracción en fase sólida utilizando un concentrador de proteínas (Bond Elut OMIX, C18, No. A5700310K). La columna C18 se activó con 10 µL de ácido nítrico seguido de dos lavados con 10 µL de solución de H_2O 99.9% y ácido fórmico 0.1%. La muestra con péptidos fue pasada por la columna 15 veces para ser atrapados y posteriormente esta se lava dos veces con H_2O 99.9% y ácido fórmico 0.1%. Los péptidos atrapados en la columna se liberaron lavando la columna dos veces con 10 µL de ácido nítrico al 49.9% y 99.9% respectivamente y depositando la solución (conteniendo los péptidos) en un inserto de vidrio. El inserto con los péptidos se secaron y resuspendieron en 25 µL de una fase móvil de HPLC (97% agua analíticamente pura, 3% acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico).

2.5.3. Análisis por UPLC-MS

El análisis de péptidos por espectrometría de masas se realizó en un equipo nano-LC-ESI-/MS integrado SYNAPT G2S (Waters Corporation, UK) equipado con una fuente de iones NanoLockSpray y acoplado en línea a un cromatógrafo de líquidos nanoACQUITY Ultra Performance (UPLC; Waters Corporation). El sistema de disolventes binario se compuso de ácido fórmico al 0.1% en agua (fase móvil A) y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo (fase móvil B). La muestra se inyectó en una pre-columna 2G nanoAcquity UPLC Trap Column de 5 µm, 180 µm x 20 mm (S/N 03073720616583) y posteriormente se lavó con el disolvente

de fase móvil A con una velocidad de flujo de 0.4 µL/min. Posteriormente los péptidos se separaron en una columna nanoAcquity UPLC de 1.8 µm, HSST3 C18, 75 µm x 150 mm (S/N 01973716416209) utilizando un gradiente lineal hasta el 40% de fase móvil B con una velocidad de flujo de 0.4 µL/min.

El software utilizado para el procesamiento de los datos fue Protein Lynxs Global Selver 2.5.1^{TM}; Waters (PLGS). Para la identificación de las proteínas se usaron las bases de datos extraídas de la página web: https://www.uniprot.org, para el género *Ligilactobacillus*.

2.6. Pruebas de sensibilidad a antibióticos mediante ensayos de difusión en agar de las 18 cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón

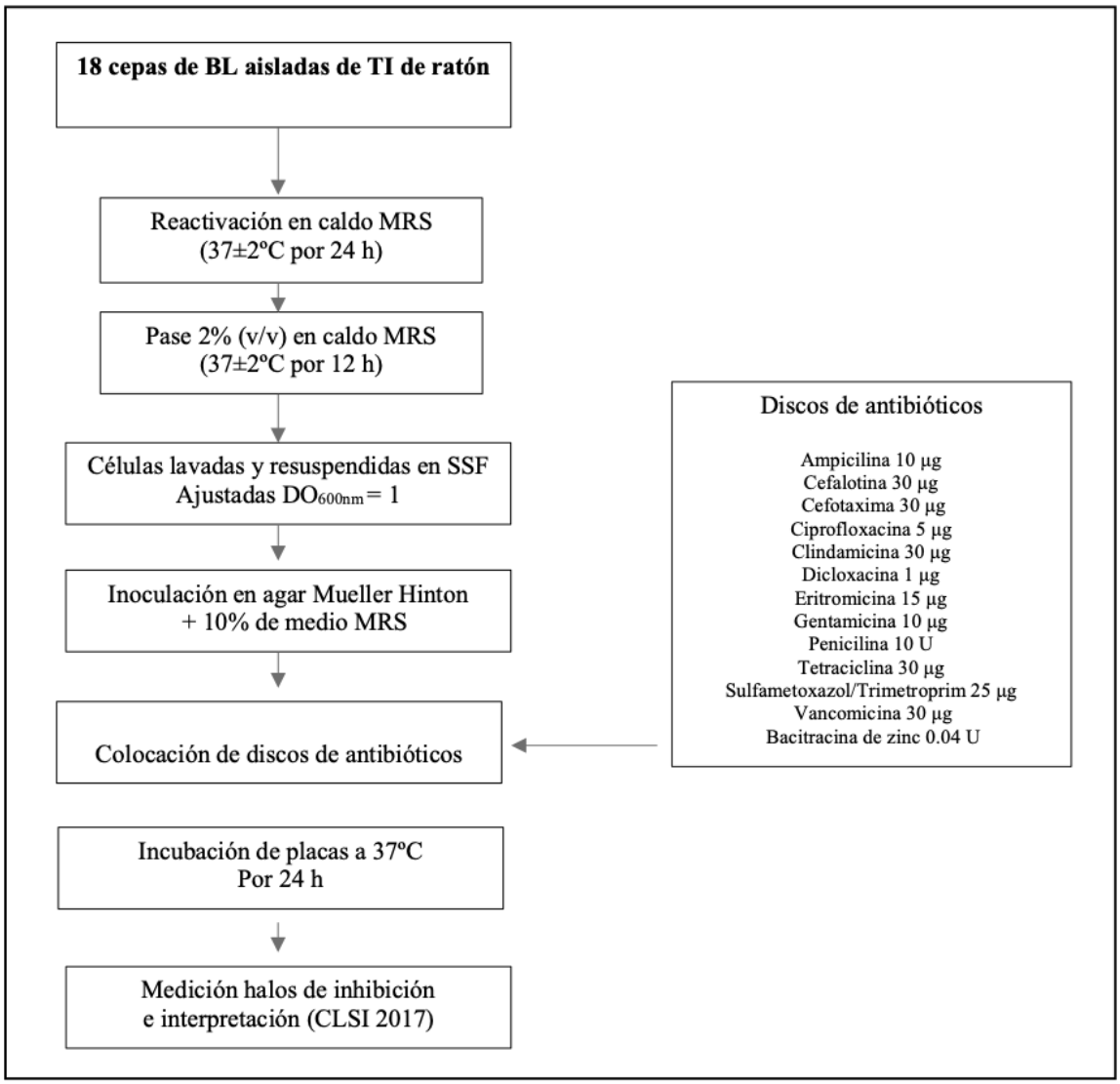


Figura 8. Resumen metodológico de los ensayos de difusión en agar para determinar la sensibilidad de las 18 cepas de BL a diferentes antibióticos de uso humano y veterinario

2.6.1. Ensayos de difusión en agar

La susceptibilidad de las cepas aisladas a diferentes antibióticos se evaluó de acuerdo a la guía técnica de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2012) utilizando el método de difusión en agar. A partir de cada cultivo reactivado, se realizó un pase del 2% en caldo MRS incubando 12 h a 37±2ºC, las células se obtuvieron por centrifugación (5000g por 5 min) y se preparó una suspensión bacteriana con H_2O destilada estéril y la DO_{600nm} ajustada a 0.5.

Para la prueba de difusión se utilizaron cajas de agar Mueller Hinton (BD, Difco™) suplementado con 10% de medio MRS (debido a los requerimientos nutricionales de las BL), sobre las cuales se colocaron y dispersaron 100 µL de la suspensión bacteriana con ayuda de un asa de Drigalski. Las cajas se dejaron secar por 15 min para después colocar los discos de antibióticos de uso humano y veterinario (BBL™ Becton Dickinson Company, USA) en las concentraciones mostradas en el **Cuadro 5**. Las cajas se incubaron a 37±2ºC por 12 h y el diámetro de los resultados se reportó como susceptible (S), Intermedia (I) o resistente (R) de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute (2020).

Cuadro 5. Categorías interpretativas y puntos de corte de diámetro de zona

Antibiótico	**Concentración**	**Límites indicados**		
		Sensible (S)	**Intermedio (I)**	**Resistente (R)**
Ampicilina	10 µg	≥20	15–19	≤14
Cefalotina	30 µg	≥18	15–17	≥14
Cefotaxima	30 µg	≥23	15-22	≤14
Ciprofloxacina	5 µg	≥21	16–20	≤15
Clindamicina	30 µg	≥21	15–20	≤14
Dicloxacilina	1 µg	≥13	11–12	≤10
Eritromicina	15 µg	≥23	14–22	≤13
Gentamicina	10 µg	≥15	13–14	≤12
Penicilina	10 U	≥29	–	≤28
Tetraciclina	30 µg	≥19	15–18	≤14
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	25 µg	≥16	11–15	≤10
Vancomicina	30 µg	15	–	–
Bacitracina de zinc	0.04 U	≥20	15–19	≤14

(CLSI, 2020)

2.7. Ensayos *in vitro* de sobrevivencia a condiciones simuladas de tracto gástrico e intestinal de la cepa *Ligilactobacillus murinus* B1

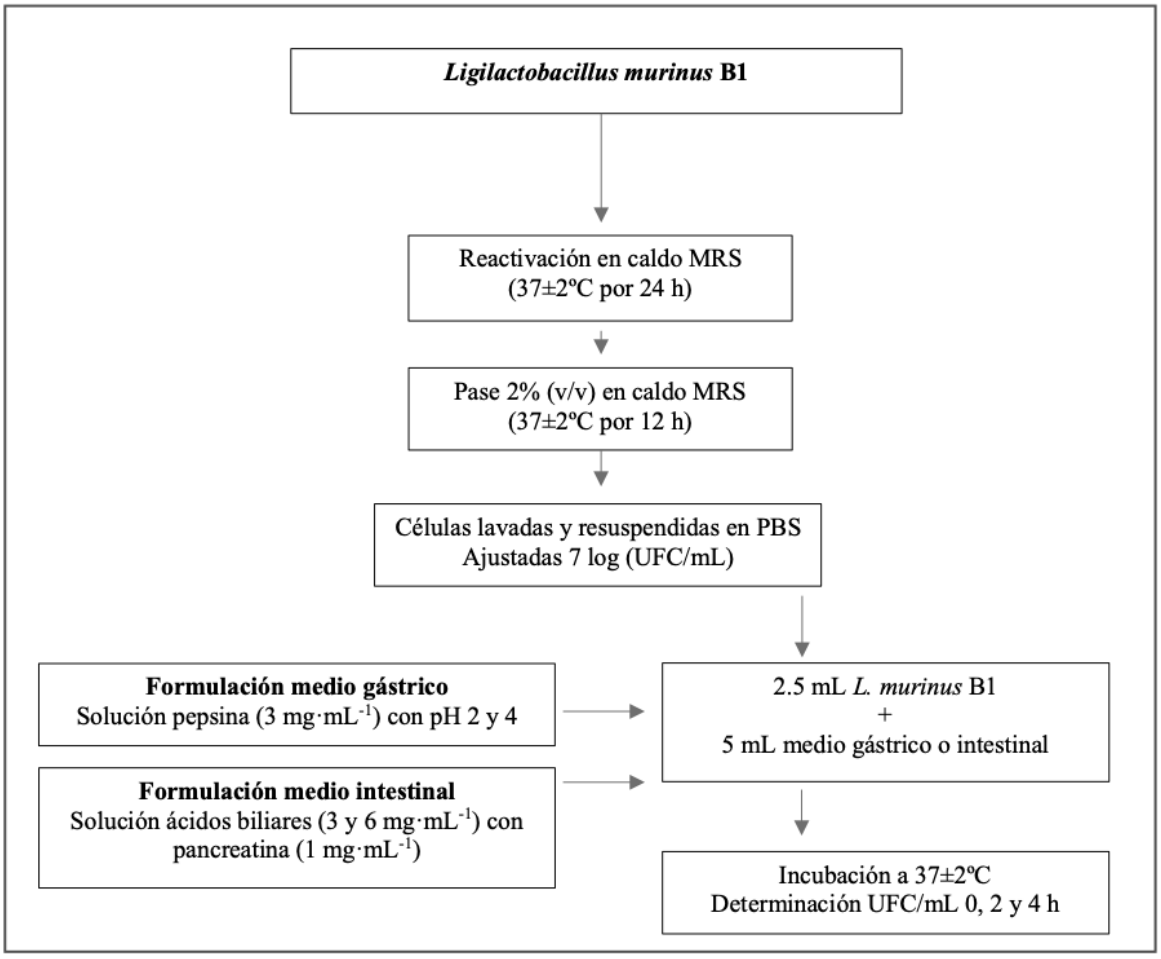


Figura 9. Resumen metodológico de la sobrevivencia a condiciones gástricas e intestinales de *Ligilactobacillus murinus* B1

2.7.1. Sobrevivencia a condiciones de medio gástrico

Para determinar la sobrevivencia de *L. murinus* B1 se utilizó la metodología descrita por Musikasang *et al*. (2009) y Sandoval *et al*. (2019). El jugo gástrico simulado se preparó con una solución de pepsina 3 mg·mL^{-1} (Pepsin from porcine, Sigma-Aldrich) en solución SSF con pH ajustado a 2 y 4 (HCl 1.0 M) en tubos Falcon con capacidad de 50 mL, posteriormente las soluciones fueron esterilizadas por filtración utilizando membranas MF-Millipore (0.22 µm).

Las células de *L. murinus* se obtuvieron de 30 mL de un cultivo incubadas 24 h a 37±2ºC con un pase del 2% (v/v) incubadas durante 12 h. El cultivo fue centrifugado a 5000 g por 10 min a 4ºC, se realizaron dos lavados y se resuspendieron en 2.5 mL de solución PBS para ajustar las UFC mL^{-1} a 7 log.

Para realizar el desafío en medio gástrico se usaron tubos Falcon de 50 mL, en donde se colocaron 2.5 mL de la suspensión bacteriana y 5 mL de jugo gástrico formulado. Para el grupo control, el jugo gástrico fue sustituido por 5 mL de PBS. Las suspensiones se incubaron a 40±2ºC y el número de UFC mL^{-1} se determinó a los tiempos 0, 2 y 4 h de incubación.

2.7.2. Sobrevivencia a condiciones de medio intestinal

La sobrevivencia al medio intestinal se determinó de acuerdo con la metodología de Vidhyasajar y Jeevaratnam (2012). El jugo intestinal se preparó realizando una solución de ácidos biliares (Ox bile, Sigma-Aldrich) en concentración de 3 y 6 mg·mL^{-1} y pancreatina 1 mg·mL^{-1} en SSF con pH ajustado a 8 (NaOH 0.1 N), las soluciones se esterilizaron por filtración (MF-Millipore, 0.22 µm).

Para realizar el desafío en medio intestinal se agregaron 2.5 mL de la suspensión bacteriana de *L. murinus* (7 log, UFC mL^{-1}) y 5 mL de jugo intestinal formulado en tubos Falcon de 50 mL. Para el grupo control, el jugo intestinal se sustituyó por 5 mL de PBS. Las suspensiones se incubaron a 40±2ºC y el conteo de UFC mL^{-1} se determinaron a los tiempos 0, 2 y 4 h de incubación. El porcentaje de sobrevivencia se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

% sobrevivencia = (UFC mL^{-1} tratamiento / UFC mL^{-1} control) x 100

2.8. Estimación de la capacidad de formación de biopelículas y adherencia a mucinas de *Ligilactobacillus murinus* B1

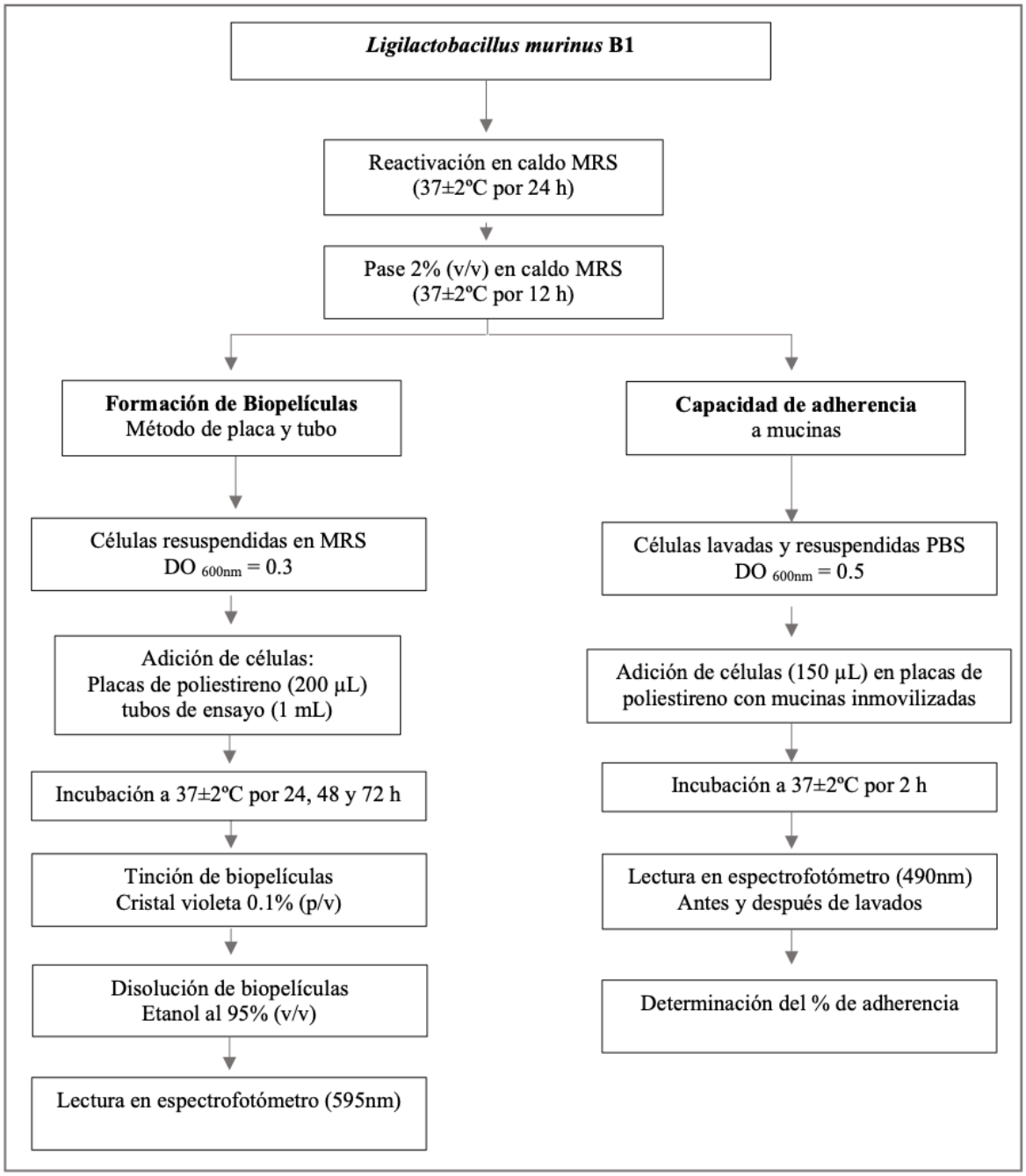


Figura 10. Resumen de la metodología para determinar la capacidad de formación de biopelículas y adherencia a mucinas de *Ligilactobacillus murinus* B1

2.8.1. Formación de biopelículas

La capacidad de formación de biopelículas fue estudiada utilizando el método de tinción con cristal violeta en placas de poliestireno y tubos de vidrio de acuerdo con Panda *et al*. (2016). A partir de cada cultivo reactivado en caldo MRS incubado por 12 h a 37±2ºC, se ajustó la lectura de absorbancia a 0.3 (A_{600nm}) con caldo MRS estéril y se adicionaron 200 µl o 1 mL en placas de poliestireno de 96 pozos (Microtiter, Thermo Electron Corporation, USA) o tubos de vidrio respectivamente, incubando por 72 h a 37±2ºC. A lo largo de la incubación, el medio MRS con las células planctónicas fueron removidos y sustituidos por caldo MRS estéril, cada 24 h.

Para la cuantificación de las biopelículas, los pocillos o tubos se lavaron dos veces con solución PBS, las biopelículas fueron teñidas adicionando 200 µl o 1 mL de solución de cristal violeta al 0.1% (p/v) durante 10 minutos y tras dos lavados con H_2O desionizada, los pozos y tubos se secaron durante una hora a temperatura ambiente. El colorante, unido a las células adheridas a las superficies de los pozos o tubos se disolvieron con 200 µl o 1 mL de etanol al 95% (v/v). Para determinar la absorbancia se transfirieron 200 µl de la solución en una nueva placa de poliestireno y la lectura se realizó con un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) a 595nm, utilizando como control negativo caldo MRS estéril y como control positivo la cepa de *L. rhamnosus* GG ATCC 53103.

Se realizaron 5 réplicas con cuatro repeticiones de cada cultivo y la intensidad de formación de biopelículas se clasificó de acuerdo a Stepanović *et al*. (2004), calculando la densidad óptica de corte (DOc) definida como cuatro veces la absorbancia del control negativo (MRS sin inocular).

Las cepas se clasificaron como: DO ≤ DOc = no productoras de biofilms, DOc < DO ≤ (2xDOc) = débiles productoras, (2xDOc) < DO ≤ (4xDOc) = productoras moderadas y (4xDOc) < DO = fuertes productoras.

2.8.2. Adherencia a mucinas

Para evaluar la capacidad de adherencia de la cepa de *L. murinus* B1 se utilizó mucina (tipo III, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) la cual, se inmovilizó en una microplaca de 96 pozos de poliestireno utilizando la técnica descrita por Leccese *et al.* (2014). Los pozos se cubrieron con 150 µl de mucina en concentración de 1 mg mL^{-1} en PBS, la cual se incubó por 30 min a 37±2ºC y posteriormente a 4±2ºC por 12 h. Los pozos se lavaron dos veces con PBS y Albumina Sérica Bovina al 1% (p/v) por dos horas a temperatura ambiente.

Para el ensayo de adherencia, se adicionaron 150 µl de las células de un cultivo reactivado durante 24 h y un pase del 2% incubado durante 12 h de *L. murinus* B1, lavadas y resuspendidas en solución PBS con $DO_{490\ nm}$ ajustada a 0.5 unidades de absorbancia. Las placas se incubaron por 2h a 37±2ºC, para determinar la DO antes (A_{490nm}**1**) y después (A_{490nm}**2**) de realizar dos lavados con PBS. Para calcular el porcentaje de adherencia se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ adherencia} = (A_{490nm}\mathbf{2} / A_{490nm}\mathbf{1}) * 100$$

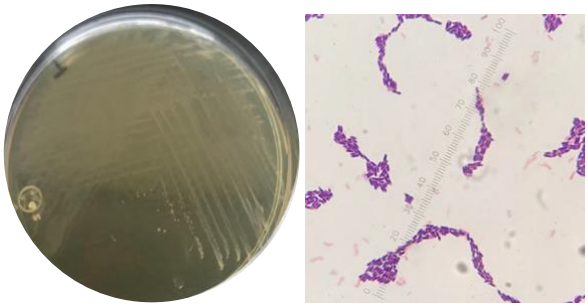
CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Identificación de las cepas de BL aisladas por técnicas de microbiología clásica

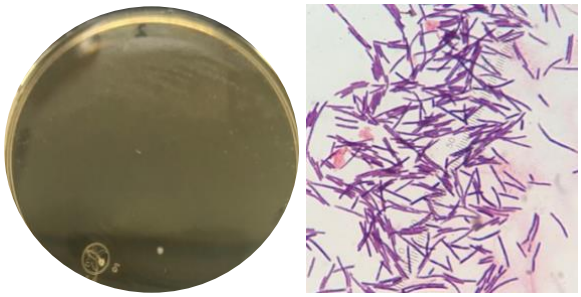
Una vez reactivadas las cepas de BL procedentes de intestino de ratón de cuatro semanas de edad en caldo y agar MRS, se inspeccionó la morfología y pureza de los cultivos en la caja de agar y tinción de Gram de las células bajo microscopía óptica.

Las 18 cepas de BL presentaron características morfológicas propias para *Lactobacillus*, de acuerdo con lo descrito por Axelsson (2012); colonias con forma redonda, de 1 a 2 mm de diámetro, color blanco, apariencia cremosa, bordes continuos y bacilos Gram positivos bajo tinción de Gram (**Figura 11**).

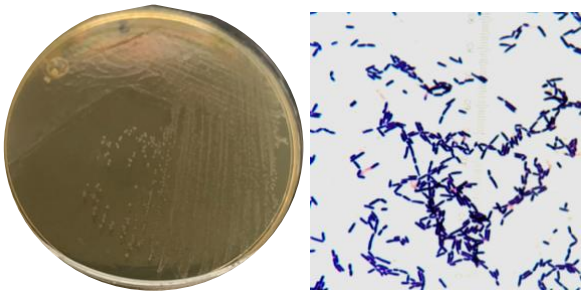
Cepa A1



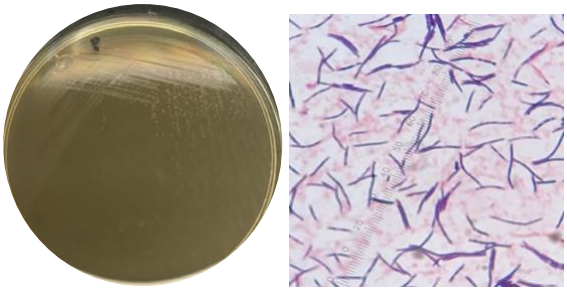
Cepa A2



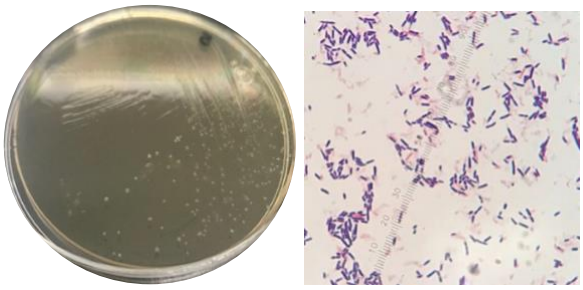
Cepa B1



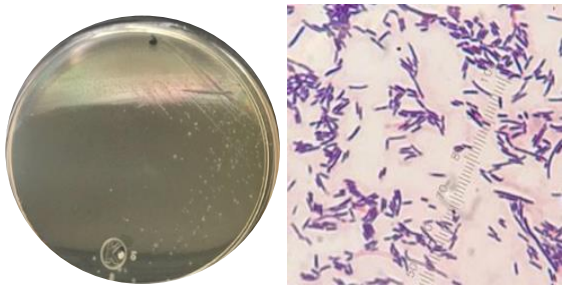
Cepa C1



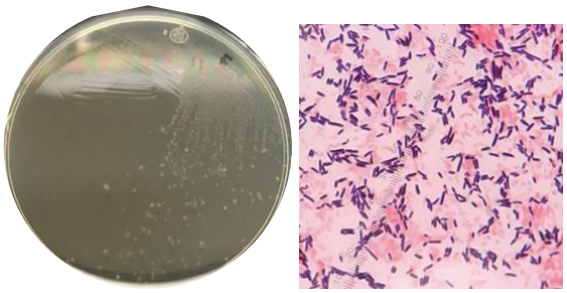
Cepa D1



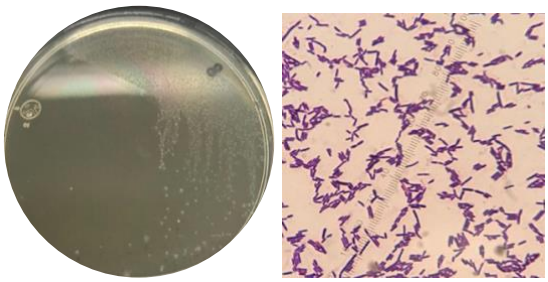
Cepa E1



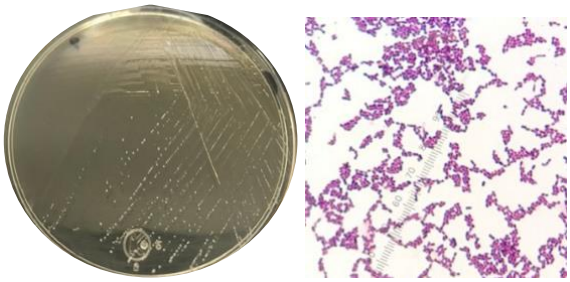
Cepa E2



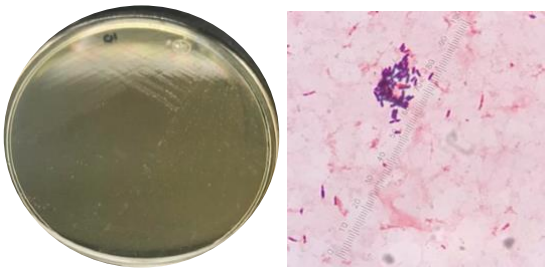
Cepa E3



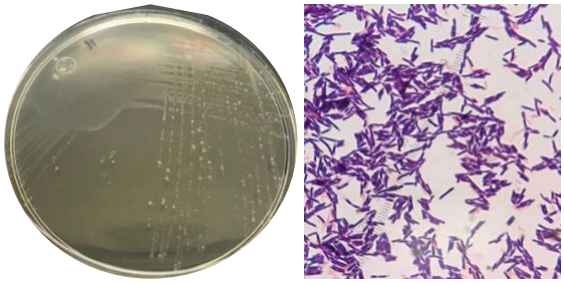
Cepa E4



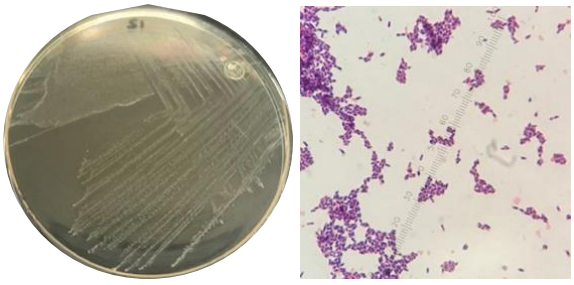
Cepa E5



Cepa F1



Cepa F2



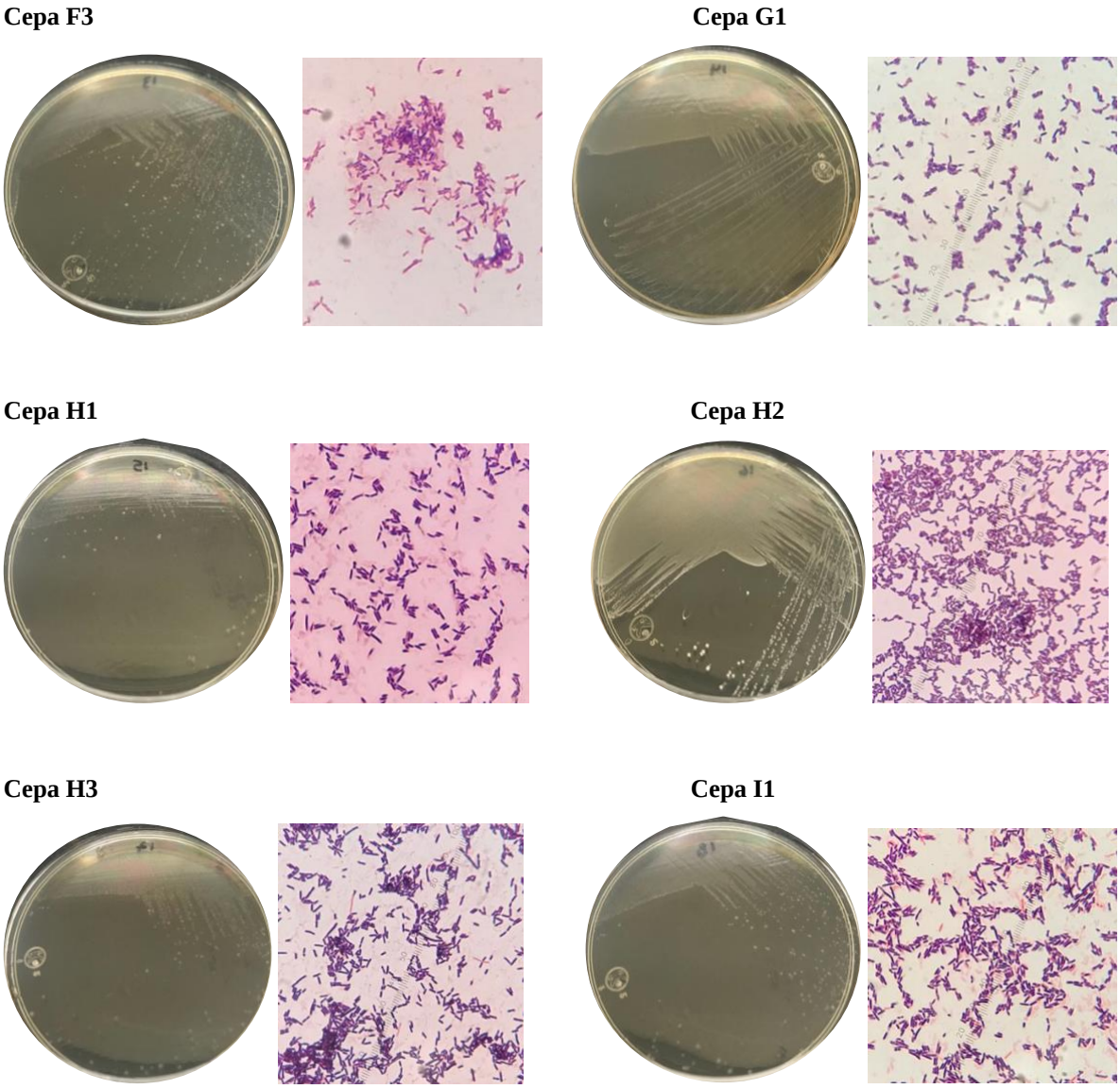


Figura 11. Cultivo en agar MRS y tinción de Gram de las 18 capas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón

3.2. Identificación molecular por PCR mediante el gen 16S rRNA y caracterización filogenética mediante el gen 16S rRNA

FAO-OMS (2002) mencionan que los efectos benéficos de las cepas con potencial probiótico no pueden ser atribuidos de forma generalizada al género o especie, sino que son dependientes de la cepa. Por lo qué como primer requisito, en este trabajo se realizó la identificación molecular de los microorganismos y la caracterización filogenética de las cepas aisladas de tracto intestinal de ratón, mediante PCR usando el gen 16S rRNA.

Como resultado en el diseño de primers se obtuvieron los 12 pares de cebadores esperados, cabe mencionar que los pares de primers correspondientes a *L. animalis* y *L. delbrueckii* resultaron inespecíficos y produjeron amplificados con diferentes BL, lo cual fue corroborado tras realizar la PCR, obteniendo amplificados con estos dos pares de primers para las 18 cepas de BL y las cepas de *Lc. lactis* y *L. rhamnosus* utilizadas como controles en el ensayo. Debido al corto tamaño de los amplificados obtenidos con el par de primers para *L. delbrueckii* (127 pb), se decidió trabajar con los amplificados de 224 pb obtenidos con los primers para *L. animalis* (**Figura 12**).

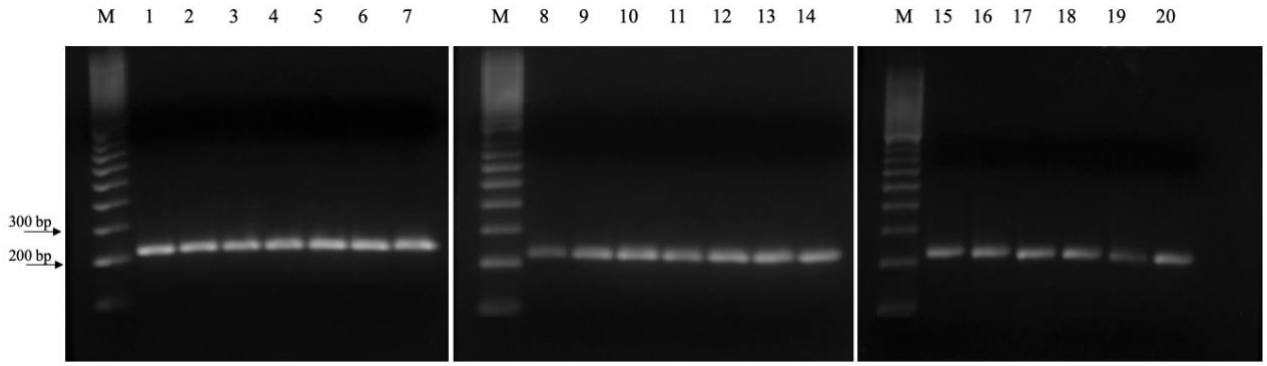


Figura 12. Productos obtenidos por PCR con los primers de *Ligilactobacillus animalis* para las 18 cepas de BL aisladas

A1, A2, B1, C1, D1, E1, E2, E3, E4, E5, F1, F2, F3, G1, H1, H2, H3 e I1 (carril 1-18), controles *Lactococcus lactis* (carril 19) y *Lacticaseibacillus rhamnosus* (carril 20), marcador de peso molecular GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix (M).

3.2.1. Análisis de secuencias de los amplificados

Una vez obtenidos los amplificados por PCR, los fragmentos purificados y secuenciados por el método de Sanger, permitieron obtener los cromatogramas de las secuencias lineales sentido (fordware) y antisentido (reverse) para cada cepa de BL aislada **(Anexo 1)**.

Debido a que los resultados de los cromatogramas suelen llevar ruido en los extremos de la secuencia por variación propia del proceso y para determinar que sección de la secuencia es realmente la correspondiente a la real de nuestras muestras, los cromatogramas se analizaron en BioEdit de manera visual considerando los siguientes criterios: el parámetro de calidad debe ser relativamente alto y estable, la presencia de picos de señal deben estar definidos para cada nucleótido y resueltos uno del otro, respuesta fuerte y constante, si baja la intensidad de la señal puede tomarse la secuencia obtenida (si la calidad y definición son buenas) y por último no debe existir ruido excesivo. De las secuencias que se obtuvieron inicialmente, se eliminaron las secciones iniciales y/o finales correspondientes al par de primers para *L. animalis* (Lbanim-F y Lbanim-R).

3.2.2. Alineamiento de las secuencias en el programa RDP

La base de datos RDP, es un portal que proporciona datos de secuencias de genes 16S rRNA alineados y anotados, además de un marco de referencia taxonómico. La herramienta de Aligner permite analizar secuencias por medio de un programa basado en el contexto estocástico (INFERNAL: INFERence of RNA ALignment) que incorpora información sobre la estructura secundaria del 16S rRNA y para la identificación taxonómica, esta base de datos utiliza la herramienta RDP Classifier, la cual se basa en un algoritmo Bayesiano sencillo (https://rdp.cme.msu.edu/index.jsp).

Debido a la nueva clasificación taxonómica del género *Lactobacillus*, la identidad de las cepas se corroboró en la base de datos RDP (Ribosomal Database Project), cuyos resultados se encuentran en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Clasificación de secuencias de *Ligilactobacillus* (RDP Naive Bayesian rRNA versión 2.11)

Cepa	Detalle de asignación (para raíz con umbral de confianza del 95%)
A1	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
A2	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
B1	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
C1	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
D1	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
E1	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
E2	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
E3	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
E4	Bacteria [100%] Firmicutes [94%] Bacilli [92%] Lactobacillales [81%] Streptococcaceae [80%] *Streptococcus* [80%]
E5	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
F1	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
F2	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
F3	Bacteria [100%] Firmicutes [98%] Bacilli [97%] Lactobacillales [97%] Lactobacillaceae [97%] *Ligilactobacillus* [97%]
G1	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
H1	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
H2	Bacteria [100%] Firmicutes [96%] Bacilli [92%] Lactobacillales [91%] Lactobacillaceae [91%] *Ligilactobacillus* [91%]
H3	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]
I1	Bacteria [100%] Firmicutes [100%] Bacilli [100%] Lactobacillales [100%] Lactobacillaceae [100%] *Ligilactobacillus* [100%]

3.2.3. Alineamiento de las secuencias en el programa BLAST del NCBI

Después de editar las regiones parciales del gen 16S rRNA obtenidas por secuenciación, en el software BioEdit 7.2 y su alineamiento en el programa BLAST del NCBI, 14 cepas aisladas fueron identificadas como *Ligilactobacillus murinus*, de las cuales, la cepa D1, E2 y G1 obtuvieron porcentajes de identidad del 100%, mientras que 13 más compartieron porcentajes de similitud entre 97.89% y 99.51%. La cepa H2 se identificó como *Ligilactobacillus animalis* (95.10%) y E4 como *Streptococcus salivarius* (97.54%) (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Identificación molecular (BLAST-NCBI) de cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón

Cepa	Descripción	Query Cover	E value	Per Ident	GenBank Acceso
A1	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	98%	3e-98	99.51%	MT585453.1
A2	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	98%	4e-97	99.02%	MT585453.1
B1	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	8e-99	99.51%	MT585453.1
C1	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	8e-99	99.51%	MT585453.1
D1	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	2e-100	100%	MT585453.1
E1	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	2e-99	99.51%	MT585453.1
E2	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	5e-101	100%	MT585453.1
E3	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	8e-99	99.51%	MT585453.1
E4	*Streptococcus salivarius* strain1957 16S rRNA gene	99%	1e-91	97.54%	MT597770.1
E5	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	2e-94	98.07%	MT585453.1
F1	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	100%	8e-99	99.51%	MT585453.1
F2	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	1e-96	99.02%	MT585453.1
F3	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	94%	6E-85	97.89%	MT585453.1
G1	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	100%	8e-99	100%	MT585453.1
H1	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	3E-98	99.51%	MT585453.1
H2	*Ligilactobacillus animalis* strain 8372 16S rRNA gene	99%	4e-82	95.10%	MT5389999.1
H3	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	98%	3e-98	99.51%	MT585453.1
I1	*Ligilactobacillus murinus* strain 700 16S rRNA gene	99%	4e-97	99.02%	MT585453.1

3.2.4. Registro de secuencias en GenBank

Las secuencias de *Ligilactobacillus murinus* fueron depositadas en GenBank bajo los números de acceso: LGM A1 (OK668196); LGM A2 (OK668197); LGM B1 (OK668198); LGM C1 (OK668199); LGM D1 (OK668200); LGM E1 (OK668201); LGM E2 (OK668202); LGM E3 (OK668203); LGM E5 (OK668204); LGM F1 (OK668205); LGM F2 (OK668206); LGM F3 (OK668207); LGM G1 (OK668208); LGM H1 (OK668209); LGM H3 (OK668210) and LGM I1 (OK668211).

3.2.5. Matriz de porcentajes de identidad

La matriz de identidad es un resultado directo de la observación de un alineamiento de secuencias cuantificado en porcentajes, el cual permite establecer la similitud de las secuencias evaluadas (Ptaszyńska *et al*. 2012). Los resultados de la matriz de identidad de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las 18 cepas de BL (**Cuadro 8**), establecieron altos rangos de similitud del 93% al 100% entre las cepas de *L. murinus*.

Cuadro 8. Matriz de identidad, valores de similitud calculados de la región variable V2 del gen 16S rRNA de cada cepa aislada. Números de ID expresados en porcentaje

	H2	**E4**	**700**	**I1**	**H3**	**H1**	**G1**	**F3**	**F2**	**F1**	**E5**	**E3**	**E2**	**E1**	**D1**	**C1**	**B1**	**A2**	**A1**
OK668196 LGM A1	89.8	71.4	96.0	96.0	99.0	97.5	94.2	94.0	98.0	97.0	93.2	97.0	96.5	97.5	96.5	97.5	97.0	97.5	ID
OK668197 LGM A2	87.9	71.0	94.6	94.6	97.0	96.0	92.7	93.5	96.0	96.5	93.1	95.1	96.0	96.0	96.0	96.0	96.5	ID	
OK668198 LGM B1	89.8	72.4	96.5	96.5	97.5	98.0	94.6	92.1	97.5	98.5	92.2	97.0	99.5	98.0	99.5	98.0	ID		
OK668199 LGM C1	90.7	72.0	98.0	98.0	97.5	98.0	96.0	92.1	97.5	98.5	92.7	99.0	97.5	**100.0**	97.5	ID			
OK668200 LGM D1	89.8	72.4	96.5	96.0	97.0	98.5	94.6	91.6	97.0	99.0	92.2	96.5	**100.0**	97.5	ID				
OK668201 LGM E1	90.7	72.0	98.0	98.0	97.5	98.0	96.0	92.1	97.5	98.5	92.7	99.0	97.5	ID					
OK668202 LGM E2	89.8	72.4	96.5	96.0	97.0	98.5	94.6	91.6	97.0	99.0	92.2	96.5	ID						
OK668203 LGM E3	91.2	71.2	99.0	99.0	97.0	97.5	97.0	91.7	97.0	97.5	92.2	ID							
OK668204 LGM E5	86.6	68.9	93.2	92.2	94.1	93.6	91.3	90.2	93.2	93.1	ID								
OK668205 LGM F1	90.2	72.4	97.5	97.0	97.5	99.5	95.6	92.1	97.5	ID									
OK668206 LGM F2	90.7	71.9	97.0	98.0	99.0	98.0	95.1	93.6	ID										
OK668207 LGM F3	87.8	69.6	91.7	91.7	94.5	92.6	89.9	ID											
OK668208 LGM G1	91.2	70.3	98.0	97.0	95.1	95.6	ID												
OK668209 LGM H1	90.7	71.9	97.5	97.0	98.0	ID													
OK668210 LGM H3	90.7	71.9	97.0	97.0	ID														
OK668211 LGM I1	91.2	71.2	99.0	ID															
MT585453 Lm 700	92.1	72.0	ID																
S. salivarius E4	67.4	ID																	
L. animalis H2	ID																		

3.2.6. Árbol filogenético

El árbol construido con el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes Cantor, indica que las cepas con secuencias similares se agrupan en el mismo nivel de ramas (Bos y Posada, 2005). En particular, *L. murinus* E3 e I1 aisladas en este trabajo se agruparon en el mismo clado que las cepas de *L. murinus* DSM 100193, TCD6, NM28 y V10 (aisladas de ratón), *L. animalis* P38 y FR12 (aisladas de pollo) y *L. animalis* JCM8692 (aislada de cerdo) encontradas en el GenBank. Por otra parte, las cepas de *L. murinus* restantes y *L. animalis* H2 aisladas en este estudio, fueron ubicadas en distintos clados (**Figura 13**).

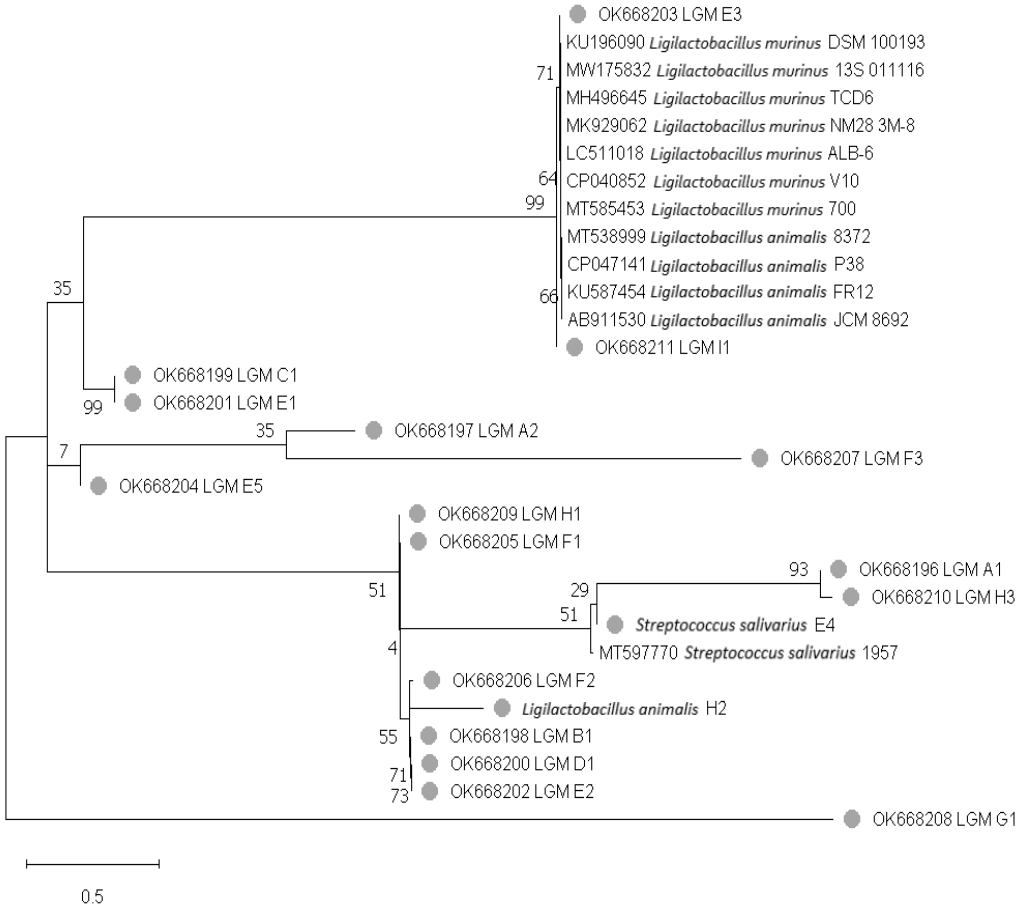


Figura 13. Árbol filogenético construido por el método de Máxima Verosimilitud de las 18 cepas aisladas de tracto intestinal

Secuencias de la región variable V2 del gen 16S rRNA de cada cepa de LB aisladas de tracto intestinal de ratón (●), en comparación con las cepas encontradas en GenBank. Los números expresados en porcentaje antes de cada clado, muestran los niveles de confianza generados a partir de 1000 bootstrap. Distancia evolutiva con longitud de escala de 0.5 utilizada para inferir el árbol

3.3. Identificación de los fenómenos de antagonismo de las 18 cepas de BL aisladas frente a patógenos de interés clínico y zoonótico (*Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Campylobacter jejuni* y *E. coli* REPEC O103)

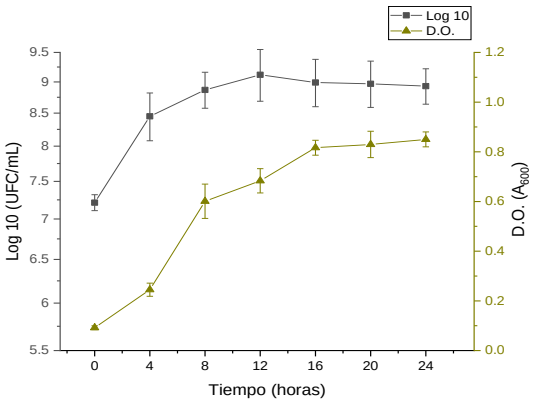
En general, las BL tienen la capacidad de sintetizar compuestos con actividad antimicrobiana como parte de un mecanismo de defensa y de competencia entre otros microorganismos. De acuerdo con los criterios para establecer el potencial probiótico de las cepas aisladas, se debe probar su potencial antagónico frente a microorganismos patógenos, así como identificar los compuestos antimicrobianos responsables de la inhibición (FAO-OMS 2002). Para cubrir este objetivo se realizaron ensayos cualitativos de difusión en agar para evaluar las células y ensayos de SDS-PAGE y Zimografía de actividad *in situ* utilizando los sobrenadantes de cultivo de las 18 cepas de BL aisladas.

3.3.1. Construcción de cinéticas de crecimiento de las 18 cepas de BL aisladas

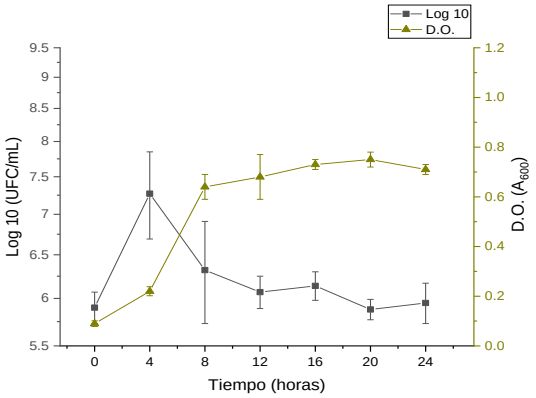
Estudiar el comportamiento cinético es importante, ya que de el depende el conocimiento de la formación de biomasa, o la producción de algún metabolito de interés durante el transcurso del tiempo del mismo cultivo (Gallegos *et al*. 2014).

En las cinéticas de crecimiento obtenidas se pueden observar dos fases; la fase logarítmica, la cual se extiende entre las primeras 4 u 8 h para todas las cepas, con un aumento entre 1.5 y 2 log (UFC mL^{-1}) y con DO de 0.6-0.8 para las 16 cepas de *L. murinus*, 0.5 para *S. salivarius* E4 y 1.0 para *L. animalis* H2, seguida de una fase estacionaria, la cual se mantuvo hasta las 24 h (**Figura 14**). De acuerdo con el análisis estadístico puede observarse diferencias de crecimiento entre las cepas asiladas. Las cepas con mayores conteos en log 10 (UFC mL^{-1}) a las 24 h de cultivo fueron *L. animalis* H2 (9.38), *S. salivarius* E4 (8.38) y *L. murinus* F2, A1, C1, G1 (9.2, 8.92, 8.26, 8.25) respectivamente con diferencias significativas ($p<0.05$) entre ellas (**Figura 15**).

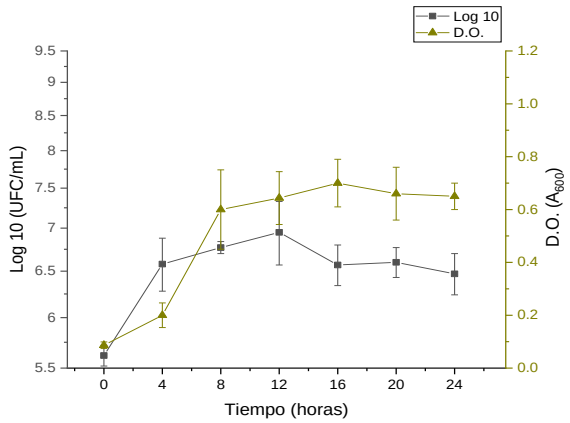
1. *L. murinus* A1



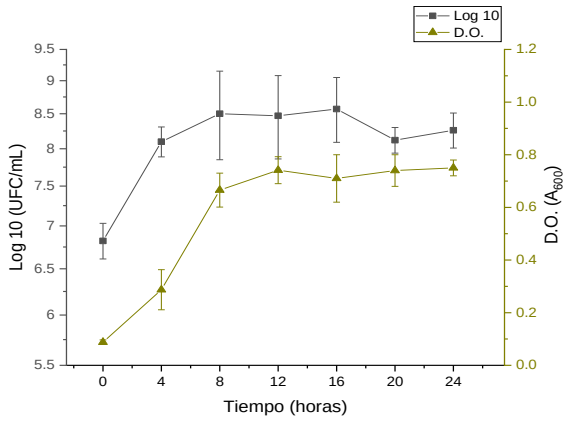
2. *L. murinus* A2



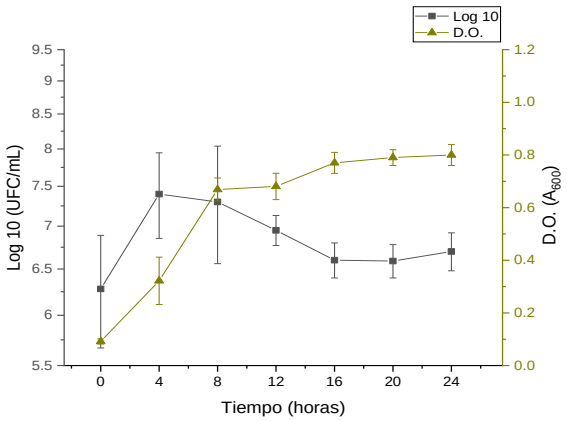
3. *L. murinus* B1



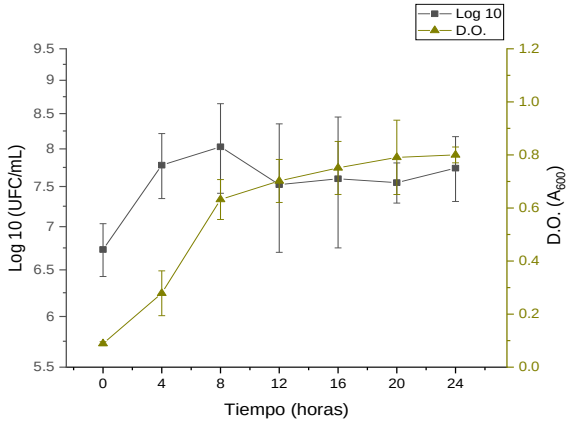
4. *L. murinus* C1



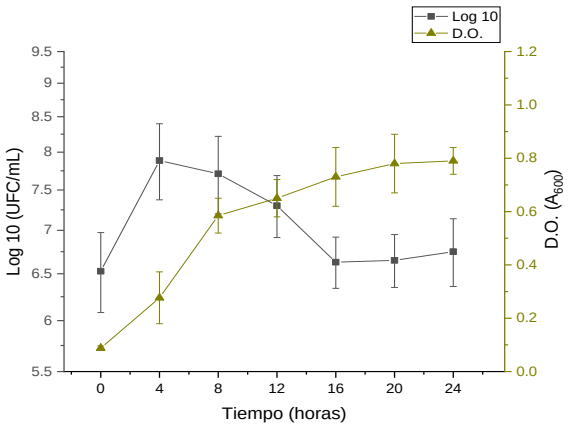
5. *L. murinus* D1



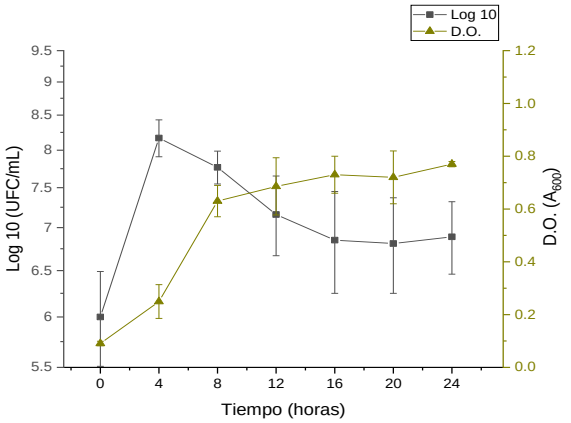
6. *L. murinus* E1



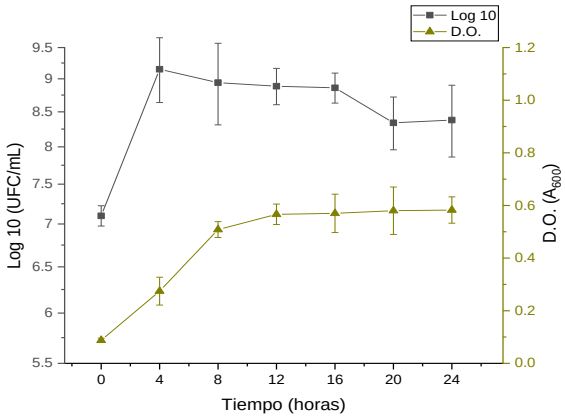
7. *L. murinus* E2



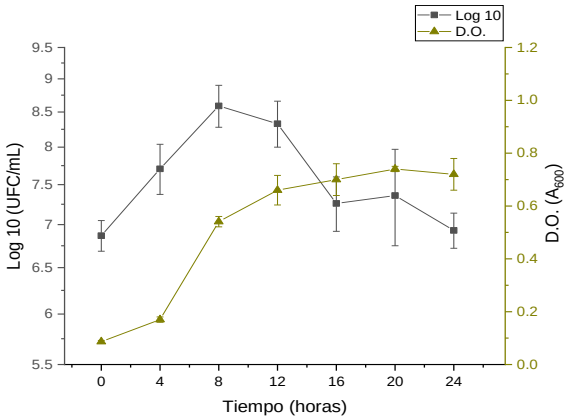
8. *L. murinus* E3



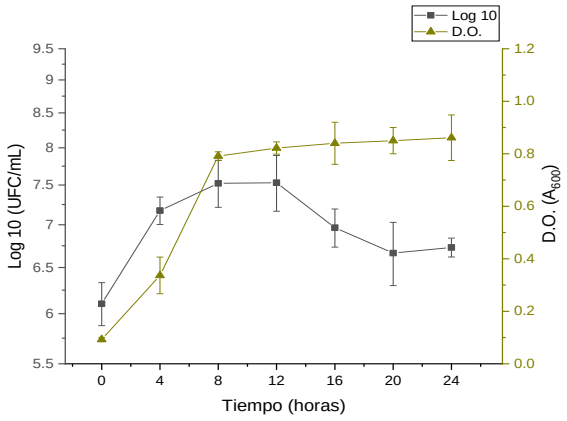
9. *S. salivarius* E4



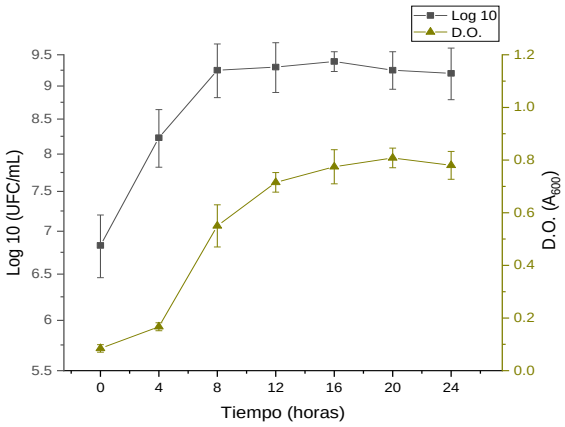
10. *L. murinus* E5



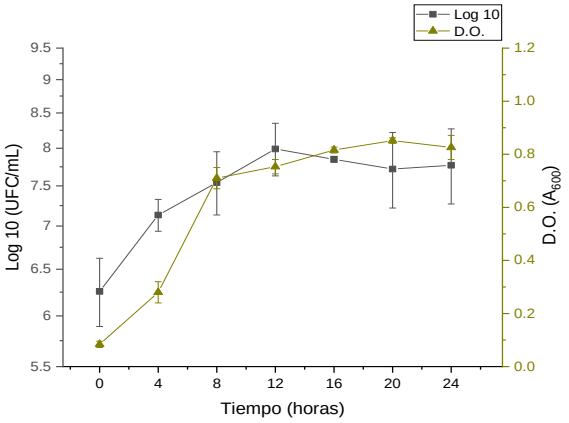
11. *L. murinus* F1



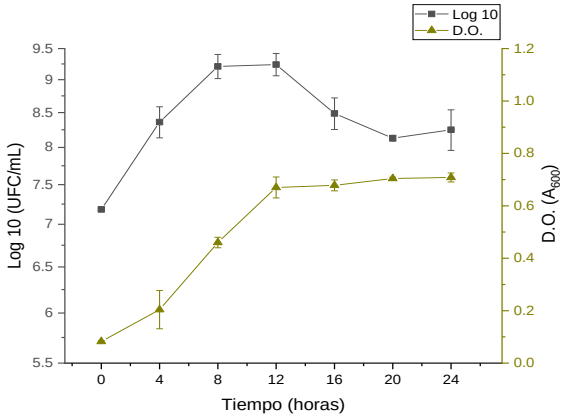
12. *L. murinus* F2



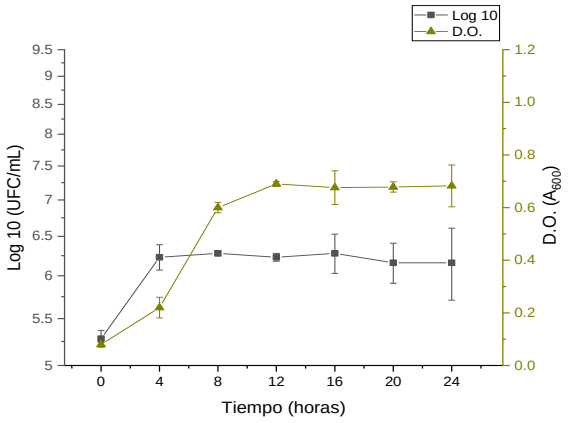
13. *L. murinus* F3



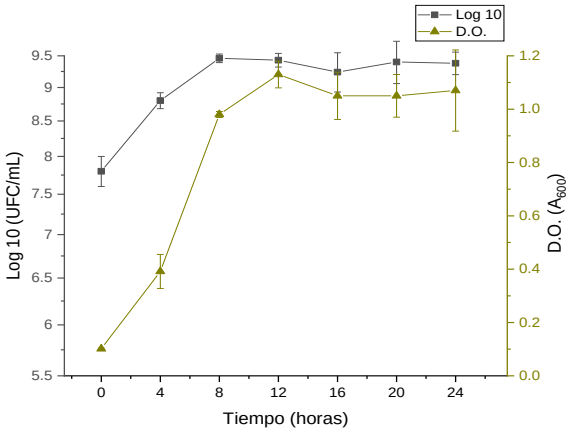
14. *L. murinus* G1



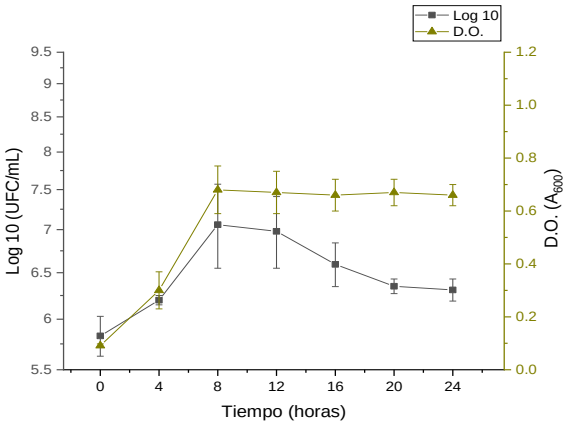
15. *L. murinus* H1



16. *L. animalis* H2



17. *L. murinus* H3



18. *L. murinus* I1

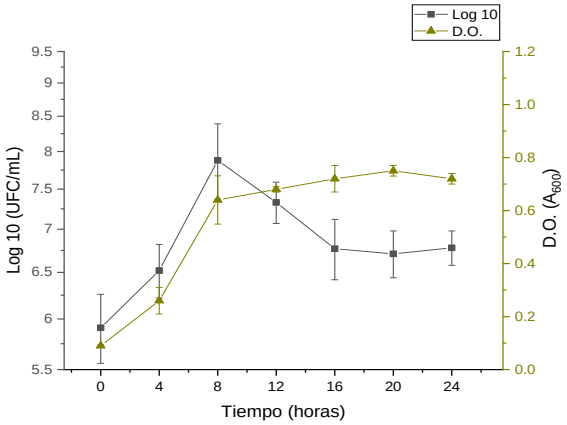


Figura 14. Cinéticas de crecimiento de 18 cepas de BL

Incubadas en medio MRS a 37º±2ºC con DO_{600nm} = 0.1 inicial en cada ensayo. Datos expresados en medias y desviación estándar de Log 10 (UFC mL^{-1}) y DO_{600nm}

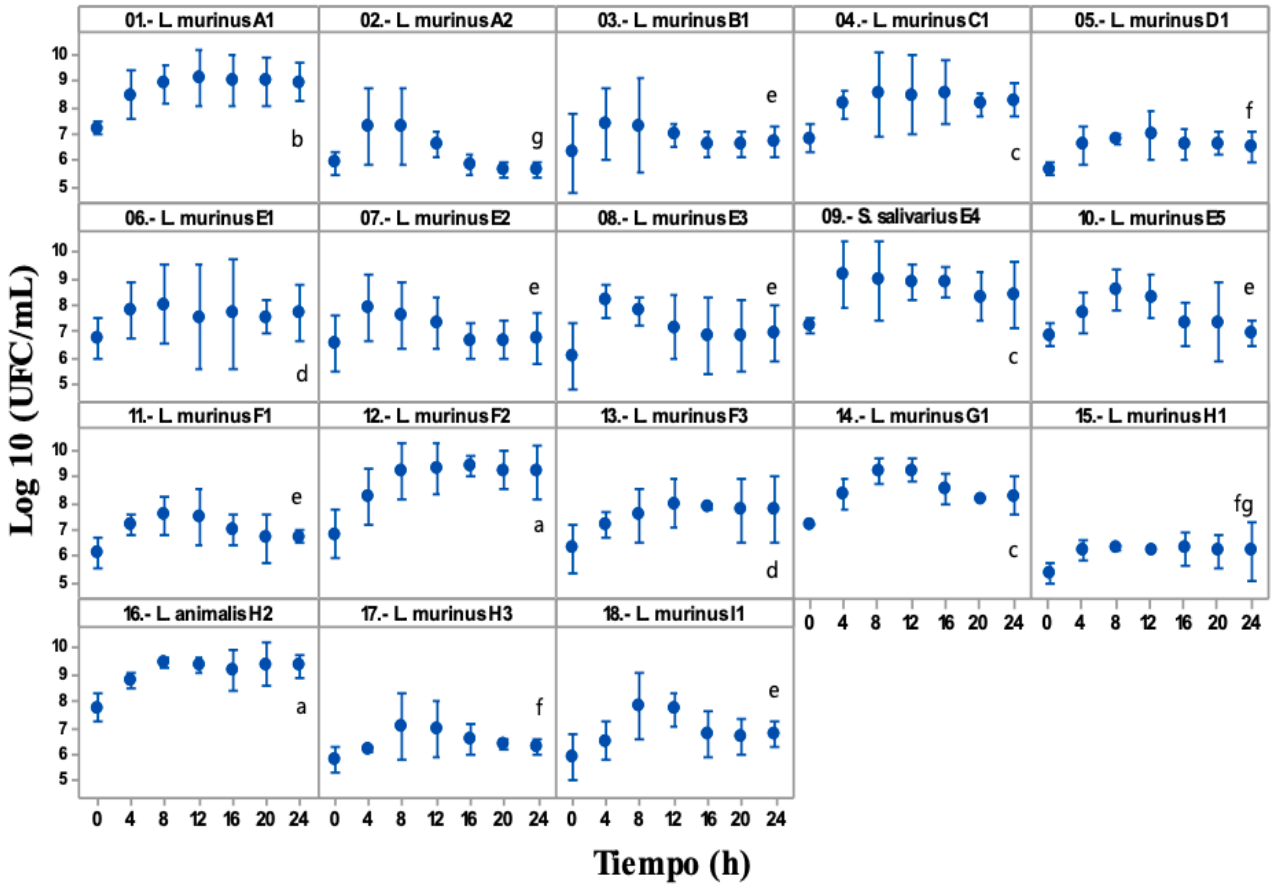


Figura 15. Análisis estadístico de cinéticas de crecimiento de las 18 cepas de BL aisladas

Incubadas en medio MRS a 37º±2ºC con DO_{600nm} = 0.1 inicial en cada ensayo. Datos expresados en Log 10 (UFC mL^{-1}). Las diferencias estadísticas al final del ensayo (24 h) se indican con letras diferentes

3.3.2. Parámetros cinéticos bacterianos

Los parámetros de crecimiento bacteriano para cada cepa (**Cuadro 9**) se calcularon usando las UFC mL^{-1} en fase logarítmica, de acuerdo con los resultados de las cinéticas de crecimiento construidas. *L. murinus* E3 y *S. salivarius* E4 mostraron los valores de μ (tasa específica de crecimiento) más altos alto (1.25 ± 0.27 y 1.13 ± 0.18 h^{-1}) respectivamente, por otro lado, *L. murinus* D1, E5, H1 y H3 se agruparon con los valores más pequeños con intervalos entre 0.39 y 0.51 h^{-1}. En cuanto a τ (tiempo de duplicación), *L. murinus* H3 tuvo más alto (2.12 ± 0.36 h) y los valores mas bajos se observaron para *L. murinus* A1, A2, E3 y *S. salivarius* E4 con intervalos entre 0.59 y 0.84 h), lo que significa que *L. murinus* E3 y *S. salivarius* E4 requirieron menos tiempo para la división celular.

Cuadro 9. Parámetros cinéticos de las cepas de BL. Datos expresados como media ± desviación estándar. [abc] muestran diferencia significativa ($p<0.05$)

Cepa BL	Tasa de crecimiento específica (μ) h^{-1}	Tiempo de duplicación (τ) h
1. *L. murinus* A1	0.82 ± 0.04 [cd]	0.84 ± 0.04 [cd]
2. *L. murinus* A2	0.91 ± 0.11 [bc]	0.77 ± 0.06 [cd]
3. *L. murinus* B1	0.60 ± 0.02 [def]	1.11 ± 0.15 [bcd]
4. *L. murinus* C1	0.74 ± 0.03 [cde]	0.94 ± 0.04 [bcd]
5. L. murinus D1	0.51 ± 0.06 [ef]	1.43 ± 0.32 [b]
6. *L. murinus* E1	0.56 ± 0.09 [def]	1.19 ± 0.18 [bc]
7. *L. murinus* E2	0.78 ± 0.04 [cde]	0.88 ± 0.05 [bcd]
8. *L. murinus* E3	1.25 ± 0.27 [a]	0.59 ± 0.14 [d]
9. *S. salivarius* E4	1.13 ± 0.18 [ab]	0.62 ± 0.13 [d]
10. *L. murinus* E5	0.50 ± 0.06 [abc]	1.26 ± 0.23 [bc]
11. *L. murinus* F1	0.60 ± 0.04 [def]	1.15 ± 0.09 [ab]
12. *L. murinus* F2	0.79 ± 0.01 [cde]	0.91 ± 0.06 [bcd]
13. *L. murinus* F3	0.54 ± 0.06 [def]	1.41 ± 0.14 [b]
14. *L. murinus* G1	0.72 ± 0.02 [cde]	0.93 ± 0.06 [bcd]
15. *L. murinus* H1	0.50 ± 0.06 [ef]	1.43 ± 0.26 [b]
16. *L. animalis* H2	0.54 ± 0.04 [def]	1.28 ± 0.18 [bc]
17. *L. murinus* H3	0.39 ± 0.05 [f]	2.12 ± 0.36 [a]
18. *L. murinus* I1	0.56 ± 0.06 [def]	1.29 ± 0.28 [bc]

3.3.3. Actividad antagónica de las células de BL mediante ensayos de difusión en agar

La actividad antagónica de cada cepa de BL aislada se observó al utilizar inóculos de 5μL de células (correspondientes a 7-9 log UFC mL^{-1}) frente a cada microorganismo de prueba. En el caso de *L. monocytogenes* ATCC 15313 se observaron halos de inhibición de 13 a 15 mm de diámetro en promedio, destacando la actividad de *L. animalis* H2 con diámetros de inhibición de 17 mm ($p<0.5$) y *L. murinus* A1, A2, B1, C1, E2, F1 y F3 con halos de 15 mm. Cuando se utilizó *S. aureus* ATCC 6538P como microorganismo de prueba, se obtuvieron halos de inhibición entre 14 y 16 mm de diámetro, sin mostrar diferencias significativas ($p<0.5$) entre las cepas.

Las cepas de BL aisladas demostraron efecto inhibitorio frente a *E. coli* REPEC O103, con mayores halos de inhibición para *L. animalis* H2 con 25 mm y *L. murinus* G1, A1 y F3 con 23 mm de diámetro. La **Figura 16** muestra las fotografías y el **Cuadro 10** los resultados de los halos de inhibición para cada desafío.

a)

b)

c)

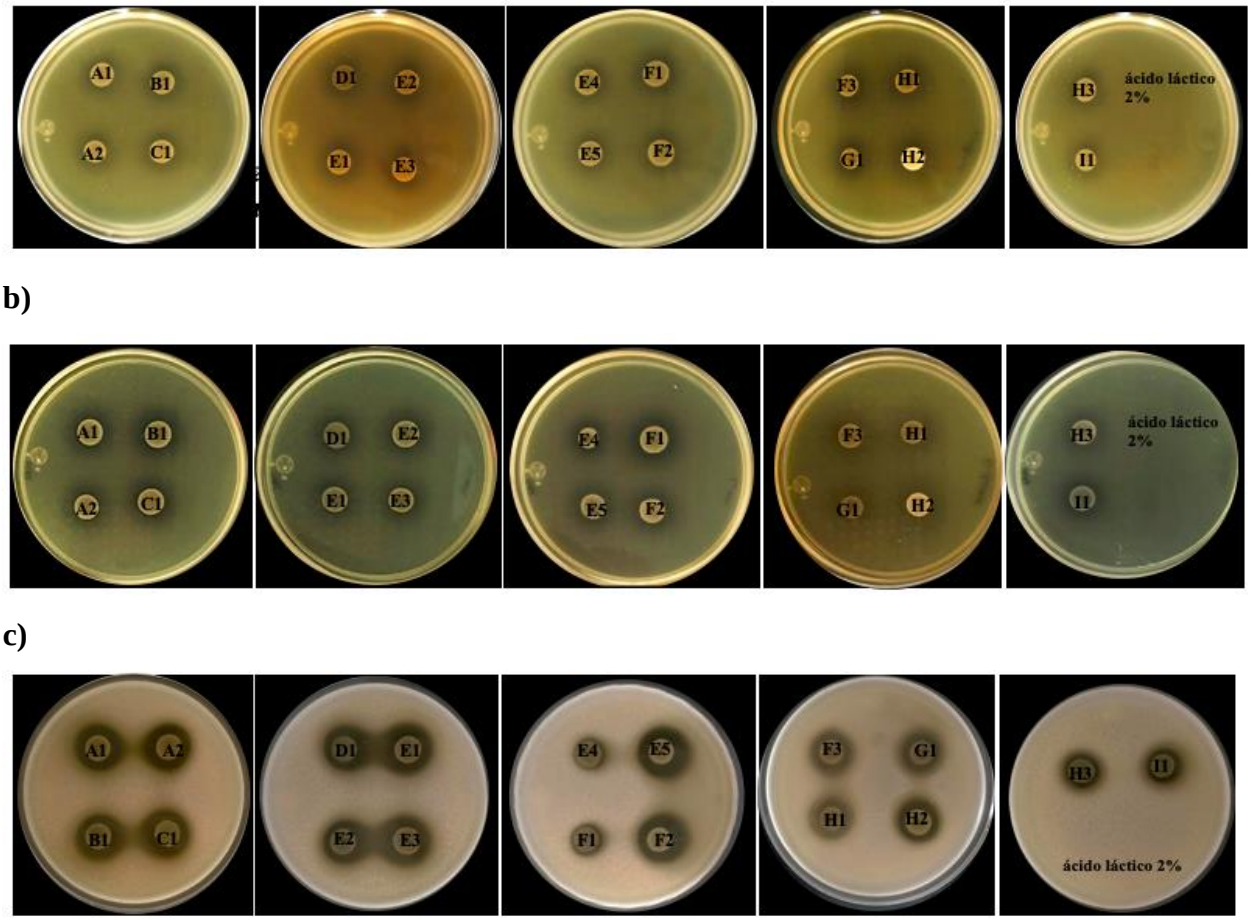


Figura 16. Ensayos de difusión en agar de las 18 cepas de BL aisladas *vs*. *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P y *E. coli* REPEC

Agar base MRS con 5 µL de cultivo de 12 h de cada BL (correspondientes a 7-9 log UFC mL^{-1}) y sobrecapa de agar blando (0.6% p/v) adicionadas con a) *L. monocytogenes*, b) *S. aureus* y c) *E. coli* REPEC. Solución de ácido láctico al 2% (v/v) como control

Es importante resaltar que en los ensayos realizados con las cepas de BL frente a *C. jejuni* ATCC 49943, se observó un importante efecto inhibitorio y para poder medir el halo de inhibición en las pruebas de difusión en agar fue necesario probar cada cepa de BL por caja de agar (**Figura 17**), como resultado se obtuvieron halos de inhibición entre 36 y 44 mm de diámetro, resaltando la actividad de *L. animalis* H3 con diámetros de inhibición de 44 mm. En este ensayo, la ausencia de halos inhibitorios en el tratamiento control con ácido láctico al 2% (v/v), confirmaron la resistencia a condiciones ácidas de los microorganismos de prueba.

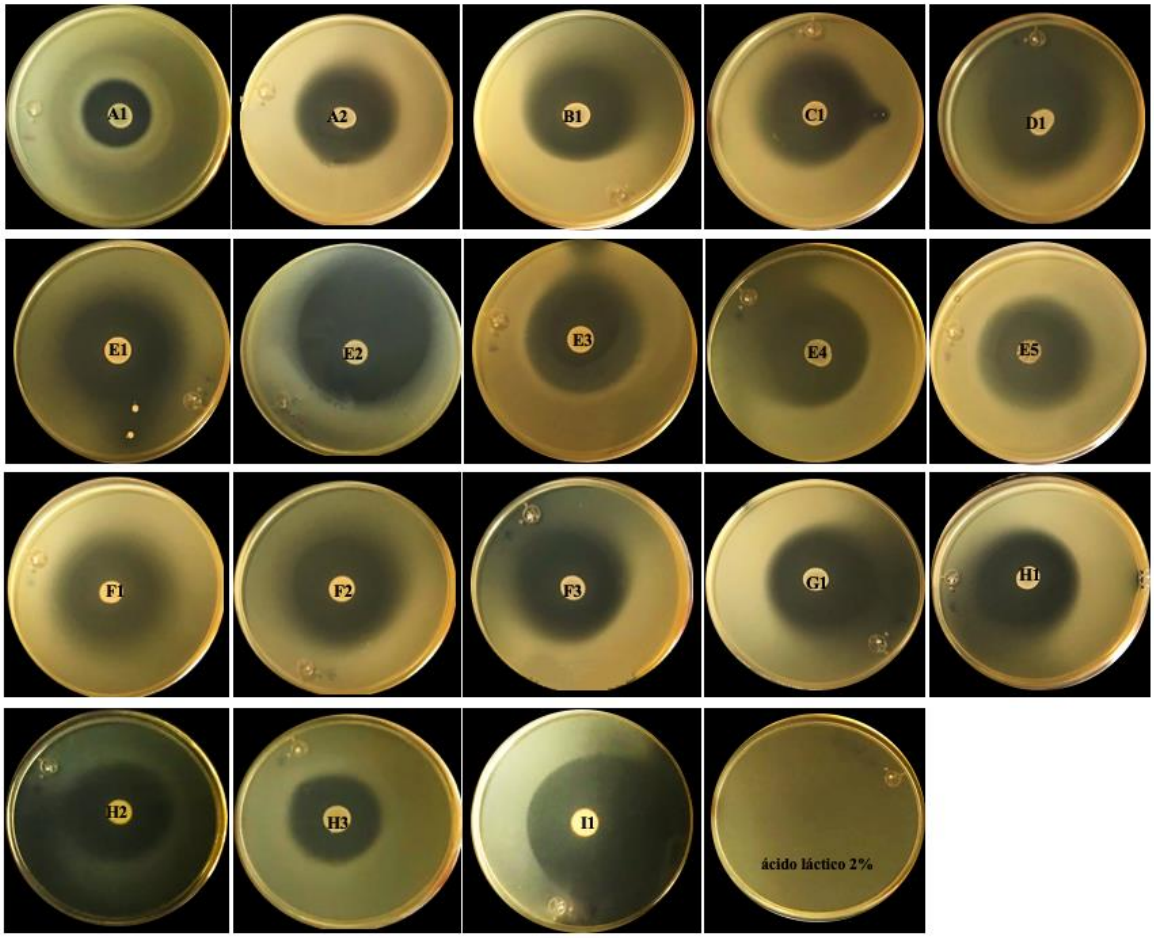


Figura 17. Ensayo de difusión en agar de las 18 cepas de BL aisladas *vs. Campylobacter jejuni* ATCC 49943

Agar base MRS con 5 µL de cultivo de cada BL (correspondientes a 7-9 log UFC mL^{-1}) y sobrecapa de agar blando Brucella (0.6% p/v) adicionadas con *C. jejuni*. Solución de ácido láctico 2% (v/v) como control, incubadas con el sistema de Anaerocult® C a 40±2ºC

Cuadro 10. Halos de inhibición en placa de agar (mm) de cepas de BL aisladas. Datos expresados como medias ± y desviación estándar, de 6 repeticiones. Literales diferentes en cada columna, indican diferencia estadística significativa ($p<0.05$)

	Diámetros de inhibición (mm)			
Cepas de BL	***L. monocytogenes***	***S. aureus***	***E. coli* REPEC**	***C. jejuni***
L. murinus A1	15 ± 0.5 ^{ab}	15 ± 1.5 ^{a}	21 ± 1.2 ^{abc}	36 ± 3.7 ^{b}
L. murinus A2	15 ± 0.1^{ab}	15 ± 1.5 ^{a}	19 ± 1.6 ^{bc}	42 ± 1.0 ^{ab}
L. murinus B1	15 ± 0.6 ^{ab}	15 ± 2.0 ^{a}	20 ± 1.0 ^{bc}	39 ± 2.6 ^{ab}
L. murinus C1	15 ± 0.6 ^{ab}	15 ± 2.0 ^{a}	20 ± 0.5 ^{bc}	42 ± 2.5 ^{ab}
L. murinus D1	14 ± 0.6 ^{ab}	15 ± 2.7 ^{a}	19 ± 1.5 ^{bc}	41 ± 1.1 ^{ab}
L. murinus E1	14 ± 0.6 ^{ab}	15 ± 3.2 ^{a}	19 ± 1.0 ^{c}	38 ± 2.0 ^{ab}
L. murinus E2	15 ± 1.1^{ab}	15 ± 3.2 ^{a}	19 ± 1.5 ^{c}	41 ± 2.3 ^{ab}
L. murinus E3	14 ± 1.1 ^{ab}	15 ± 3.2 ^{a}	18 ± 1.1 ^{c}	41 ± 3.7 ^{ab}
S. salivarius E4	14 ± 0.6 ^{ab}	15 ± 2.2 ^{a}	18 ± 1.1 ^{c}	38 ± 1.5 ^{ab}
L. murinus E5	14 ± 0.0 ^{ab}	14 ± 1.7 ^{a}	18 ± 1.5 ^{c}	40 ± 2.6 ^{ab}
L. murinus F1	15 ± 0.6 ^{ab}	15 ± 2.3 ^{a}	20 ± 1.8 ^{bc}	41 ± 2.0 ^{ab}
L. murinus F2	15 ± 0.6^{ab}	15 ± 1.5 ^{a}	20 ± 1.8 ^{bc}	40 ± 2.0 ^{ab}
L. murinus F3	15 ± 0.6^{ab}	15 ± 2.0 ^{a}	21 ± 0.5 ^{abc}	41 ± 2.5 ^{ab}
L. murinus G1	14 ± 1.0 ^{ab}	13 ± 2.3 ^{a}	23 ± 1.6 ^{ab}	40 ± 1.5 ^{ab}
L. murinus H1	14 ± 1.0 ^{ab}	14 ± 1.7 ^{a}	19 ± 1.1 ^{bc}	41 ± 3.2 ^{ab}
L. animalis H2	17 ± 0.6 ^{a}	16 ± 1.7 ^{a}	25 ± 1.5 ^{a}	44 ± 1.7 ^{a}
L. murinus H3	13 ± 0.0 ^{b}	14 ± 1.8 ^{a}	20 ± 1.2 ^{bc}	36 ± 2.0 ^{b}
L. murinus I1	14 ± 1.1 ^{ab}	14 ± 2.4 ^{a}	18 ± 1.1 ^{c}	36 ± 2.0 ^{b}

3.3.4. Actividad antagónica por ensayos de difusión en agar de *L. murinus* B1 frente a *E. coli* y *C. jejuni*

Al evaluar la naturaleza de inhibición en los ensayos de difusión en agar de *L. murinus* B1 frente a *E. coli* REPEC, se observaron halos de 20±01.0 mm de diámetro en las condiciones dónde se adicionaron las células viables: condición **1)** el cultivo completo (células con su sobrenadante), **2)** las células viables resuspendidas en SSF y **4)** células tratadas en solución de lisozima (2mg/ml) (**Figura 18**). En los ensayos frente a *C. jejuni*, la inhibición se presentó cuando se adicionaron las células viables con su pared celular íntegra. Por el contrario, no se observó inhibición en los sobrenadantes libres de células y en aquellos que fueron calentados

y neutralizados. La ausencia de halos inhibitorios en el tratamiento control con ácido láctico al 2% confirmó la resistencia a condiciones ácidas.

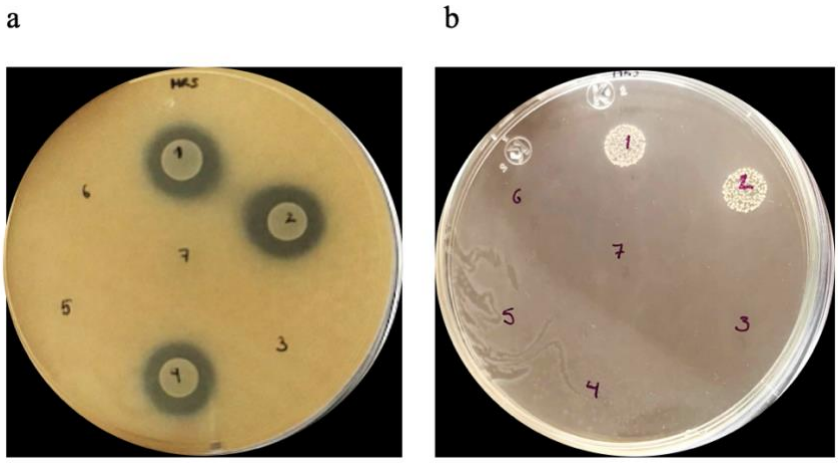


Figura 18. Ensayo de difusión en agar con diferentes condiciones de *Ligilactobacillus murinus* B1 frente **a)** *E. coli* REPEC y **b)** *Campylobacter jejuni*.

1) Cultivo completo de 12 h en medio MRS, **2)** células viables y lavadas con solución fisiológica, **3)** células no viables, calentadas a 95ºC durante 15 min, **4)** células tratadas en solución de lisozima 2 mg/mL a 37ºC durante 2 h, **5)** sobrenadante libre de células, **6)** sobrenadante neutralizado a pH 7 y calentado a 97ºC durente 5 min, **7)** ácido láctico al 2% como control

3.3.5. Actividad bacteriolítica de los sobrenadantes

Las BL tienen la capacidad de producir enzimas proteolíticas, las cuales son sintetizadas dentro de las células bacterianas y en su mayoría, son secretadas al medio de cultivo. Se ha descrito que la producción de enzimas proteolíticas son un factor protector ante microorganismos desfavorables, las cuales pueden considerarse un agente antimicrobiano (Kieliszek *et al.* 2021), sin embargo, estas proteínas son producidas en bajas concentraciones, por lo que no siempre pueden ser detectadas. Con el objetivo de conocer la capacidad de las 18 cepas de BL aisladas, de producir compuestos de naturaleza proteica con actividad bacteriolítica sobre los microorganismos de prueba, se evaluaron sus sobrenadantes de cultivo libres de células.

3.3.6. Cuantificación de proteínas en fase logarítmica de las 18 cepas de BL aisladas

Se realizó la cuantificación de las proteínas de 1 mL de sobrenadante precipitado de cada BL. El análisis de varianza mostró que la concentración de proteínas (**0.48-0.63 µg/µL**) es menor ($p<0.05$) para las cepas de *L. murinus* A2, D1, E1 y E2, mientras que en el resto de las cepas y el MRS (utilizado como control) obtuvieron valores de **0.78-1.04 µg/µL** (**Cuadro 11**).

Cuadro 11. Concentración de proteína de los sobrenadantes precipitados de cepas de BL. Datos expresados como media ± desviación estándar. ^{abcd} muestran diferencia significativa ($P <0.05$)

Cepa BL	**Concentración de proteínas (µg/µL)**
MRS	0.83 ± 0.11^{abc}
1. *L. murinus* A1	0.90 ± 0.32^{ab}
2. *L. murinus* A2	0.48 ± 0.17^{d}
3. *L. murinus* B1	0.95 ± 0.20^{a}
4. *L. murinus* C1	0.78 ± 0.08^{abc}
5. *L. murinus* D1	0.43 ± 0.13^{d}
6. *L. murinus* E1	0.56 ± 0.21^{cd}
7. *L. murinus* E2	0.63 ± 0.35^{bcd}
8. *L. murinus* E3	0.79 ± 0.20^{abc}
9. *S. salivarius* E4	1.04 ± 0.79^{a}
10. *L. murinus* E5	1.02 ± 0.47^{a}
11. *L. murinus* F1	0.85 ± 0.33^{ab}
12. *L. murinus* F2	0.89 ± 0.18^{ab}
13. *L. murinus* F3	0.81 ± 0.12^{abc}
14. *L. murinus* G1	0.79 ± 0.30^{abc}
15. *L. murinus* H1	0.79 ± 0.35^{abc}
16. *L. animalis* H2	0.81 ± 0.23^{abc}
17. *L. murinus* H3	0.79 ± 0.27^{abc}
18. *L. murinus* I1	0.98 ± 0.14^{a}

3.3.7. Análisis electroforético SDS-PAGE de las proteínas

Los geles de SDS-PAGE muestran el perfil de las proteínas obtenidas de 1 mL de sobrenadante de cultivo, obtenidos a las 4 h de incubación (fase log) de cada cepa (**Figura 19**). El análisis de los geles detectó diferencia en el número de proteínas entre cepas, observando dos proteínas en común (63±1.1 y 46±0.9 kDa) presentes en todos los sobrenadantes y en el MRS estéril utilizado como control (**Cuadro 12**). Por otro lado, se observan en común dos bandas de bajo peso molecular (40±0.7 y 25±0.3 kDa) presentes sólo en los sobrenadantes de *L. murinus*. En cuanto a las bandas de alto peso molecular (181±6.1, 167±4.1, 108±3.3, 98±3.0, 85±3.3 y 76±1.4 kDa) son visibles en la mayoría de los sobrenadantes.

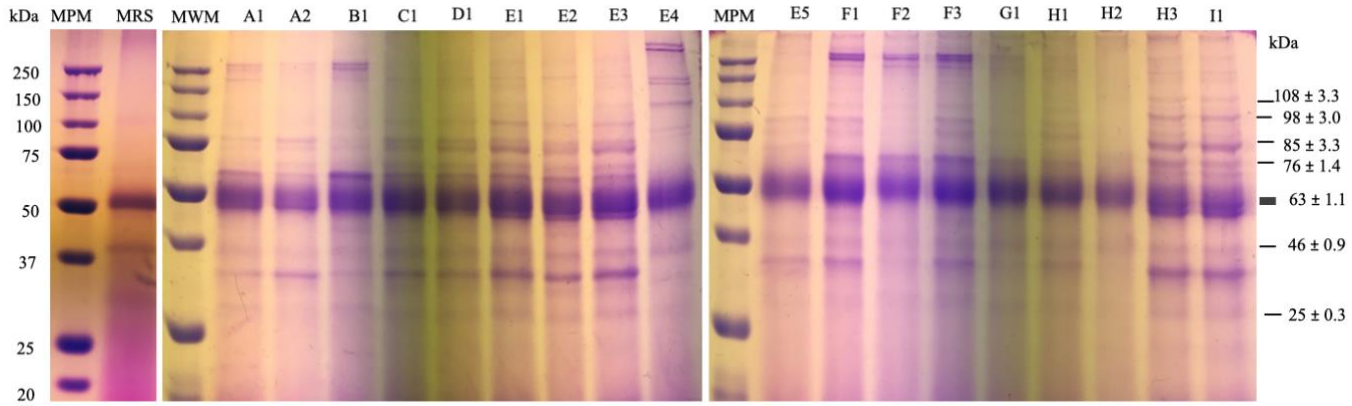


Figura 19. Proteínas presentes en los sobrenadantes (1 mL) de cultivo de 4 h de las cepas de BL aisladas

SDS-PAGE, 12%, 1 mm. MPM. Marcador de Peso Molecular (Dual precission blue Bio-Rad™, No cat. 1610373). MRS. Medio MRS estéril como control negativo

Cuadro 12. Masa molecular aparente de las bandas encontradas en los perfiles electroforéticos de las proteínas de sobrenadantes (1 mL) de cultivo de 4 h

Peso Molecular kDa	**Proteínas de sobrenadantes de 4 h de cultivo (fase logarítmica temprana)**																		
	MRS	A1	A2	B1	C1	D1	E1	E2	E3	E4	E5	F1	F2	F3	G1	H1	H2	H3	I1
194 ± 0.0										x									
181 ± 6.1		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x
167 ± 4.1		x	x	x								x	x	x					
159 ± 4.5					x	x	x	x	x			x	x	x	x	x		x	x
147 ± 0.0										x									
138 ± 0.0										x									
119 ± 0.5					x	x													
108 ± 3.3		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x
98 ± 3.0			x	x	x	x					x	x	x	x		x		x	x
85 ± 3.3			x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x
76± 1.4		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
63 ± 1.1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
56 ± 1.2				x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x
46± 0.9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
40 ± 0.7		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x
25 ± 0.3		x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x

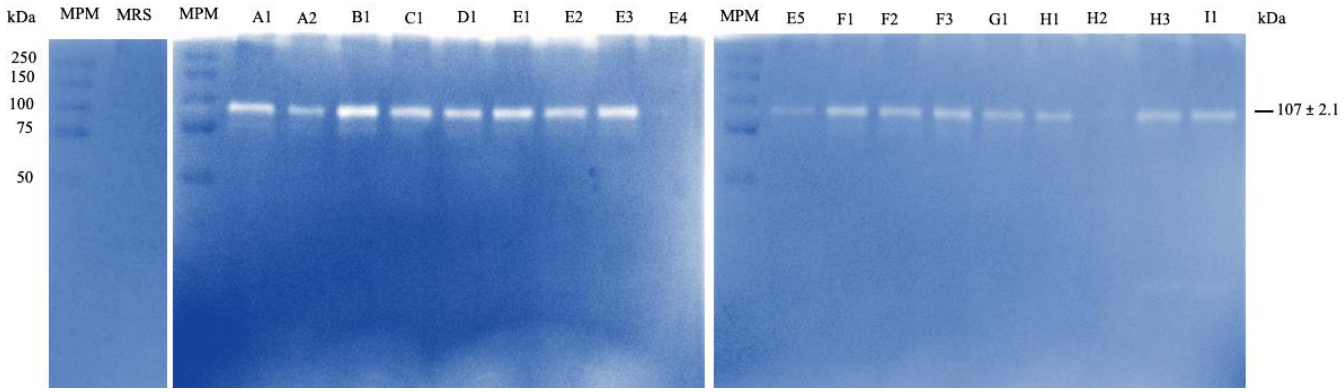
3.3.8. Zimogramas de actividad *in situ* de las 18 cepas de BL aisladas

Debido a su alto nivel de sensibilidad, las células de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 se utilizan como sustrato control de actividad de PGH, se han incorporado como sustrato en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, en varios estudios, para permitir la detección de enzimas bacteriolíticas (Leclerc y Asselin 1989; Llorente, 2018). Usando este mismo principio, se realizaron zimogramas copolimerizados con células de *M. lysodeikticus* ATCC 4698 utilizada como control positivo ó de diferentes microorganismos patógenos utilizados como microorganismos de prueba.

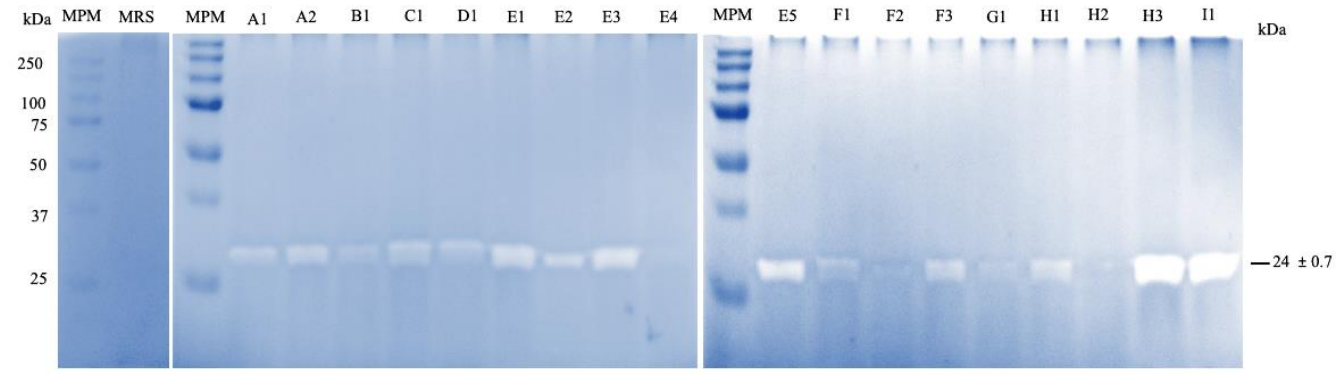
Como resultado en las pruebas zimográficas de actividad *in situ* (**Figura 20**), los geles copolimerizados con *M. lysodeikticus* y *C. jejuni* mostraron la presencia de una banda lítica de 107 kDa, detectadas en los sobrenadantes de cultivo de las 16 cepas de *L. murinus* (A1, A2, B1, C1, D1, E1, E2, E3, E5, F1, F2, F3, G1, H1, H3 e I1).

Por otro lado, en los geles copolimerizados con células de *L. monocytogenes, S. aureus* y *E. coli*, se observaron bandas líticas de 24 kDa, detectadas en los sobrenadantes de cultivo de las 16 cepas de *L. murinus*, en donde se resalta mayor actividad de las cepas de *L. murinus* H3 e I1 frente a *L. monocytogenes*, *L. murinus* E1, E2, E3 y H3 frente a *S. aureus* y *L. murinus* H1 frente a *E. coli*. Es importante resaltar que la actividad lítica no se observó en las cepas de *S. salivarius* E4 y *L. animalis* H2 y como se esperaba, tampoco en el carril donde se colocó medio MRS como control negativo.

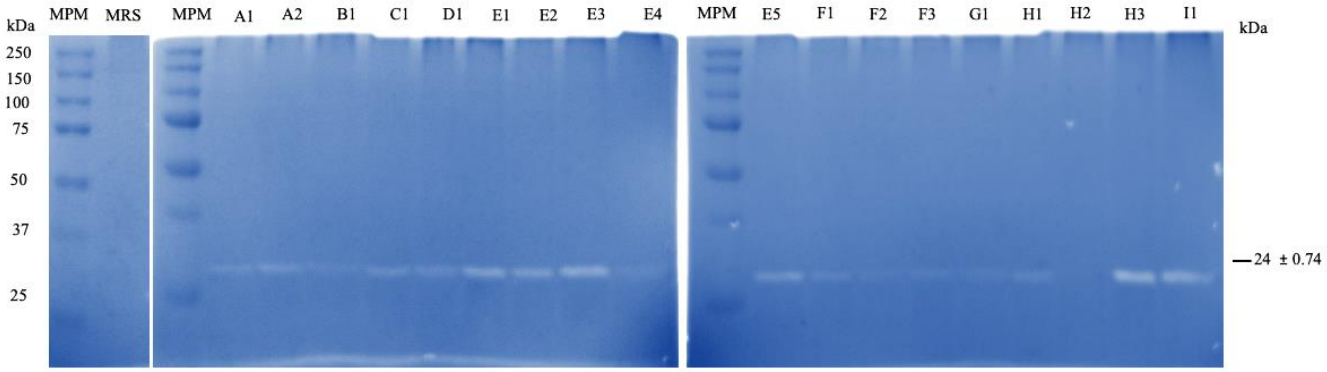
a) *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 9648



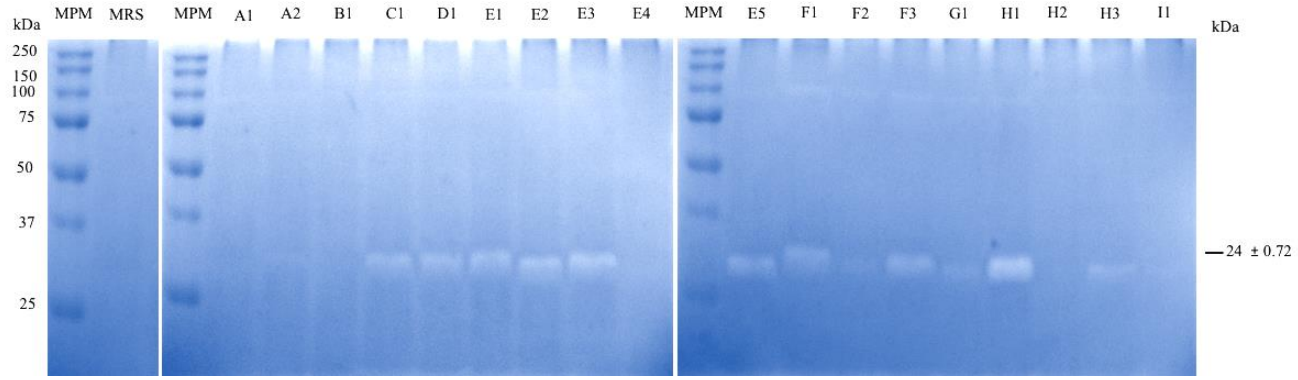
b) *Listeria monocytogenes* ATCC 15313



c) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P



d) *Escherichia coli* O103 REPEC



e) *Campylobacter jejuni* ATCC 49943

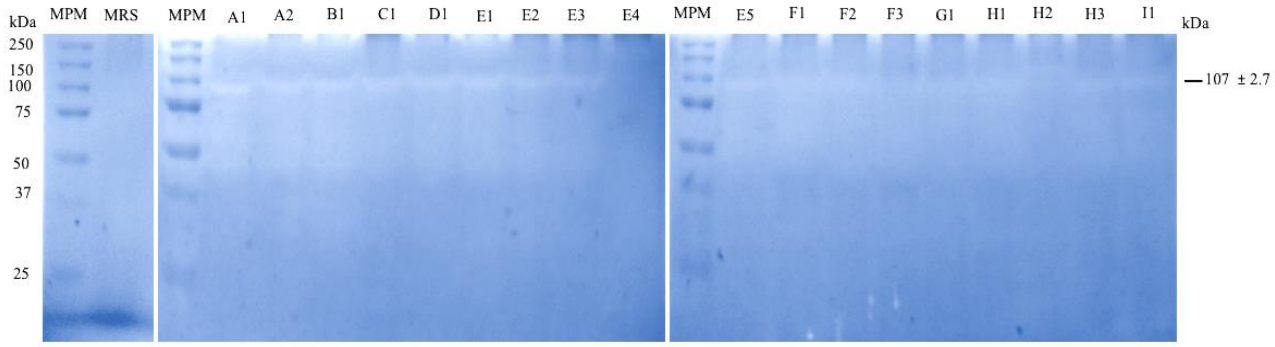


Figura 20. Zimogramas de actividad *in situ* de los sobrenadantes de cultivo de 4 h de las cepas de BL aisladas y de medio **MRS** estéril (control negativo), copolimerizados con: **a)** *Micrococcus lysodeikticus*, **b)** *Listeria monocytogenes*, **c)** *Staphylococcus aureus*, **d)** *Escherichia coli* y **e)** *Campylobacter jejuni*

SDS-PAGE de Bis/Acrilamida 12%, 1 mm, incubado por 12 h en solución amortiguadora y teñido con azul de metileno. **MPM**. Marcador de Peso Molecular (Dual precission blue Bio Rad™, No cat. 1610373). **MRS** estéril

Finalmente, en los zimogramas copolimerizados con *C. jejuni*, se observó una banda de 107 kDa (**Figura 20e**), en donde fue necesario disminuir los tiempos de renaturalización de seis a dos horas, para poder distinguir las bandas líticas. Para estos zimogramas, cuando se utilizó una solución de renaturalización elaborada con 200 mM de NaCl y 5 mM de $CaCl_2$, se observaron de forma difusa tres bandas líticas de 106, 87 y 66 kDa, además de una banda de 24 kDa en los sobrenadantes de *L. murinus* H3 e I1 (**Figura 21**).

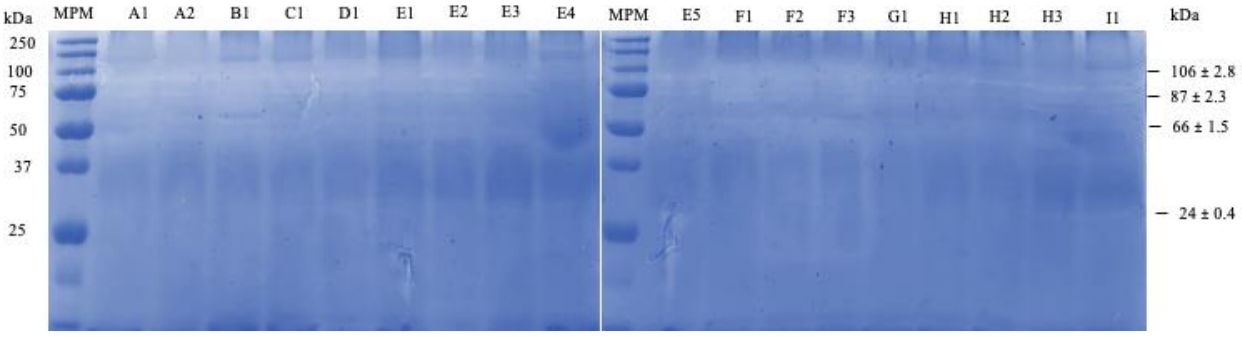


Figura 21. Zimogramas de las proteínas de los sobrenadantes de cultivo de 4 h de las cepas de BL aisladas, copolimerizados con las células de 60 mL de cultivo de *Campylobacter jejuni*

SDS-PAGE Bis/Acrilamida 12%, 1 mm, incubado por 6 h en solución amortiguadora (Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM, $CaCl_2$ 5 mM y Tritón al 1% v/v, pH 8) y teñido con azul de metileno. MPM. Marcador de Peso Molecular (Dual precission blue Bio Rad™, No cat. 1610373)

3.4. Identificación de proteínas con actividad lítica de *L. murinus* B1 mediante la técnica de huella peptídica UPLC-MS

3.4.1. Análisis de geles glicina y tricina SDS-PAGE y Zimogramas para la obtención de bandas con actividad lítica

Para obtener muestras representativas, se prepararon geles SDS-PAGE al 12% conteniendo mayor cantidad de proteínas precipitadas (15 µg/µL) de sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* B1 **(Figura 22)**. En los geles de glicina al 12% se identificaron las dos bandas líticas con masa molecular aparente de 107 y 24 kDa frente a *E. coli*, por otra parte, los geles de tricina al 16% **(Figura 22b)** permitieron corroborar la ausencia de otras bandas líticas de bajo peso molecular, además de que estos zimogramas se utilizaron para realizar la identificación de la proteína con masa molecular aparente de 24 kDa mediante UPLC-MS.

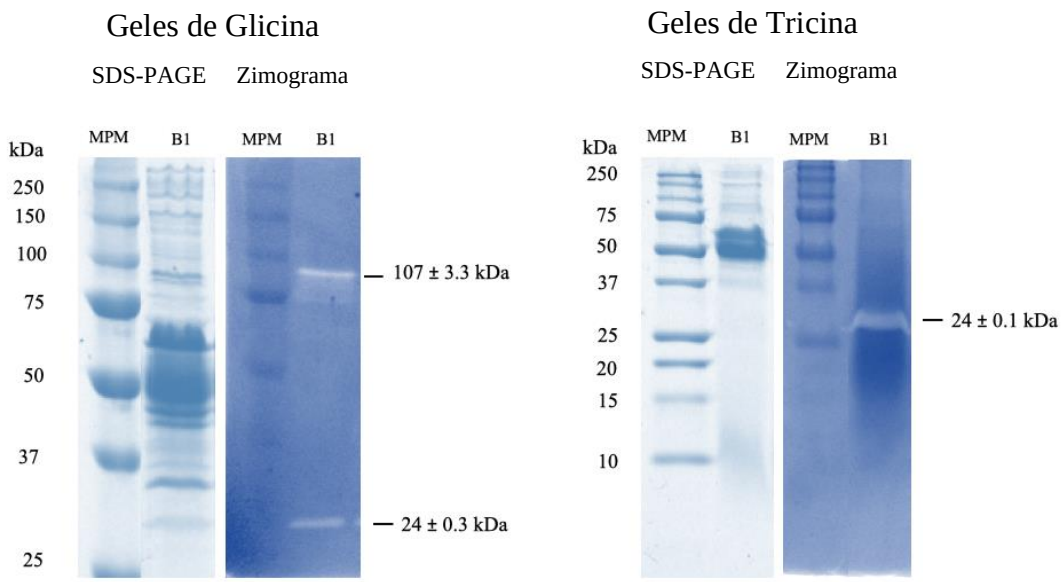


Figura 22. SDS-PAGE y zimograma de sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* B1 con *E. coli* REPEC O103 copolimerizadas

Izquierda: Geles de glicina SDS-PAGE al 12% y zimograma de sobrenadante de cultivo de *L. murinus* B1, **Derecha:** Geles de Tricina al 16% y zimograma de sobrenadante de cultivo de *L. murinus* B1, copolimerizadas con células de *E. coli* REPEC O103. MPM Marcador de Peso Molecular (Dual Precission blue Bio Rad™, No cat. 1610373).

3.4.2. Análisis por UPLC-MS

El análisis UPLC-MS confirmó la presencia de varios péptidos específicos, obtenidos de las bandas de proteína con actividad lítica (**Figura 23**). A través de la detección de 20 péptidos (**Cuadro 13**), la banda proteica con masa molecular aparente de 107 kDa se identificó como una PGH con peso molecular de 96 kDa de tipo N-acetylmuramoyl-L-alanine amidasa. Esta PGH tiene una estructura modular compuesta por un dominio catalítico formado por dos regiones 1,4-beta-N-acetylmuramoylhydrolase y un dominio de unión al peptidoglicano compuesto por nueve secuencias repetidas de aminoácidos llamados dominios LysM (lysin-like motif, por sus siglas en inglés) (Uniprot accession A0A4S2EQ32_9LACO)

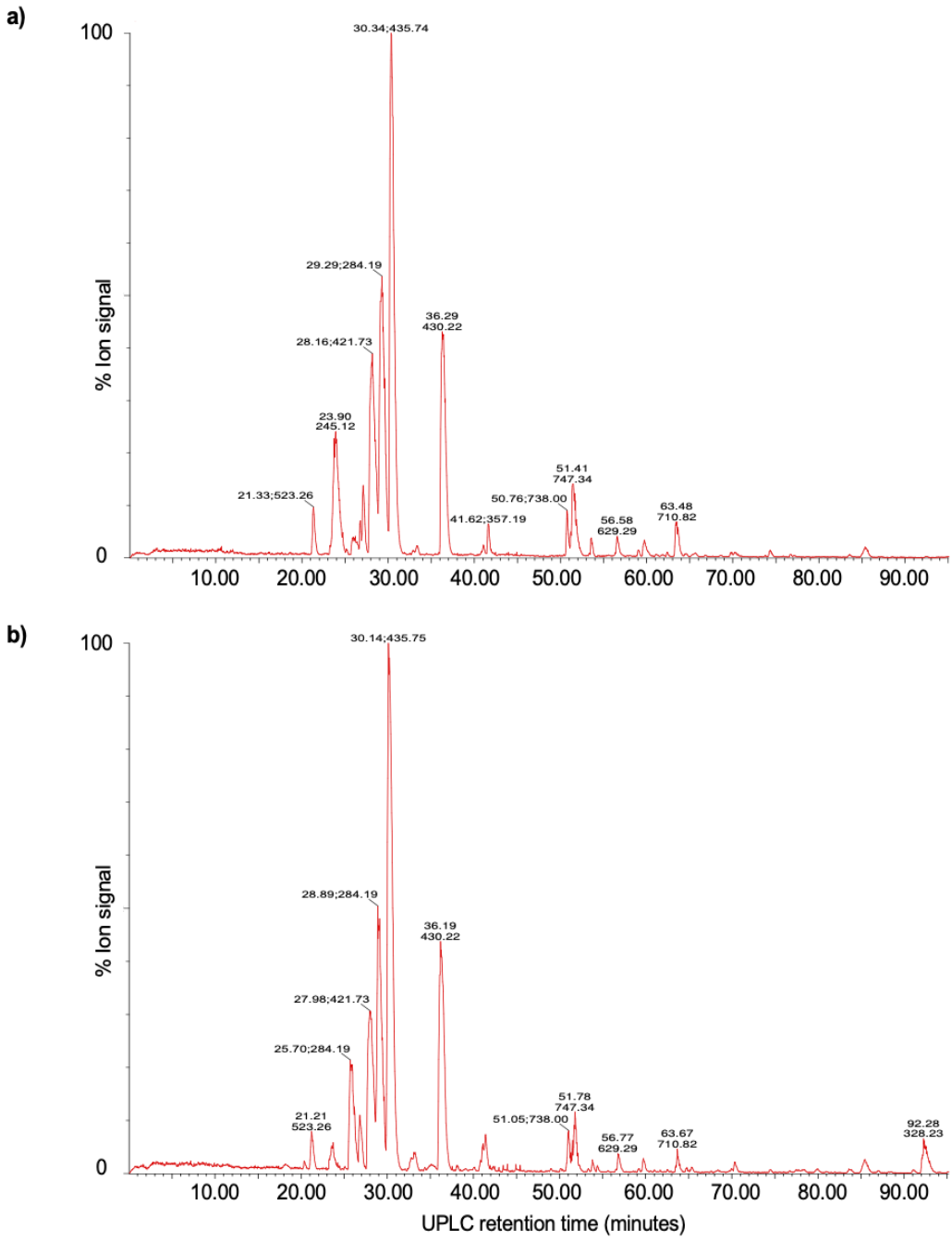


Figura 23. UPLC-MS de la actividad lítica

a) proteína con masa molecular aparente de 107 kDA y **b)** 24 kD. Masas protonadas de los compuestos detectados más destacados en los espectros

Por otra parte, se identificaron ocho péptidos mediante el análisis UPLC-MS de la banda lítica con masa molecular aparente de 24 kDa **(Cuadro 14)**. Dichos péptidos mostraron similitudes con un 12% de cobertura con un fragmento de proteína que contiene el dominio GA (proteina G relacionana a la unión de Albumina) dentro de la secuencia genómica de *L. salivarius*, la cual es identificada con función molecular aminopeptidasa (Acceso Uniprot A0A1V9RCV3_9LACO).

Cuadro 13. Péptidos identificados por UPLC-MS

Tiempo	Sc	Secuencia	Prec *m/z*	*z*	prec PM	theor PM	masaΔ
a) Peptidoglycan hydrolase OS *Ligilactobacillus murinus* OX 1622: PLGS Score 6997; coverage, 29%							
69.95	7.49	TYPGNVQTFLNNIAGPAQQVAQQR	872.44	3	2615.32	2615.32	-1.87
64.18	7.90	VNNLSSDLIYVGQTLK	882.47	2	1763.95	1763.95	-1.33
42.18	7.78	AGDSLWAIANSHK	457.23	3	1369.68	1369.68	-0.36
72.07	7.58	SLNNLNSDLIFAGQVLK	923.50	2	1846.00	1846.00	-2.75
39.78	7.99	YGVYGTYATAPDYADK	877.89	2	1754.78	1754.78	-1.11
34.11	7.58	ANSANYAIAAQNLR	738.88	2	1476.75	1476.75	-0.36
62.06	7.61	NLNNLSSNLIMPGQVLK	928.00	2	1855.00	1855.00	-1.08
62.06	7.63	NLNNLSSNLIMPGQVLK	928.00	2	1855.00	1855.00	-1.08
28.11	7.65	AGDSLWR	402.70	2	804.39	804.39	-1.26
53.61	6.96	YSSYAESLNGYANVITTR	1004.9	2	2008.95	2008.95	-2.34
76.54	6.01	GAVTTANKPNTQSNTNK	873.46	2	1745.92	1745.92	24.50
56.39	8.52	NLNNLSSNLIMPGQVLK	936.00	2	1871.00	1871.00	-0.09
49.63	7.67	ALNNLTSDMIYVGQNLK	955.48	2	1909.96	1909.96	-1.43
69.20	0.00	VQTFLNNIAGPAQQVAQQR	689.36	3	2066.08	2066.08	3.36
28.11	0.00	DSLWR	676.34	1	676.34	676.34	-0.85
28.11	0.00	SLWR	561.31	1	561.31	561.31	0.35
42.43	0.00	AIANSHK	370.70	2	740.40	740.40	3.84
28.11	0.00	GDSLWR	733.36	1	733.36	733.36	-1.68
28.12	0.00	AGDSLWR	393.69	2	786.38	786.38	-1.73
42.19	0.00	AGDSLWAIANSHK	451.22	3	1351.67	1351.67	-2.99
b) GA domain containing protein Fragment *Ligilactobacillus salivarius* OX 1624: PLGS Score 31.20; coverage, 12%							
49.06	3.56	EPETPVNPSEPGK	690.83	2	1380.66	1380.66	2.87
53.41	3.40	EPETPVDPSEPEK	727.34	2	1453.67	1453.67	4.37
53.81	4.27	SPQELDQIFTGNNDTIDK	678.98	3	2034.94	2034.94	-6.90
48.88	3.85	EPETPVDPSESGKEPETPVDPSEPGK	684.32	4	2734.29	2734.29	14.27
49.06	3.56	EPETPVNPSEPGK	690.83	2	1380.66	1380.66	2.87
56.78	3.77	IDQMLELTVDQKDNFNK	684.34	3	2051.00	2051.00	-1.02
75.87	3.70	EIYLTGHSLGGYLAEYFAATK	768.74	3	2304.21	2304.21	25.52
51.72	3.92	ISVEFDPQYEYYKK	904.94	2	1808.87	1808.87	1.61

Sc (puntuación de péptidos), **prec m/z** (relación masa-carga del precursor, **z** (carga), **prec PM** (peso molecular del precursor), **theor PM** (peso molecular teórico). Datos procesados usando Protein Lynxs Global Selver 2.5.1TM software; Waters (PLGS)

3.5. Pruebas de sensibilidad a antibióticos mediante ensayos de difusión en agar de las 18 cepas aisladas de tracto intestinal de ratón

La selección de nuevas cepas como probióticos requiere de analizar la sensibilidad a antibióticos, este criterio es necesario para asegurar su uso y aplicaciones como adyuvante en tratamientos de infecciones gastrointestinales (FAO-OMS, 2002).

Los resultados de los ensayos de difusión en agar (**Cuadro 14**), mostraron sensibilidad variable para las cepas de *L. murinus* a nueve de los antibióticos, *L. murinus* A2, B1, E1, E2, E3 y F1 fueron sensibles a la ampicilina, cefalotina, cefotaxima, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina y tetraciclina. Las cepas de *L. murinus* A1, A2, B1, F1 e I1 mostraron sensibilidad a la gentamicina y las cepas B1, C1, D1, E3, F1, F2 y E4 mostraron sensibilidad a la penicilina. Por otra parte, todas las cepas de *L. murinus* fueron resistentes a la dicloxacilina, vancomicina y bacitracina de zinc. Además de que, *L. animalis* H2 mostró resistencia a todos los antibióticos, con excepción de la clindamicina, de acuerdo a los estándares establecidos por el CLSI (2020).

Cuadro 14. Patrón de sensibilidad o resistencia a antibióticos de las cepas de BL por ensayos de difusión en agar

	Antibiótico											
Cepa	**AM**	**CF**	**CFX**	**CPF**	**CLM**	**DC**	**E**	**GE**	**PE**	**TE**	**VA**	**A**
1. *L. murinus* A1	12(R)	20 (S)	11.3 (R)	17 (I)	22 (S)	7 (R)	24 (S)	16 (S)	7 (R)	19 (S)	0 (R)	10 (R)
2. *L. murinus* A2	15(I)	28 (S)	23 (S)	22 (S)	23 (S)	0 (R)	23 (S)	15 (S)	17 (R)	19 (S)	0 (R)	19 (I)
3. *L. murinus* B1	21(S)	24 (S)	27 (S)	21(S)	23 (S)	0 (R)	24 (S)	16 (S)	31 (S)	19 (S)	0 (R)	16 (I)
4. *L. murinus* C1	15(I)	17 (I)	15.3 (I)	21(S)	23 (S)	0 (R)	23 (S)	12 (R)	32 (S)	19 (S)	0 (R)	11 (R)
5. *L. murinus* D1	11(R)	24 (S)	23 (S)	23 (S)	23 (S)	0 (R)	21 (I)	11 (R)	32 (S)	20.5 (S)	0 (R)	10 (R)
6. *L. murinus* E1	15(I)	24 (S)	23 (S)	21 (S)	24 (S)	0 (R)	24 (S)	11 (R)	14 (R)	19 (S)	0 (R)	11 (R)
7. *L. murinus* E2	20(S)	26 (S)	25 (S)	22 (S)	25 (S)	0 (R)	23 (S)	11 (R)	21 (R)	20.3 (S)	0 (R)	10 (R)
8. *L. murinus* E3	20(S)	24 (S)	23 (S)	21 (S)	24 (S)	0 (R)	23 (S)	12 (R)	32 (S)	19 (S)	0 (R)	10 (R)
9. *S. salivarius* E4	15(I)	24 (S)	29 (S)	15 (R)	25 (S)	4 (R)	15 (I)	13 (R)	17 (R)	23.3 (S)	19 (S)	15 (I)
10. *L. murinus* E5	10(R)	22 (S)	11 (R)	19 (I)	23 (S)	0 (R)	23 (S)	10 (R)	31 (S)	20 (S)	0 (R)	11 (R)
11. *L. murinus* F1	21(S)	23 (S)	20 (I)	21 (S)	21 (S)	0 (R)	17 (I)	15 (S)	31 (S)	20 (S)	0 (R)	11 (R)
12. *L. murinus* F2	10(R)	21 (S)	0 (R)	15 (I)	24 (S)	0 (R)	23 (S)	10 (R)	31 (S)	16 (I)	0 (R)	15 (I)
13. *L. murinus* F3	10(R)	22 (S)	13 (R)	18 (I)	24 (S)	0 (R)	16 (I)	11 (R)	20 (R)	20 (S)	0 (R)	11 (R)
14. *L. murinus* G1	10(R)	7 (R)	6 (R)	18 (I)	24 (S)	0 (R)	18 (I)	10 (R)	31 (S)	14 (I)	0 (R)	11 (R)
15. *L. murinus* H1	20(S)	16 (I)	23 (S)	17 (I)	24 (S)	0 (R)	23 (S)	11 (R)	15 (R)	14 (I)	0 (R)	12 (R)
16. *L. animalis* H2	10(R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	24 (S)	0 (R)	12 (I)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
17. *L. murinus* H3	11(R)	19 (I)	20 (I)	19 (I)	24 (S)	0 (R)	19 (I)	11 (R)	20 (R)	20 (S)	0 (R)	10 (R)
18. *L. murinus* I1	11(R)	20 (S)	17 (I)	21 (S)	24 (S)	0 (R)	17 (I)	15 (S)	15 (R)	18 (I)	0 (R)	11 (R)

AM (ampicilina), **CF** (cefalotina), **CFX** (cefotaxima), **CPF** (ciprofloxacina), **CLM** (clindamicina), **DC** (dicloxacilina), **E** (eritromicina), **GE** (gentamicina), **PE** (penicilina), **TE** (tetraciclina), **VA** (vancomicina), **A** (bacitracina de zinc). **S** (sensible), **I** (intermedio), **R** (resistente).

3.6. Ensayos *in vitro* de sobrevivencia a condiciones simuladas de tracto gástrico e intestinal de *Ligilactobacillus murinus* B1

Las cepas con potencial probiótico deben ser capaces de tolerar las condiciones fisicoquímicas presentes en el tracto gastrointestinal, para lograr establecerse y poder ejercer sus efectos benéficos en el huésped (FAO-OMS, 2002). Por esta razón, se realizaron ensayos independientes con la finalidad de simular las condiciones gástricas e intestinales.

3.6.1. Sobrevivencia al pH ácido del medio gástrico

En este ensayo se determinó la sobrevivencia de *L. murinus* B1 cuando se incubó en medio gástrico simulado con pH ajustado de 2 y 4. Los resultados del análisis de varianza mostraron que, al incrementar el tiempo de exposición al medio gástrico, hay una disminución en el conteo bacteriano (**Figura 24**). Los resultados del grupo de células incubadas en pH 4 y del medio control, mostraron recuentos en aproximadamente 7 log (UFC mL^{-1}) después de 4 h de exposición, mientras que el grupo tratado a pH 2 tuvo una caída significativa de sobrevivencia luego de 2 h, no encontrando células viables a las 4 h de exposición. En cuanto a los porcentajes de sobrevivencia calculados para las células de *L. murinus* B1 incubadas en pH 2 fueron del 68% a las 2 h y 0% a las 4 h de la prueba, cuando estas fueron expuestas a pH 4, los porcentajes de sobrevivencia fueron del 90% y 82% después de 2 y 4 h respectivamente.

3.6.2. Sobrevivencia a las sales biliares del medio intestinal

El medio gástrico no es la única barrera para los microorganismos que se intenta lleguen viables al intestino donde ejercerán sus funciones probióticas, el pH alcalino y las sales biliares presentes en el contenido intestinal constituyen una segunda barrera. Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que *L. murinus* B1 tiene la capacidad de sobrevivir al ser expuesta a condiciones intestinales durante las 4 h del ensayo. El análisis de varianza de los resultados muestra diferencia significativa ($p<0.05$) entre el grupo control y los tratamientos, observando la disminución de sobrevivencia de aproximadamente 1 log (UFC mL^{-1}) a las 4 h de incubación (**Figura 24b**). Los porcentajes de sobrevivencia para la cepa incubada con sales biliares al 0.3% fueron de 13% a las 2 h y 7% a las 4 h, por otra parte, cuando la cepa se incubó en sales biliares al 0.6% la sobrevivencia fue de 25% y 5% respectivamente.

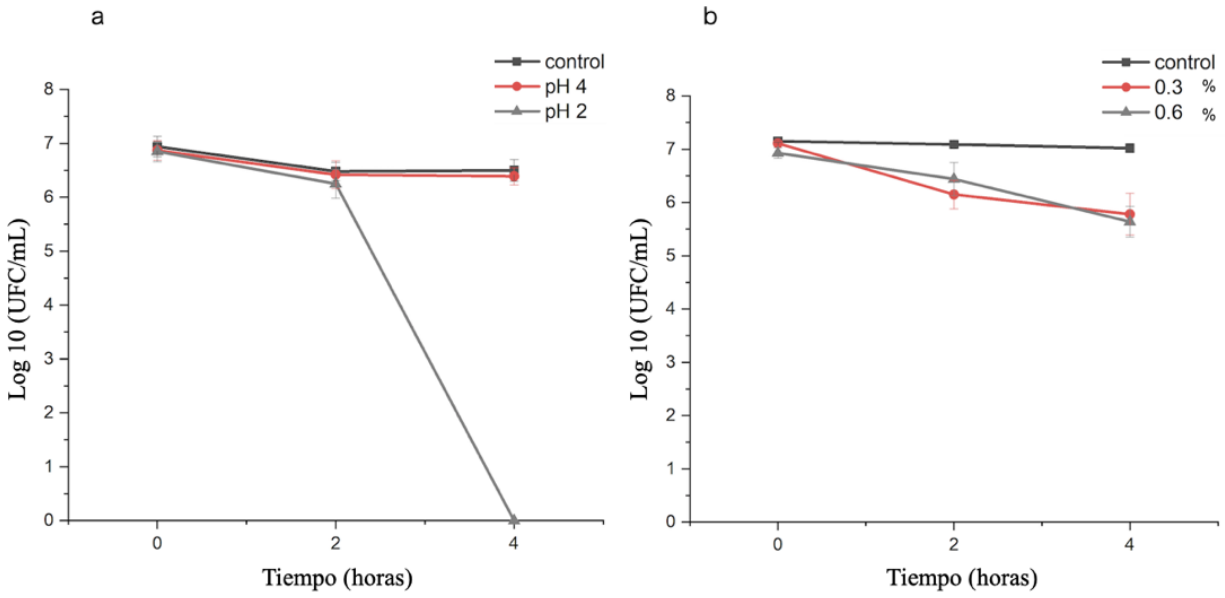


Figura 24. Sobrevivencia de *Ligilactobacillus murinus* B1 a condiciones simuladas de medio gástrico e intestinal

a) medio gástrico pH 2 y 4 **b)** medio intestinal con sales biliares al 0.3% y 0.6% (p/v), incubado a 40±2ºC durante 4 h. Se muestra en cada punto de tiempo el promedio de log UFC mL^{-1} y desviación estándar (n=5).

3.7. Capacidad de formación de biopelículas y adherencia a mucinas de *Ligilactobacillus murinus* B1

3.7.1. Formación de biopelículas por el método de tinción con cristal violeta

En general cualquier superficie puede albergar biopelículas como son el plástico, vidrio, metal, madera, superficies de alimentos etc. Entre los métodos para llevar a acabo su identificación y cuantificación se encuentra el método de tinción con cristal violeta, el cual consiste en teñir las biopelículas con cristal violeta, recuperar el colorante unido y medir su absorbancia mediante espectrofotometría (Wilson *et al.* 2017).

Como se mencionó en la metodología, se identificó la formación de biopelículas en placas de poliestireno, cuyos resultados se muestran en la **Figura 25a**, de acuerdo con el análisis de varianza ANOVA multifactorial, se observó un incremento significativo ($p<0.05$) en la producción de

biopelículas a las 72 h de *L. murinus* B1 (0.245±0.01) y *L. rhamnosus* (0.093±0.01) utilizado como control positivo, respecto al medio MRS estéril sin inocular. De acuerdo con los criterios establecidos, la capacidad de formación de biopelículas para *L. murinus* B1 se clasificó como moderada productora y para *L. rhamnosus* como débil productora de biopelículas.

La formación de biopelículas en superficies de vidrio se observó a partir de las 24 h para *L. murinus* B1 (2.34±0.33) (**Figura 25b**) clasificada como una cepa fuerte productora de biopelículas, mientras que *L. rhamnosus* (0.92±0.39) fue clasificada como débil productora en esta superficie.

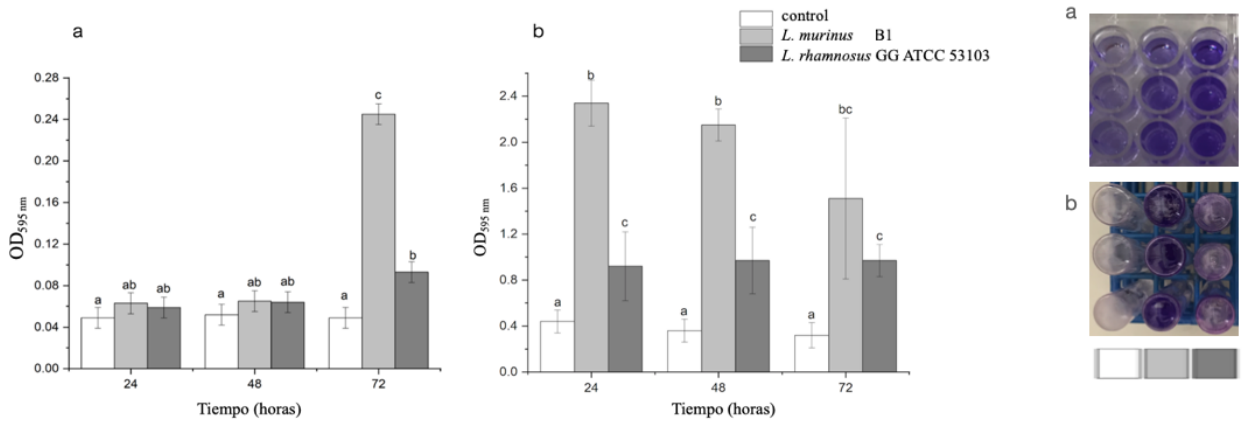


Figura 25. Formación de biopelículas en **a)** placas de poliestireno y **b)** en superficie de vidrio

Datos expresados en valores de medias ± desviación estándar (n=20) de la DO_{595nm} del cristal violeta solubilizado de los cultivos, ^{abc} letras diferentes muestran diferencias significativas (P <0.05).

3.7.2. Capacidad de adherencia a mucinas

La capacidad de adhesión a mucinas de *L. murinus* B1 y de *L. rhamnosus* (usada como cepa de referencia) se obtuvo a partir de las lecturas de absorbancia a 490_{nm} antes y después de dos lavados. El análisis de varianza mostró porcentajes de adhesión de 31±9.3 % para *L. murinus* B1 y 33±4.8 % para *L. rhamnosus* (**Figura 26**) en donde no se observa diferencia significativa ($p<0.05$), indicando que la capacidad de adhesión a mucinas es similar para ambos microorganismos.

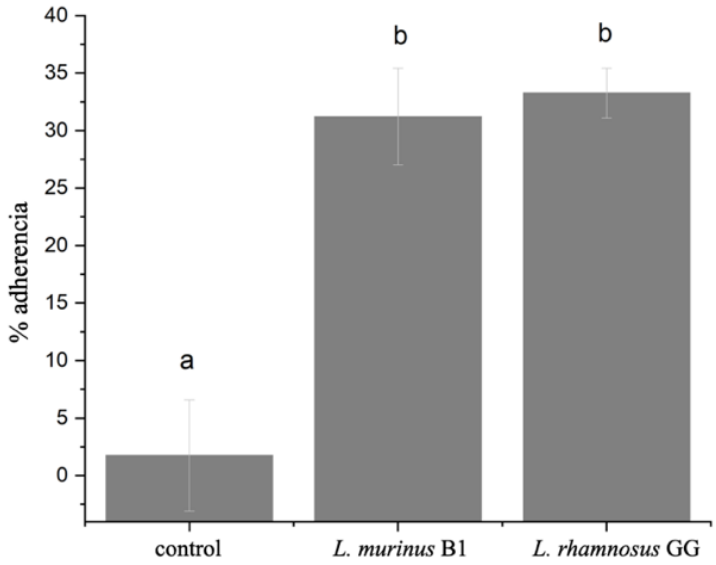


Figura 26. Adherencia de *Ligilactobacillus murinus* B1 a mucinas inmovilizadas en placas de poliestireno

Datos expresados como valores de medias DO_{490nm} ± desviación estándar (n=20). [ab] letras diferentes indican diferencia significativa ($p<0.05$) de las cepas de acuerdo con la prueba de Tukey.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El tracto gastrointestinal de animales comprende las fuentes con mayor potencial para la obtención de BL, presentando una ventaja en la búsqueda de nuevas cepas con potencial probiótico, utilizadas en la misma o en distintas especies animales (Sornplang y Piyadeatsoontorn, 2016; Oyewole *et al*. 2018). En este proyecto se identificaron y caracterizaron a nivel molecular cepas de *Lactobacillus* aisladas de tracto intestinal de ratón de cuatro semanas de edad, a las cuales se evaluó *in vitro* su potencial antagónico frente a patógenos de interés clínico y zoonótico, además de la sensibilidad a diferentes antibióticos. De las cepas identificadas, se eligió la cepa de *L. murinus* B1 para establecer las pruebas de sobrevivencia a condiciones de tracto gastrointestinal, capacidad de formación de biopelículas y de adherencia a mucinas, de acuerdo con los lineamientos de FAO-OMS (2002), con el objetivo de que puedan ser utilizadas como aditivo en la alimentación animal, a fin de proponerlas como alternativa al uso de antibióticos utilizados como promotores de crecimiento.

4.1. Identificación molecular por PCR y caracterización filogenética mediante el gen 16S rRNA

En particular, especies del género *Lactobacillus spp*. han sido identificadas en altas proporciones de tracto gastrointestinal de roedores, por ejemplo, Park e Itoh (2005) identificaron las cepas de *L. intestinalis, L. johnsonii, L. murinus, L. reuteri, L. gasseri* y *L. vaginalis* en ratones adultos. Por otra parte, Buhnik *et al*. (2011) aislaron y evaluaron la composición del microbioma intestinal de ratones BALB/c y C57BL/6J de 5 a 7 semanas de edad, encontrando las especies predominantes de *L. johnsonni, L. intestinalis*, *Enterococcus fecalis* y *Enterococcus hirae*. En otro estudio, Singer *et al*. (2019) identificaron los géneros de *L. murinus, L. johnsonii* y *L. reuteri* de tracto intestinal de ratones C57BL/6J. Estos autores, además de hallar altas proporciones del género *Lactobacillus spp.* en el tracto gastrointestinal de ratones, determinaron su importancia en el equilibrio del microbioma intestinal, así como en el mantenimiento de la salud del huésped.

En este trabajo, se obtuvo la identificación molecular y del análisis de las secuencias correspondientes a la región variable V2 del gen 16S rRNA de las 18 cepas aisladas de tracto intestinal de ratón, permitiendo identificar a 16 cepas como *Ligilactobacillus murinus*, un *Ligilactobacillus animalis* y un *Streptococcus salivarius*. De acuerdo con sus funciones, la región

variable V2 es responsable junto con la región V8, de mantener la estabilidad estructural de 16S rRNA y son consideradas las más rápidas de evolución, por lo que son utilizadas para distinguir distintas especies bacterianas dentro de un género (Bukin *et al*. 2019).

Por otra parte, el análisis filogenético permitio determinar las relaciones evolutivas entre las regiones variables V2 de las distintas cepas de *L. murinus,* además de confirmar la relación estrecha que existe entre las especies de *L. murinus* y *L. animalis,* las cuales se ubicaron en el mismo nivel de ramas, con similitudes altas entre sus secuencias (86%-91%). Estos resultados fueron corroborados de acuerdo con Park e Itoh (2005) y Zheng *et al*. (2020), quienes identifican a *L. murinus* y *L. animalis* en el mismo nivel filogenético, con porcentajes de similitud del 99% entre las regiones del gen 16S rRNA.

4.2. Identificación de los fenómenos de antagonismo de las 18 cepas de BL aisladas frente a patógenos de interés clínico y zoonótico

La actividad antagónica de las 18 cepas de BL frente a diferentes patógenos de interés clínico y zoonótico fue evaluada por ensayos de difusión en agar. En primera instancia se evaluaron los cultivos de cada cepa de BL, el cual contiene tanto las células como el sobrenadante, presentando halos de inhibición frente a los cuatro microorganismos de prueba. En estos ensayos se encontró mayor efecto inhibitorio de las BL aisladas frente a los microorganismos Gram negativos *E. coli* REPEC (18-25 mm) y *C. jejuni* (36-44 mm). Los halos inhibitorios de mayor tamaño detectados frente a *C. jejuni,* pueden ser explicados debido a que *C. jejuni* es un microorganismo miroaerofílico, con tasas específicas de crecimiento de 0.37 h y tiempo de duplicación de 1.87 h, cuya fase logarítmica se alcanza a las 35 h (Hansson *et al*. 2018), por lo que las cepas de BL estudiadas muestraron ventaja en su crecimiento y con ello la producción de sus metabolitos con actividad antibacteriana.

Estos resultados concuerdan con la literatura, en donde distintas BL han demostrado actividad antagónica frente a patógenos Gram negativos, por ejemplo, *Pediococcus pentosaceus* CWBI B73 y *L. pentosus* CWBI B78 mostraron halos de inhibición frente a *C. jejuni* entre 15 y 20 mm de diámetro (Dubois *et al*. 2011), por otra parte, Gutiérrez, *et al*. (2017) aislaron las cepas de *L.*

plantarum, *L. paracasei* y *P. acidilactici* de leche de vaca con actividad inhibitoria frente a *E. coli* ATCC 25922 con halos de inhibición entre 17 y 24 mm de diametro. En estos estudios además de evaluar la actividad antagónica de las BL utilizando el método de difusión en agar, se evaluaron los sobrenadantes libres de células, confirmando que la capacidad de inhibición de las cepas aisladas, se debe principalmente a la exclusión competitiva, la producción de ácidos orgánicos y a la producción de compuestos proteicos.

Para confirmar la naturaleza de inhibición, en los ensayos de difusión en agar se estudiaron diferentes condiciones de las células y de los sobrenadantes de *L. murinus* B1 frente a *E. coli* y *C. jejuni*, bajo estas condiciones, los sobrenadantes de cultivo (filtrados, neutralizados y/o calentados) no mostraron inhibición, lo que sugiere que la actividad antagónica es independiente a la acción de ácidos orgánicos, bacteriocinas sintetizadas o de algún otro metabolito soluble presente en el sobrenadante. El tratamiento con ácido láctico al 2% fue elegido, tomando en cuenta que las BL producen concentraciones de ácido láctico entre 4.5 y 10 g/L al ser incubadas en medio MRS (Boontim *et al*. 2018), en este ensayo, utilizamos concentraciones mayores de ácido láctico lo que ayuda a confirmar que la sola presencia ácida, no son sufiecientes para producir la inhibición, por lo que se sugiere que la acción antagónica de *L. murinus* B1 involucra mecanismos como la competencia por nutrientes y/o espacio, debida a una relación más estrecha entre célula-célula, la cual requiere la presencia y viabilidad de la cepa de BL para producir la inhibición de *E. coli* REPEC y *C. jejuni*.

Debido a que los compuestos antibacterianos de naturaleza proteica como las bacteriocinas y PGH son producidos por las BL en bajas concentraciones, estas pueden ser difíciles de detectar y analizar. Por tal razón, en nuestro estudio, se utilizaron técnicas electroforéticas SDS-PAGE y de zimografía, el cual es un método altamente sensible para la detección de actividad enzimática (Vandooren *et al*. 2013). Estos ensayos demostraron la presencia de dos proteínas con actividad lítica de diferente peso molecular, presentes en los sobrenadantes de todas las cepas de *L. murinus*. Las bandas líticas de **107 kDa** correspondieron a una banda electroforética de **108 kDa,** encontradas en los geles copolimerizados con *M. lysodeikticus E. coli* REPEC y *C. jejuni.* Estos resultados coinciden con lo reportado por Llorente (2008), quien al utilizar los sobrenadantes de *P.*

acidilactici ATCC 8042 detectaron una banda con actividad PGH de 107 kDa en geles renaturalizantes SDS-PAGE frente a *M. lysodeikticus* ATCC 4698. Por otra parte, en este estudio se detectaron bandas de **24 kDa**, que correspondieron a una banda electroforética de **25 kDa**, las cuales mostraron diferencias en la intensidad lítica frente a *L. monocytogenes S. aureus* y *E. coli* EPEC. A pesar de que se utilizaron cultivos de cuatro horas y cantidades iguales de sobrenadante (1 mL), las diferencias en la intensidad de actividad lítica para cada patógeno pueden ser explicada debido a las diferencias de crecimiento encontradas entre las cepas de *L. murinus*, en donde la fase logarítmica se alcanzo entre las 4 y 8 h de cultivo y a que de esto depende tanto la cantidad de biomasa y la producción del metabolito de interés en el cultivo (Gallegos *et al*. 2014).

Adicionalmente, en los Zimogramas copolimerizados con *C. jejuni*, las bandas líticas difusas detectadas (**106, 87, y 66 kDa)** al utilizar una solución de renaturalización elaborada con iones de Na^{+} y Ca^{2+}, pueden indicar que algunas de estas enzimas líticas presentes en los sobrenadantes de cultivo de *L. murinus* son de tipo metaloproteasas (Llorente, 2008).

De acuerdo con la masa molecular aparente, las bandas líticas de **107 kDa** sugieren la capacidad de las cepas de *L. murinus* de producir una PGH. Por otro lado, las bandas de **24 kDa** puede tratarse de alguna sustancia inhibitoria similar a bacteriocinas (BLIS) (Kieliszek *et al.* 2021) ó una bacteriocina de Clase III, las cuales son péptidos termolábiles de peso molecular entre 21 y 37 kDa (Cotter *et al*. 2005).

El método de huella peptídica por UPLC-MS, fue utilizado para identificar estas proteínas. La proteína lítica con masa molecular aparente de 107 kDa confirmó la presencia de una PGH de 96 kDa con actividad amidasa, la cual contiene el dominio de unión a peptidoglicano LysM (motivo de lisina) y cuya función molecular implica la citolisis, además de que es considerada una enzima bacteriolítica con actividad antibacteriana. Específicamente, la actividad bacteriolítica por parte de la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa identificada frente a los patógenos gram negativos *E. coli* REPEC O103 y *C. jejuni*, se origina debido al sitio específico de hidrólisis en el PG, la cual escinde el enlace amida entre MurNAc y la L-alanina del péptido (Sharma *et al*. 2016). Además, la eficiencia de su actividad puede atribuirse al número de módulos de unión a LysM, los cuales

reconocen a las unidades de N-acetilglucosamina del PG y que contribuyen a su unión de manera aditiva (Mesnaje *et al*. 2014).

La banda de 24 kDa detectada con actividad lítica frente a *L. monocytogenes*, *E. coli* REPEC O103 y *C. jejuni*, analizada mediante UPLC-MS, mostró un 12% de similitud con un fragmento de proteína que contiene el dominio GA (proteina G relacionada a la unión de Albumina) con función aminopeptidasa, informado en el genoma de *Ligilactobacillus salivarius*. En particular, el dominio GA identificado en esta banda lítica a través del péptido IDQMLELTVDQKDNFNK, es un dominio localizado en una variedad de proteínas de superficie celular en diferentes bacterias (Johansson *et al*. 1997).

Similar a esta investigación, varios estudios han reportado actividad lítica de diferentes PGH contra patógenos Gram-positivos y Gram-negativos. Por ejemplo, una de las PGH más investigadas es la lisostafina, una peptidasa de 25 kDa producida por *Staphylococcus simulans*, que en su forma activa corta el enlace peptídico entre los residuos de glicina tercero y cuarto del entrecruzamiento de pentaglicina en el PG de *S. aureus*, la cual ha demostrado ser eficaz en infecciones causadas por *Staphylococcus spp* (Jayakumar *et al*. 2021). En otro estudio, García *et al*. (2011) encontraron dos PGH en *P. acidilactici*, una proteína de 99 kDa con función desconocida y otra de 110 kDa con actividad N-acetilmuramidasa, las cuales demostraron actividad antibacteriana frente a los patógenos *B. cereus, L. monocytogenes y S.* Typhimurium en los ensayos de difusión en agar. López *et al*. (2021) identificaron y purificaron una proteína de 75 kDa producida por *Latilactobacillus sakei* UAM-MG-3 con actividad N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, la cual demostró una fuerte actividad bacteriolítica frente a *M. lysodeikticus*, *E. coli* y *E. faecium*, mediante ensayos de SDS-PAGE y zimografía.

La presencia de enzimas bacteriolíticas, una de ellas PGH en las cepas aisladas y caracterizadas de *L. murinus* en este estudio, es un hallazgo importante que contribuye a su potencial antagónico. Además, estas enzimas tienen un potencial de aplicación como agentes antibacterianos alternativos para tratar infecciones causadas por bacterias patógenas y/o bacterias resistentes a los antibióticos,

debido a que los mecanismos moleculares de resistencia a los antibióticos no están relacionados con la hidrólisis del PG (Mosquito *et al*. 2011).

4.3. Sensibilidad a los antibióticos de las 18 cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón

La aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos como consecuencia de su uso generalizado en la clínica humana y las producciones pecuarias, han reducido su eficacia, por lo que son necesarias nuevas alternativas antibacterianas. Las cepas con potencial probiótico se han consolidado como una de las alternativas naturales al uso de los antibióticos promotores de crecimiento (AGP, pos sus siglas en inglés) en la producción animal, además de sus aplicaciones como adyuvante en tratamientos de infecciones gastrointestinales (Mahesh *et al*. 2021). Debido a esto, como criterio de seguridad, las cepas con potencial probiótico requieren del análisis de resistencia a diferentes antibióticos, ya que se sabe que existen plásmidos en algunas de estas cepas, especialmente en cepas aisladas del intestino, que tienen genes que codifican para la resistencia a los antibióticos, los cuales pueden ser transferidos a otros microorganismos, algunos de ellos patógenos (FAO-OMS, 2002).

Para este ensayo se utilizaron antibióticos de importancia humana y veterinaria, incluyendo inhibidores de síntesis de la pared celular (penicilina, ampicilina, cefotaxima, cefalotina, dicloxacilina, vancomicina y bacitracina de zinc), inhibidores de la síntesis de proteínas (tetraciclina, gentamicina, eritromicina y clindamicina) e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (ciprofloxacina, Sulfas/trimetoprim). De éstos, la vancomicina y bacitracina de zinc son utilizados como AGP permitidos en la alimentación animal, que, si bien actualmente su uso está prohibido en la Unión Europea, Chile, Turquía, Corea del Sur, Brasil y Estados Unidos, en algunos otros países son más permisivos en su uso como China, India y países de América Latina incluyendo a México (OMS, 2021).

De acuerdo con los resultados, las cepas de *L. murinus* A2 y B1 presentaron sensibilidad a la mayoría de los antibióticos. Por el contrario, las cepas restantes de *L. murinus* presentaron resistencia variable a la ampicilina, penicilina, vancomicina, cefalotina, cefotaxima,

ciprofloxacina, dicloxacilina, gentamicina y bacitracina de zinc. Por el contrario, la resistencia de *L. animalis* G1 a todos los antibióticos con excepción a la clindamicina, no lo coloca como un buen candidato para su uso como probiótico.

Distintos reportes han informado que algunas especies de BL presentan resistencia intrínseca a la bacitracina de zinc, kanamicina, vancomicina y betalactámicos como la dicloxacilina (Shazali, 2014; Preethi *et al*. 2017; May *et al*. 2020). En particular, la resistencia a la vancomicina es considerada para el género de *Lactobacillus spp*. como una resistencia intrínseca, es decir, que la resistencia está relacionada con genes localizados en los cromosomas, la cual no representa peligro de transferencia horizontal (Luo *et al.* 2012).

Debido a que la mayoría de las cepas de *L. murinus* mostraron resistencia a alguno de los antibióticos ensayados y tomando en cuenta los lineamientos emitidos por EFSA (2018) para las cepas utilizadas como aditivos en la alimentación animal, es necesario realizar ensayos complementarios de resistencia a los antibióticos mediante la prueba de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), así como mayor investigación en la búsqueda de genes de resistencia a los antimicrobianos conocidos en el genoma de la cepa.

4.4. Sobrevivencia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de *L. murinus* B1

La capacidad de las bacterias para sobrevivir y establecerse en el intestino depende de las condiciones fisicoquímicas del tracto gastrointestinal, por ello la capacidad de resistencia a las condiciones del compartimento gástrico e intestinal es de vital importancia para que las cepas con potencial probiótico logren ejercer sus efectos benéficos. Debido a lo expuesto anteriormente, se estandarizaron los ensayos con la finalidad de simular las condiciones de tracto gástrico e intestinal para evaluar la capacidad de sobrevivencia de la cepa de *L. murinus* B1.

En el ambiente gástrico, la presencia del pH ácido y pepsina actúan como barrera fisiológica al paso de microorganismos, disminuyendo el porcentaje de células vivas bacterianas viables que lograrán alcanzar el intestino. En los ensayos de sobrevivencia a estas condiciones, se corroboró la capacidad restrictiva de *L. murinus* B1, la cual mostró una disminución significativa de UFC mL^{-1}

al ser expuesta al medio gástrico simulado con respecto al control. Además, de que se logro identificar, que al aumentar el tiempo de exposición, fue menor la sobrevivencia de las células bacterianas.

Los resultados de sobrevivencia de *L. murinus* B1 a pH 2 con el 68% y 0%, a las 2 y 4 h de incubación respectivamente, concuerdan con varios estudios, por ejemplo, Oyewole *et al.* (2018), desafiaron cepas aisladas de pollo a condiciones gastrointestinales. Las cepas correspondientes a *L. fermentum* y *L. acidophilus* que se incubaron bajo condiciones ácidas durante 3 h registraron sobrevivencia de 83% y 72% en pH 3, y 0 % y 39 % en pH 2, respectivamente. En otro ensayo, Lo Curto *et al*. (2011) investigaron la sobrevivencia de *L. acidophilus* y *L. casei* en medio gástrico simulado a base de agua y leche, se observó que la sobrevivencia de las cepas después de dos horas de incubación en la formulación a base de agua con pH 2 fue del 39% y 43% respectivamente, sin embargo, al adicionar leche en la formulación del medio gástrico, los porcentajes de recuperación aumentaron a 176% y 197%. La sobrevivencia de las cepas con potencial probiótico en el medio gástrico depende de varios factores como el tipo de cepa y su estado de crecimiento (fase estacionaria o logarítmica), así como de la presencia de nutrientes en el medio, por lo que no se debe subestimar su comportamiento bajo estas condiciones.

El medio gástrico no es la única barrera para los microrganismos que se intenta lleguen viables al intestino, el pH alcalino y la presencia de sales biliares son una segunda barrera fisiológica. En este estudio, cuando *L. murinus* B1 se incubó con sales biliares en dos concentraciones (0.3% y 0.6%) mostró porcentajes de sobrevivencia del 13% y 25% respectivamente después de 2 h y del 5% y 7% después de 4 h. Estos resultados coinciden con Delgado *et al*. (2015), quienes evaluaron cepas de *Lactobacillus spp*. de origen humano, mostrando alta sensibilidad a la presencia de sales biliares, en donde la sobrevivencia de *L. gasseri* fue del 1.5%, mientras que *L. reuteri* y *L. casei* mostraron mayor resistencia (4%), cuando se incubaron en sales biliares al 0.25% durante 90 minutos. Particularmente, estas diferencias de sobrevivencia entre especies, pueden ser explicadas por la presencia de adaptaciones para reducir el daño a membranas celulares ejercido por los ácidos biliares, estos mecanismos evolutivos de defensa han sido observados en géneros habitualmente presentes en intestino, como es el caso de algunos *Lactobacillus.*

4.5. Capacidad de formación de biopelículas y adherencia a mucinas de *L. murinus* B1

Las biopelículas son una forma natural de inmovilización celular que resulta de la unión microbiana a superficies sólidas bióticas o abióticas. La presencia de una alta densidad celular en la biopelícula permite que la bacteria resista condiciones adversas. Se ha informado que la formación de biopelículas por parte de las cepas probióticas, como *Lactobacillus spp*., se considera una aptitud probiótica porque podría promover la colonización en el tracto gastrointestinal y una mayor permanencia en la mucosa del huésped, actuando como efecto de barrera contra el desarrollo de microorganismos patógenos (Lebeer *et al*. 2007).

En este estudio se evaluó la capacidad de formación de biopelículas en superficies abióticas (placas de poliestireno y vidrio), además de su comparación con las presentadas por *L. rhamnosus* GG, el cual es considerado como uno de los probióticos mayormente estudiados (Salas *et al.* 2016). Como resultado, la formación de biopelículas de *L. murinus* B1 fue mayor ($p<0.5$) comparada con *L. rhamnosus* GG. Diversos estudios han demostrado que la formación de biopelículas es una propiedad específica de cada cepa, además de que es una característica influenciada por diferentes factores como el medio de cultivo utilizado, las condiciones ácidas del estómago, alta osmolaridad, la presencia de sales biliares o de mucinas (Coman *et al*. 2019).

Otra característica investigada en este trabajo fue la capacidad de adherencia de *L. murinus* B1 a mucinas y su comparación con *L. rhamnosus* GG, la cual es una cepa que ha demostrado capacidades de adherencia a mucinas y a células epiteliales Caco-2 en cultivos celulares (Vargas *et al*. 2015). En este ensayo, los porcentajes de adherencia obtenidos para *L. murinus* B1 fueron del 58%, muy similares a los obtenidos para *L. rhamnosus* GG (54%). Estos resultados son congruentes con lo reportado por Damayanti *et al*. (2012), quienes encontraron altos porcentajes de adherencia de *P. acidilactici* en mucinas porcinas del 51% y en mucinas de pollo con el 55%, concluyendo que dicha capacidad es considerada como un factor necesario que permitirá a las cepas con potencial probiótico instaurarse en el intestino y posteriormente ejercer sus efectos benéficos, tales como evitar la adherencia e instauración de bacterias patógenas en la mucosa intestinal.

Los hallazgos de este trabajo, pueden ser aplicados desde el punto de vista del tercer objetivo de desarrollo sostenible "Salud y bienestar" (United Nations 2015) y el esfuerzo multidisciplinario con el enfoque "Una Salud", para reducir los problemas sanitarios, las enfermedades zoonóticas y la resistencia a los antimicrobianos, debido a que estos problemas presentan una amenaza creciente para el bienestar de los seres humanos y animales. En la búsqueda de alternativas de solución, se encuentran el uso de nuevas cepas probióticas y de sus compuestos bioactivos para disminuir el uso de los antimicrobianos, debido a que proveen beneficios a la salud y no generan riesgos de transferencia de mecanismos de resistencia. En este contexto, nuestra investigación es importante debido a que se exploró un nuevo nicho en la búsqueda de cepas del género *Lactobacillus spp.*, las cuales mostraron capacidad inhibitoria frente a los microorganismos patógenos de prueba; *C. jejuni*, el cual es considerado la principal causa bacteriana de gastroenteritis en el mundo y el patogeno zoonotico responsable de gastroenteritis en humanos asociada al consumo de carne de pollo (WHO 2018). *E. coli* REPEC, reconocido como uno de los principales patógenos causantes de diarrea en humanos y animales (Oliver *et al*. 2008), e identificado como el agente bacteriano más importante en las enfermedades diarreicas en niños menores de cinco años (Farfan *et al*. 2016). *L. monocytogenes*, considerado como un patógeno emergente transmitido por los alimentos (Beier *et al*. 2019), causante de graves problemas de salud presentados de forma esporádica o en epidemia (Reda *et al*. 2016) y *S. aureus*, considerado un patógeno multi-resistente, encontrado principalmente como responsable de las infecciones hospitalarias y aislado con mayor frecuencia en casos de intoxicación alimentaria con gran importancia en las ETA (Guo *et al.* 2020; Matuszewska *et al*. 2020). Debido a la capacidad antagónica de las 16 cepas de *Ligilactobacillus murinus* aisladas y caracterizadas en este trabajo, así como la identificación de sus metabolitos con actividad antibacteriana, se sugiere una posible alternativa de solución en la prevención y control de estos patógenos que promuevan la salud y bienestar animal y en consecuencia también la salud humana.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Se carácterizo a nivel molecular 18 cepas de BL aisladas en este trabajo, 16 de ellas identificadas como *Ligilactobacillus murinus*, una como *Ligilactobacillus animalis* y un *Streptococcus salivarius*.

- Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se obtuvo el porcentaje de identidad y el análisis filogenético de las secuencias del 16S rRNA de las 18 cepas de BL aisladas, así como su registro en GenBank.

- En las cinéticas de crecimiento se identificaron las fases de crecimiento en medio MRS: la fase logarítmica se observó entre las 4 y 8 h, seguida de una fase estacionaria, la cual se mantuvo hasta las 24 h, con diferencias estadísticas ($p>0.05$) entre ellas. Dischas fases permitieron determinar los parámetros cinéticos bacterianos para cada cepa de BL aislada.

- Por medio de ensayos de difusión en agar, se logró identificar la actividad antagónica de los cultivos de cada una de las 18 cepas de BL aisladas en fase logarítmica (7-9 log UFC mL^{-1}) frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* REPEC y *C. jejuni*.

- En los ensayos de evaluación de los sobrenadantes, los perfiles electroforéticos SDS-PAGE, identificaron a 16 bandas de proteínas de baja y alta masa molecular aparente en los sobrenadantes de cultivo de las 18 cepas de BL aisladas. Las cuales permitiendo correlacionar la presencia de una proteína como la responsable de la actividad lítica.

- Mediante zimografía de actividad *in situ* se identificó una banda lítica de 107 kDa en los geles copolimerizados con *M. lysodeikticus*, *C. jejuni* y *E. coli* y una banda lítica de 24 kDa sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* en los sobrenadantes de cultivo de las 16 cepas de *L. murinus* aisladas.

- El método de huella peptídica por UPLC-MS permitió identificar a la proteína lítica con masa molecular aparente de 107 kDa como una PGH de 96 kDa de tipo amidasa, cuya función molecular implica la citolisis y actividad antibacteriana.

- Por medio de la técnica de difusión en agar, se estableció el patrón de resistencia para las 18 cepas de BL frente a antibióticos de uso humano y veterinario. Las cepas de *L. murinus* A2, B1, E2, E3 y F1 presentaron el menor número de resistencia a los antibióticos y sus mecanismos de acción (sobre pared celular, síntesis proteica y síntesis de ácidos nucleicos), mientras que *L. animalis* H2 demostró ser resistente a todos los antibióticos, con excepción de la clindamicina.

- Con base en lo establecido por FAO-OMS para el cumplimiento con los criterios de aptitud probiótica, la cepa de *L. murinus* B1 determinó su sobrevivencia a condiciones de medio gástrico a pH 4 y pH 2 a las 4 y 2h del desafío respectivamente.

- Los ensayos *in vitro* de sobrevivencia al medio intestinal, mostraron la capacidad de *L. murinus* B1 de permanecer viable en ambas concentraciones de sales biliares (0.3 y 0.6%) después de las 4 h de incubación, por lo cual puede ser utilizada como probiótico.

- Se determinó que la cepa de *L. murinus* B1 posee mayor capacidad de producción de biopelículas en superficies abióticas, además de la misma capacidad de adherencia a mucinas que la cepa de *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 utilizada como control, las cuales son reconocidas como aptitudes deseables para la colonización del tracto gastrointesinal.

Con base en las pruebas y análisis realizados, se puede concluir que las cepas de *Ligilactobacillus murinus* aisladas de tracto intestinal de ratón cuentan con aptitudes probióticas de inhibición de diferentes patógenos de interés clínico y zoonótico; *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* REPEC y *C. jejuni*, debido a que se detectó la presencia de enzimas con actividad bacteriolítica de amplio espectro que pueden aplicarse de manera segura como alternativa al uso de antibióticos promotores de crecimiento.

RECOMENDACIONES

Es recomendable continuar con otros métodos de evaluación que consoliden a establecer los beneficios que ofrecen las cepas de *Ligilactobacillus murinus* como probióticos. Sin embargo, con lo realizado en este trabajo, se puede concluir que cumple con los requisitos mínimos indispensables para ser considerado un probiótico como promotor de crecimiento no antibiótico.

- Una vez reconocida la actividad antagónica que presentan las cepas aisladas frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos, será de gran relevancia profundizar sobre si esta característica es alterada una vez que las cepas sean sometidas a condiciones adversas en el tracto gastrointestinal.

- Es necesario complementar estudios de resistencia a los antibióticos estudiados; determinando la concentración inhibitoria mínima, además de investigar si *Ligilactobacillus murinus* poseen genes asociados con su resistencia, así como verificar si es posible su transmisión a bacterias patógenas.

- En este trabajo se sientan las bases sobre la capacidad de formación de biopelículas y de adherencia a mucinas de *L. murinus* B1, sin embargo, se recomiendan evaluar los mecanismos que esta cepa posee para lograrlo.

- Se recomienda determinar la estabilidad de las cepas aisladas, una vez que estas sean sometidas a procesos tecnológicos como la liofilización o la microencapsulación, así como en diferentes tiempos de almacenamiento.

LITERATURA CITADA

Abdollahzadeh, E., Ojagh, S.M., Hosseini, H., Ghaemi, E.A., Irajian, G., Naghizadeh Heidarlo, M. (2016). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood and humans in Iran. *Microb Pathog*, **100**: 70–74. 10.1016/j.micpath.2016.09.012

Abdul R, O., Wu, Q., Price, T. K., Pistone, G., Diebel, K., Bugni, T. S., Wolfe, A. J. (2021). Phenyl-Lactic Acid Is an Active Ingredient in bactericidal supernatants of *Lactobacillus crispatus*. *J bacteriol*, **203**(19). 10.1128/JB.00360-21

Aunsbjerg, S.D., Honoré, A.H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F.K… Knøchel, S. (2015). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int J Food Microbiol*, **194**: 46-53. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007

Axelsson, L. (2012). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Salmine, S., Wright, A.V., Ouwehand, A., Eds. Lactic Acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 3th. New York: Marcel Dekker. 1–67 p. https://doi.org/10.1201/9780824752033

Baldassarre, M. E., Di Mauro, A., Mastromarino, P., Fanelli, M., Martinelli, D., Urbano, F… Laforgia, N. (2016). Administration of a Multi-Strain Probiotic Product to Women in the Perinatal Period Differentially Affects the Breast Milk Cytokine Profile and May Have Beneficial Effects on Neonatal Gastrointestinal Functional Symptoms. *Nutrients*, **8**(11), 677. 10.3390/nu8110677

Beier, R.C., Foley, S.L., Harvey, R.B. (2019). Editorial for the Special Issue: Foodborne Pathogen Distribution, Ecology, inactivation, and methods of differentiation. *Microorganims* **7**(12): 701. 10.3390/microorganisms7120701

Bertin, Y., Habouzit, C., Dunière, L., Laurier, M., Durand, A… Forano, E. (2017). *Lactobacillus reuteri* suppresses *E. coli* O157:H7 in bovine ruminal fluid: Toward a pre-slaughter strategy to improve food safety. *PloS one*, **12**(11), e0187229. 10.1371/journal.pone.0187229

Bidaisee, S., Macpherson, C.N. (2014). Zoonoses and one health: a review of the literature. J Parasitol Res, 874345. 10.1155/2014/874345

Bolocan, A.S., Pennone, V., O'Connor, P.M., Coffey, A., Nicolau, A.I., McAuliffe, O., Jordan, K. (2017). Inhibition of *Listeria monocytogenes* biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate. *J Appl Microbiol*, **122**(1):279-293. 10.1111/jam.13337

Boontim, N., Khanongnuch, C., Pathom-aree, W., Niamsup P., Lumyong S. (2018). Production of L-Lactic Acid by Thermotorelant Lactic Acid Bacteria. *Chiang Mai J Sci*, **45**(1) : 68-76.

Bos, D.H., Posada, D. (2005). Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. *Dev Comp Immunol*, **29**(3):211–27. 10.1016/j.dci.2004.07.007

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Buhnik R.K., Danin P., Y., Kashi, Y. (2011) Predominant effect of host genetics on levels of Lactobacillus johnsonii bacteria in the mouse gut. *Appl Environ Microbiol*, **77**(18), 6531–6538. 10.1128/AEM.00324-11

Bukin, Y., Galachyants, Y., Morozov, I. *et al*. (2019). The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci Data*, **6**, 190007. https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7

Burbano, E., Sierra, S., Torres, K., Mercado, M., Carrascal, A., Poutou, R. (2006). Rapid DNA extraction and PCR validation for direct detection of *Listeria Monocytogenes* in raw milk. *Rev MVZ Cordova*, **11**(1), 715-724. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682006000100005

CDC. Centers for Disease Control and Prevention (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) https://www.cdc.gov/mrsa/index.htm

Cencic, A., Langerholc, T. (2010). Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology A review. *Int J Food Microbiol*. **141**(1): S4-14. 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.026

Cheung, G., Bae, J. S., Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. Virulence, **12**(1), 547–569. 10.1080/21505594.2021.1878688

Chlebicz, A., Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int J Environ Res Public Health*, *15*(5). https://doi.org/10.3390/ijerph15050863

Ciro, G. J. A., López, H. A., Parra, S. J. (2015). La adición de cepas probióticas modula la secreción de mucinas intestinales en íleon de cerdos en crecimiento. *Rev CES Med Zootec*, 10(2), 150-159.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, Pennsylvania 19087 USA.

Cod. Fed. (1988). Nisin preparation: Affirmation of GRAS *status* as a direct human food ingredient. Fed. Register, **54**,11247–11251.

Coman, M.M., Verdenelli, M.C., Cecchini, C., Belà, B., Gramenzi, A... Silvi, S. (2019). Probiotic characterization of *Lactobacillus* isolates from canine faeces. *J Appl Microbiol*, **126**(4), 1245–1256. 10.1111/jam.14197

Cotter, P. D., Ross, R. P., Hill, C. (2013). Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics?. *Nat Rev Microbiol*, **11**(2), 95–105. 10.1038/nrmicro2937

Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, *3*(10): 777–788. 10.1038/nrmicro1273

Damayanti, E., Mira, L., Dinoto, A. (2012). 16s rRNA Identification of *Pediococcus* spp. from Broiler and Studies of Adherence Ability on Immobilized Mucus. *I J Biotechnol*, **17**(2), 96-106. 10.22146/ijbiotech.7854

Davis, C. (2014). Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *J Microbiol Methods*, **103**:9-17. 10.1016/j.mimet.2014.04.012

De Albuquerque, T.M.R., Garcia, E.F., De Oliveira, A., Magnani, M., Saarela, M., De Souza, E.L.(2018). In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins* **10**(4),704–716. 10.1007/s12602-017-9318-2

Delgado, S., Leite, A.M., Ruas, M.P., Mayo, B. (2015). Probiotic and technological properties of Lactobacillus spp. strains from de human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Front Microbiol*, **5**: 766. 10.3389/fmicb.2014.00766

Dubois D. R, Sabrina V, Isabelle D, Christopher M, Andre T, Philippe T. (2011). *In Vitro* Antagonistic Activity Evaluation of Lactic Acid Bacteria (LAB) Combined with Cellulase Enzyme Against *Campylobacter jejuni* Growth in Co-Culture**.** *J Microbiol Biotechnol*, **21**(1):62–70. 10.4014/jmb.1007.07006

EFSA and ECDC. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J,* **19**(12):6971–324. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971

EFSA. (2012). Technical guidance prepared by the Pannel on Additives and Products of Sustances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human sor veterinary importance. *EFSA J*, **10** (6): 2740-2750.

EFSA. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., *et al.* (2018) Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA Journal, **16**(3):5206. 10.2903/j.efsa.2018.5206

Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P., Balasubramanian, T. (2014). Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac J of Trop Biomed* **4**(1),305–311. 10.12980/APJTB.4.2014C537

Esmail, K., S., Mojgani, N., Khan, A. M. (2014). Characterization of partially purified bacteriocin like substance (BLIS) produced by probiotic Lactobacillus strains. *Int J Enteric Pathog*, 2(2): e17426. 10.17795/IJEP17426

FAO-WHO. (2002). Report of a Joint FAO-WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London Ontario, Canada.

Farfan, G.A.E., Ariza, R.S.C., Vargas, C.F.A., Vargas, R.L.V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev Chil Infectol*, **33**(4): 438-450. https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009

Field, D., Ross, P.R., Hill, C. (2018). Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. Curr Opin Food Sci, **20**: 1-6. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.004

Fina, M.J., Palomino, M.M., Cutine, A.M. et al. (2019). Exploring lectin-like activity of the S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Appl Microbiol Biotechnol* **103**, 4839–4857. 10.1007/s00253-019-09795-y

Gallegos, A.C.F., González, V., Aguilar, C.N., Cristóbal, N. (2014). Biofertilizantes Microbianos. Plaza y Valdés, SA de CV.

Gañan, M., Martínez, R.A.J., Carrascosa, A.V. (2009). Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, **20**(8): 739-742. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.012

Gao, Z., Daliri, E.B., Wang, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X., Ding, T. (2019). Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria on Foodborne Pathogens: A Review. *J Food Protect* **82**(3),441–453. 10.4315/0362-028X.JFP-18-303

García S.L., Melero, B., Diez, A.M., Jaime, I., Rovira, J. (2018). Characterization of *Campylobacter* species in Spanish retail from different fresh chicken products and their antimicrobial resistance. *Food Microbiol*, **76**: 457–465. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.004

García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Paredes, M. A., Herrera, M. R., Giono, S. (2019). Resistencia a la meticilina y producción de biopelícula en aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* coagulasa negativa en México. *Biomédica*, **39**(3), 513-523.https://doi.org/10.7705/biomedica.4131

García, C.I., Velasco, P.L., Rodríguez, S.R., Sánchez, S., Mendoza, H.G., Llorente, B.A., *et al*. (2011). Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: two lytic enzymes in *Ped. acidilactici*. *J Appl Microbiol* **111**:607–615. 10.1111/j.1365-2672.2011.05088.x

Getachew, T. (2016). A Review on Effects of Probiotic Supplementation in Poultry Performance and Cholesterol Levels of Egg and Meat. *J World Poult Res*, **6**(1): 31-36.

Gómez D.O. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. Rev Chil Infectol, **31**(5), 577-586. https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000500010

Goni, M.D., Muhammad, I.J., Goje, M., Abatcha, M.G., Bitrus, A.A., Abbas, M.A. (2017). *Campylobacter* in dogs and cats; Its detection and public health significance: A review. *Adv Anim Vet Sci*. **5**(6): 239–248. https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2017/5.6.239.248

Grace, D., Gilbert, J., Randolph, T., Kang'ethe, E. (2012). The multiple burdens of zoonotic disease and an ecohealth approach to their assessment. *Trop Anim Health Prod*, **44**(1): 67–73. 10.1007/s11250-012-0209-y

Granier, A., Goulet, O., Hoarau, C. (2013). Fermentation products: inmmunological Effects on human and animal models. *Pediatr Res*, **74** (2).

Guarner, F., Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *Int J Food Microbiol*, **17**(3): 237-238. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00136-0

Guimarães, A., Venancio, A., Abrunhosa, L. (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on Penicillium nordicum, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, **35**:9: 1803-1818. 10.1080/19440049.2018.1500718

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*, **10**, 107. 10.3389/fcimb.2020.00107

Hall, T.A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Symposium Series, **41**, 95-98. 10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29

Hansson, I., Sandberg, M., Habib, I., Lowman, R., Engvall, E.O. (2018). Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of Campylobacteriosis. *Transbound Emerg Dis*, **65**(1): 30–48. https://doi.org/10.1111/tbed.12870

Jampaphaeng, K., Cocolin, L., Maneerat, S. (2017). Selection and evaluation of functional characteristics of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional fermented stinky bean (Sataw-Dong). *Ann Microbiol*, **67**: 25-36. 10.1007/s13213-016-1233-3

Jayakumar, J., Kumar, V. A., Biswas, L., Biswas, R. (2021). Therapeutic applications of lysostaphin against *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol*, **131**(3): 1072-1082.

Johansson, M.U., de Château, M., Wikström, M., Forsén, S, Drakenberg, T., Björck, L. (1997). Solution structure of the albumin-binding GA module: a versatile bacterial protein domain. *J Mol Biol*, **266**(5):859-65. 10.1006/jmbi.1996.0856

Kaakoush, N.O., Castaño, R.N., Mitchell, H.M., Man, S.M. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev*, **28**(3): 687-720. 10.1128/CMR.00006-15

Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., Kot, A.M. (2021) Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules*. **25;26**(7):1858. 10.3390/molecules26071858

Kourtis, A. P., Hatfield, K., Baggs, J., Mu, Y., See, I…Cardo, D. (2019). Vital Signs: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **68**(9), 214–219. 10.15585/mmwr.mm6809e1

Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial pathogenesis*, **128**, 171–177. 10.1016/j.micpath.2019.01.002

Kushkevych, I., Kotrsová, V., Dordević, D., Buňková, L., Vítězová, M., Amedei, A. (2019). Hydrogen Sulfide Effects on the Survival of Lactobacilli with Emphasis on the Development of Inflammatory Bowel Diseases. *Biomol*, **9**,752. 10.3390/biom9120752

Lääveri, T., Pakkanen, S. H., Kirveskari, J., Kantele, A. (2018). Travellers' diarrhoea: Impact of TD definition and control group design on study results. *Travel Med Infect Disease*, **24**:37–43. 10.1016/j.tmaid.2018.01.006

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685. 10.1038/227680a0

Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Wright, A. (2012). Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. 4thed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. ISBN 0 978-1-4398-3677-4.

Layec, S., Decaris, B., Leblond, B.N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Res Microbiol*. **159**(7-8), 507-515.

Lebeer, S., Verhoeven, L.A.T., Perea, V.V.M., Vanderleyden. J., De Keersmaecker, SCJ. (2007). Biofilm formation by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG: impact of environmental and genetic factors. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 21:6768-6775. 10.1128/AEM.01393-07

LeBlanc, J.G., Levit, R., Savoy de Giori, G. et al. (2020). Application of vitamin-producing lactic acid bacteria to treat intestinal inflammatory diseases. *Appl Microbiol Biotechnol*, **104**, 3331–3337. 10.1007/s00253-020-10487-1

Leccese, T.M.C., Mendoza, L.M., Juárez, T.M.S., Silva, C., Nader, M.M.E. (2014). Phenotypic surface properties and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli. *J Appl Microbiol*, **117**(6): 1761–1772. 10.1111/jam.12642

Leclerc, D., Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Can J Microbiol*, **35**(8): 749-53.10.1139/m89-125

Llorente, B.A. (2008). Caracterización de la actividad antibacteriana de Pediococcus acidilactici ATCC 8042. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. FC-UNAM. Tesiunam. http://132.248.9.195/ptd2008/junio/0628529/Index.html

Llorente, B.A., Pérez, M.S., Farrés, A. (2008). Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus* acidilactici ATCC 8042. Can J Microbiol, 54(8), 694–699. 10.1139/w08-055

Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J.R., Faulks, R.M., John, Wickham, M.S. (2011). Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiol*, **28**(7): 1359-66. 10.1016/j.fm.2011.06.007

Lopez, A.A., Rocha M.D., Ponce, A.E., García, C.I. (2021). Characterization of antibacterial activity of a N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase produced by *Latilactobacillus sakei* isolated from salami. *World J Microbiol Biotechnol*, **37**(4), 65. 10.1007/s11274-021-03033-2

Luo, Y., Ma, B.C., Zou, L.K., *et al*. (2012). Identification and characterization of lactic acid bacteria from forest musk deer feces. *Afr J Microbiol Res* **6**(29):5871–5881. https://doi.org/10.5897/AJMR12.807

Magnusson, J. (2003). Antifungical activity of lactic acid bacteria. Uppsala. Sveriges Lanthbruksuniversitet. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. *Agraria*, **397**. http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-31

Mahesh, M. S., Mohanta, R. K., Patra, A. K. (2021). Probiotics in livestock and poultry nutrition and health. In Microorganisms for sustainability book series. Vol 21. Springer, pp 149-179.

Mare, D.A., Ciurea, C.N., Man, A., Tudor, B., Moldovan, V., Decean, L. (2021). Enteropathogenic *E. coli*-A Summary of the literature. *Gastroenterol*, **12**:28-40. https://doi.org/10.3390/gastroent12010004

Martínez, M.R.M., Montalvo, S.F.D., Magaña A.M., Terán, F.Y, Pérez U.J.T. (2020). Prevalencia y caracterización genotípica de cepas de Staphylococcus aureus resistente a meticilina aisladas en un hospital regional mexicano. *Rev Chil Infectol*, **37**(1), 37-44. https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182020000100037

Matilla, F., Velleman, Y., Harrison, W., Nevel, M. (2018). Animal influence on water, sanitation and hygiene measures for zoonosis control at the household level: A systematic literature review. *PLoS Negl Trop Dis*, **12**(7): e0006619. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006619

Matuszewska, M., Murray, G.G.R., Harrison, E.M., Holmes, M.A., Weinert, L.A. (2020). The Evolutionary Genomics of Host Specificity in *S. aureus*, *Trends Microbiol*, **28**(6), 465-477. https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.12.007

May, T.A.L., Corona C.A.I., Jiménez, A.L.L., Cortés, N.G., Vera, R.J. (2020). Sensibilidad y resistencia a antibióticos de cepas probióticas empleadas en productos comerciales. *ESJ*, **16**(18),43. https://doi.org/10.19044/esj.2020.v16n18p43

Mesnage, S., Dellarole, M., Baxter, N.J., Rouget, J.B., Dimitrov, J.D…Wang, N. (2014) Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains. *Nat Commun*, **30**(5):4269. 10.1038/ncomms5269

Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R., Manicardi, G. (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. Int *J Food Microbiol*, 64(1-2), 193–198. 10.1016/s0168-1605(00)00419-0

Metchnikoff E. (1907). Lactic acid inhibiting intestinal putrefaction. The prolongation of life: Optimistic Studies. Heinemann Press. United Kingdom, London, 161-183.

Min Tze, L. (2011). Probiotic Biology, Genetics and Health Aspects. Springer Verlag. Berlin Heidelberg, 140-160.

Mora, D., Musacchio, F., Fortina, M.G., Senini, L., Manachini, P.L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *P. acidilactici* and *P. pentosaceus* strains. *J Appl Microbiol*. **94**(4):561-70. 10.1046/j.1365-2672.2003.01868.x

Moreno, B. R., Salas, O.E., Pérez, M.C., Jiménez, J.M. (2013). Immunomodulating capacity of potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from human breast milk and lactating children feces. *RSVM*, **33**, 24-27.

Morikawa, M., Tsujibe, S., Kiyoshima-Shibata, J., Watanabe, Y., Kato-Nagaoka, N… Shida, K. (2016). Microbiota of the Small Intestine Is Selectively Engulfed by Phagocytes of the Lamina Propria and Peyer's Patches. *PloS ONE* **11**(10),e0163607. 10.1371/journal.pone.0163607

Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J.L., Ochoa, T.J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *E. coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, **28**(4),648-656.

Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., Fegeros, K. (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poult Sci*, **86**(2), 309–317. 10.1093/ps/86.2.309

Mu, Q., Tavella, V.J., Luo, X.M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Front Microbiol*, **9**: 757. 10.3389/fmicb.2018.00757

Mukisa, I.M., Byaruhanga, Y.B., Muyanja, C.M.B.K., Langsrud, T., Narvhus, J.A. (2016). Production of organic flavor compounds by dominant lactic acid bacteria and yeasts from *Obushera*, a traditional sorghum malt fermented beverage. *Food Sci Nutr*, **5**(3): 702-712. 10.1002/fsn3.450

Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., Maneerat, S. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J Microbiol Biotechnol*, **25**(8): 1337-1345. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0020-8

Nakphaichit, M., Thanomwongwattana, S., Phraephaisarn, C., Sakamoto, N., Keawsompong, S… Nitisinprasert, S. (2011). The effect of including Lactobacillus reuteri KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poult Sci*, **90**(12), 2753–2765. 10.3382/ps.2011-01637

Ohland, C.L., MacNaughton, W.K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epitelial barrer function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **298**, 807-819.

OIE. World Organisation for Animal Health (2015). One Health. http://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/controlling-health-risks/

Oliver, G.R., García, T.C., Juárez, M.L., Navarro, G.F. (2008). Infection of rabbit kidney cells (RK13) by enteropathogenic *Escherichia coli* as a model to study the dynamics of actin cytoskeleton. *Can J Microbiol,* **54**(9):748–57. 10.1139/w08-069

Olvera, G.M., Serrano, M.C., Quirasco, M. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *Bio Tecnol*. **19**(1). 25-43.

OMS. (2021). Resistencia antimicrobiana en Producción animal. https://www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal

Orihuel, A., Terán, L., Renaut, J., Vignolo, G.M., De Almeida, A.M., Saavedra, M.L., Fadda, S. (2018). Differential Proteomic Analysis of Lactic Acid Bacteria *E. coli* O157:H7 Interaction and Its Contribution to Bioprotection Strategies in Meat. *Front Microbiol*, **5**(9):1083. 10.3389/fmicb.2018.01083

Oyewole, O.F., Maria, C.O., Tope, P.S., Funmi, O.O. (2018) In vitro Study of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from The Gut of Chickens in Abeokuta, Nigeria. *AJVS* **58**(1), 73–84. https://doi.org/10.5455/ajvs.290499

Palma, C. J., Llorente, B.A. (2021). Evaluación *in vitro* del potencial antagónico de *Ligilactobacillus murinus* 26B1 aislado de ratón frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Tesis de Maestría en CPySA. FC-UNAM.

Panda, P.S., Chaudhary, U., Dube, S.K. (2016). Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian J Pathol Microbiol*, **59**:177-9. http://www.ijpmonline.org/text.asp?2016/59/2/177/182013

Park, S. H., Itoh, K. (2005) Species-specific oligonucleotide probes for the detection and identification of Lactobacillus isolated from mouse faeces. *J Appl Microbiol* **99**(1), 51–57. 10.1111/j.1365-2672.2005.02584.x

Parra, R. (2010). Review lactic acid bacteria: functional role in the foods. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, **8**(1), 93-105.

Pattanaik, A. K., Kumar, S., Rashmi, H.M. (2022). Probiotics, prebiotics, eubiotics and synbiotics for human and animal health and mitigation of antimicrobial resistance. *Indian J Comp Microbiol Immunol Infect Dis*, **43**,1; 974-147. 10.5958/0974-0147.2022.00011.3

Perelmuter, K., Fraga, M., Zunino, P. (2008). *In vitro* activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *J Appl Microbiol*, **104**:1718–1725. 10.1111/j.1365-2672.2007.03702.x

Piazentin, A. C. M., Mendonça, C. M. N., Vallejo, M., Mussatto, S. I., De Souza Oliveira, R. P. (2022). Bacteriocin-like inhibitory substances production by *Enterococcus faecium* 135 in co-culture with *Ligilactobacillus salivarius* and *Limosilactobacillus reuteri*. *Braz J Microbiol, 53*(1), 131–141. 10.1007/s42770-021-00661-6

Preethi, C., Thumu, S.C.R., Halami, P.M. (2017). Occurrence and distribution of multiple antibiotic-resistant Enterococcus and Lactobacillus spp. from Indian poultry. *Ann Microbiol*, **67**, 395–404. https://doi.org/10.1007/s13213-017-1270-6

Ptaszyńska, A. A., Łętowski, J., Gnat, S., Małek, W. (2012). Application of COI sequences in studies of phylogenetic relationships among 40 Apionidae species. *J Insec Sci,* **12**(16). 10.1673/031.012.1601

Quigley, E. M. (2010). Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. Pharmacol Res, **61**(3), 213–218. 10.1016/j.phrs.2010.01.004

Rabozzi, G., Bonizzi, L., Crespi, E., Somaruga, C., Sokooti, M., Tabibi R… Colosio C. (2012). Emerging zoonoses: the "one health approach". *Saf Health Work*, **3**(1): 77–83.10.5491/SHAW.2012.3.1.77

Reda, W.W., Abdel-Moein, K., Hegazi, A., Mohamed, Y., Abdel-Razik, K. (2016). *Listeria monocytogenes*: An emerging food-borne pathogen and its public health implications. *J Infect Dev Ctries,* **10**(2): 149-54. 10.3855/jidc.6616

Reid, G., Gadir, A.A., Dhir, R. (2019). Probiotics: Reiterating what they are and what they are not. *Front Microbiol*, **12**(10): 424. 10.3389/fmicb.2019.00424

Research and Markets. (2019). Probiotics Market-global forecast to 2023. https://www.researchandmarkets.com/research/lzfc2k/probiotics_market?w=12

Rios, A.Y., Villanueva C.S.J. (2019). Aislamiento de bacterias ácido lácticas de tracto intestinal de ratón infante y caracterización bioquímica primaria y de perfil de carbohidratos. Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos. UNAM. http://132.248.9.195/ptd2019/abril/0787542/Index.html

Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J. L., Rolain, J. M., Blin, O. (2018). *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. *Front Microbiol*, *9*, 2419. 10.3389/fmicb.2018.02419

Salas, J.M.J., Ilabaca, A., Vega, M., García, A. (2016). Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms*, **4**(3): 35. https://doi.org/10.3390/microorganisms4030035

Salgado, A. M., Herrera, D. J., Dinkova, T. D. (2015). Caracterización de patrones de hordeínas en variedades mexicanas de cebada maltera. Tip Rev Esp Cienc Quím Biol, 18(1),43-51.

Sandoval, M.I.L., Llorente, B.A., Montiel, S.J.F., Corona, G.L., Guadarrama, A.Z. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 in a freeze-dried alginate-gum arabic system and its *in vitro* testing under gastrointestinal conditions. *J Microencapsul*, **36**(7):591–602. 10.1080/02652048.2019.1660729

Sarno, E.; Pezzutto, D.; Rossi, M.; Liebana, E.; Rizzi, V. A Review of Significant European Foodborne Outbreaks in the Last Decade. *J Food Protect* **2021**,*84*(12),2059–70. 10.4315/JFP-21-096

Schägger, H., Von, J.G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*. **166**(2):368-79. 10.1016/0003-2697(87)90587-2

Shamloo, E., Hosseini, H., Abdi M.Z., Halberg, Larsen. M… Alebouyeh, M. (2019). Importance of Listeria monocytogenes in food safety: a review of its prevalence, detection, and antibiotic resistance. *Iran J Vet Res*. **20**(4):241-254. PMC6983307

Sharma, A. K., Kumar, S., Dhakan, D. B., Sharma, V. K. (2016). Prediction of peptidoglycan hydrolases-a new class of antibacterial proteins. *BMC genomics*, **17**(1), 1-12.

Shazali, N., Foo, H. L., Loh, T. C., Choe, D. W., Abdul Rahim, R. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler in Malaysia. *Gut pathogens*, **6**(1): 1. 10.1186/1757-4749-6-1

Siedler, S., Balti, R., Neves, A.R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Curr Opin Biotechnol* **56**: 138-146. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015

Singer, J. R., Blosser, E. G., Zindl, C. L., Silberger, D. J., Conlan, S… Weaver, C. T. (2019). Preventing dysbiosis of the neonatal mouse intestinal microbiome protects against late-onset sepsis. *Nat Med* **25,** 1772–1782. 10.1038/s41591-019-0640-y

Söhngen, C., Bunk, B., Podstawka, A., Gleim, D., Overmann, J. (2014). BacDive the Bacterial Diversity Metadatabase. doi:10.13145/bacdive6484.20211221.6

Sornplang, P., Piyadeatsoontorn, S. (2016) Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *J Anim Sci Technol* **58**, 26. 10.1186/s40781-016-0108-2

Sorrondegui, M.G., López, D.V., Carcassés, V.A. (2012). Empleo de probióticos en animales. Sitio Argentino de Producción, 1-8.

Stepanović, S., Cirković, I., Ranin, L., Svabić-Vlahović, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*, **38**(5), 428–432. 10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x

Sun, Z., Wang, X., Zhang, X., Wu, H., Zou, Y ... Wang, D. (2018). Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 45(3), 213–227. 10.1007/s10295-018-2008-6

Szweda, P., Schielmann, M., Kotlowski, R., Gorczyca, G., Zalewska, M., Milewski, S. (2012). Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **96(**5), 1157–1174. 10.1007/s00253-012-4484-3

Talebi, A., Amirzadeh, B., Mokhtari, B., Gahri, H. (2008). Effects of a multi-strain probiotic on performance and antibody responses to Newcastle disease virus and infectious bursal disease virus vaccination in broiler chickens. *J WVPA*, **37**(5), 509–512. 10.1080/03079450802356995

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, **28**(10), 2731-2739. 10.1093/molbev/msr121

United Nations. (2015). Sustainable development Goals. 17 goals to transform our world. https://www.un.org/sustainabledevelopment/

Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, P.E., Opdenakker, G. (2013). Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods*, **10**(3), 211–220. https://doi.org/10.1038/nmeth.2371

Varela, G., Jasinski, C., Gadea, P., Tanzi, M. N., Mota, M. I… Arenas, C. (2007). *E. coli* enteropatógeno (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Rev Med Uruguay*, ***23***(3), 153-163.

Vargas ,G.C.E., Petrova, M., Claes, I.J., De Boeck, I., Verhoeven, T. L… Lebeer, S. (2015). Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages. *Appl Environ Microbiol*, **81**(6), 2050–2062. 10.1128/AEM.03949-14

Vidhyasagar, V., Jeevaratnam, K. (2012). Isolation and characterization of Pediococcus pentosaceus from Idly batter.*Biosci Biotech Res Asia*, **9**(1), 427-431. 10.13005/bbra/1019

Walker, L. J., Wallace, R. L., Smith, J. J., Graham, T., Saputra, Glass, K, *et al*. (2019). Prevalence of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejun*i in Retail Chicken, Beef, Lamb, and Pork Products in Three Australian States. *J Food Prot*, **82**(12), 2126–2134. 10.4315/0362-028X.JFP-19-146

Wang, J., Zhang, W., Wang, S., Liu, H., Zhang, D., Wang, Y., Ji, H. (2019). Swine-Derived Probiotic *Lactobacillus plantarum* Modulates Porcine Intestinal Endogenous Host Defense Peptide Synthesis Through TLR2/MAPK/AP-1 Signaling Pathway. *Front Immunol*, **10**, 2691. 10.3389/fimmu.2019.02691

Wedajo, B. (2015). Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food. *Journal of Probiotics & Health*, **03**:2. 10.4172/2329-8901.1000129

Wessel, D., Flügge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**(1): 141-3. 10.1016/0003-2697(84)90782-6

WHO. (2012). Research Priorities for Zoonoses and Marginalized Infections Geneva World Health Organization.

WHO. (2018) Listeriosis. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis

WHO. (2018). *Campylobacter*. https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/campylobacter

WHO. (2021). World Health Organization publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms

Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J…Holmes, A. E. (2017). Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Res Rev J Eng Technol*, 6(4).

Yanagida, F., Chen, Y.S., Shinohara, T. (2006). Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil. *J Gen Appl Microbiol* **52**(1), 21–8. 10.2323/jgam.52.21

Yang, D., Lyu, W., Hu, Z., Gao, J., Zheng, Z., Wang, W., Firrman, J., Ren, D. (2021). Probiotic Effects of *Lactobacillus fermentum* ZJUIDS06 and *Lactobacillus plantarum* ZY08 on Hypercholesteremic Golden Hamsters. *Front Nutr*, **8**, 705763. 10.3389/fnut.2021.705763

Yang, S.C., Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol*,**5**,241. 10.3389/fmicb.2014.00241

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H… Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, **70**(4), 2782–2858. 10.1099/ijsem.0.004107

ANEXOS

Anexo 1

Secuencias obtenidas de los cromatogramas de las 18 cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón

Cepa 1_Forward

```
    10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGGAGGGGTTCCACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCC

       110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|.
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAA
```

Cepa 1_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGCTGGCTTCAGTCGGCTAGCATCATTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCT

       110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCACAGTGTTACTCCA

         210       220       230       240       250
....|....|....|....|....|....|....|....|....|.
AAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATTGGCATGAAAAAAGGA
```

Cepa 2_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90     100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AACAGGGGTTCCACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCC

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGGACTGAGACAA
```

Cepa 2_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATTTGATTCAGTCGGCTCGCATCATTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTT

         110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCAAGTGTTACTCCAA

         210       220       230       240
....|....|....|....|....|....|....|....|..
AGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAAAGGTTCATGGGGACGAAAAAA
```

Cepa 3_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCCAGGGGTTCCACTTGGACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCC

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAA
```

Cepa 3_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CATTAGTCGGCTCGCATCATTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTTTTACA

         110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCACGTGTTACTCCAAGGCAA

         210       220       230       240       250       260
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
TAATGCTGCGAACTGAAGGTGATAGGGGAGGAGAAAAGGAAAAGAACGCAAGAGAAGGAGTA
```

Cepa 4_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGCGGGGTTCCACTTGGACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCG

        110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGCACTGAGACA
```

Cepa 4_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TAACTCGTTTCGGCTTACGCATCATTTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCT

         110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCACAGTGTTACTTTG

         210       220       230       240
....|....|....|....|....|....|....|....|
AAAGCAATAATGCTACCGAACTGAAGGTTAATGGGCATAAAAAAA
```

Cepa 5_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGACAGGGGTATCCACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTTACCCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATG

        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGGACTGAGACA
```

Cepa 5_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCTCATTCGGTTCGGCTACGCATCATTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCT

         110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCAAGTGTTACTTTG

         210       220       230       240       250       260       270
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAGGTGGTAGCGGACTAGGGTTATCGCCATTGGGACTGAGAAAAATGGGGGGGGGGGGGAGGGAGTGTAGAGGAAA
```

Cepa 6_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TACGGGGTTCCACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCC

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|.
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAA
```

Cepa 6_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CTTTCATTCGGCTTACGCATCATTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTTTT

        110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|.
ACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCAACGTGTTACTT
```

Cepa 7_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCAAGGGGTTCCCTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCC

        110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAA
```

Cepa 7_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TAGTAATTGATTCGGCTTACGCATCATTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACC

        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTTACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCACGTGTTACTCC

        210       220       230       240       250       260
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
AAGAGATGAGCGTAGCGAACGGAAGTTATCTCGGGAGAAAAAGGGGGGGGGGGGGGAAGGGGGGAAGAA
```

Cepa 8_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCTGCGGAGTACTATTGGAACGATAGCTAATACCGCATAACAATGGGTGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTCCACTACAAGATGGACCT

        110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCGTTGTATTAACTAGTAGGTGAGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATACATAGCCCACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAA
```

Cepa 8_Reverse

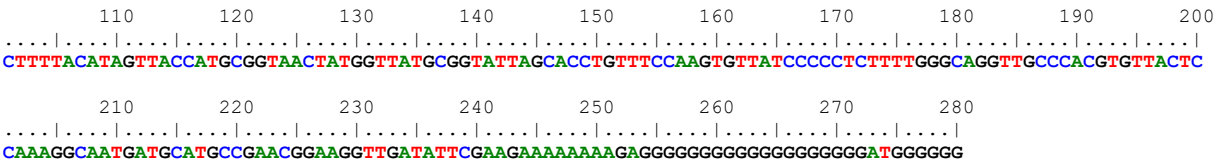
```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AATTAACATGGGTCGGCTATGTATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCTCACCTACTAGCTAATACAACGCAGGTCCATCTTGTAGTGGAGCAATTGCCCC

        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTCAAATAAATGACATGTGTCACCCATTGTTATGCGGTATTAACTATCGTTTCCAATAGTTATCCCCCGCTACAAGGCAGGTTGCCCACGTGTTACTCC

..
AA
```

Cepa 9_Forward

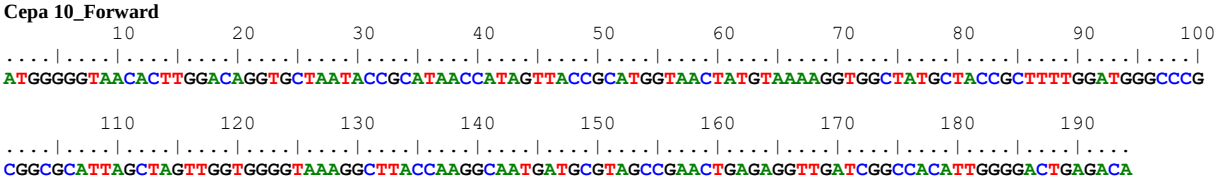
```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CCGGGGGTACCACTTGGACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCCG

        110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGGACTGAGACAA
```

Cepa 9_Reverse

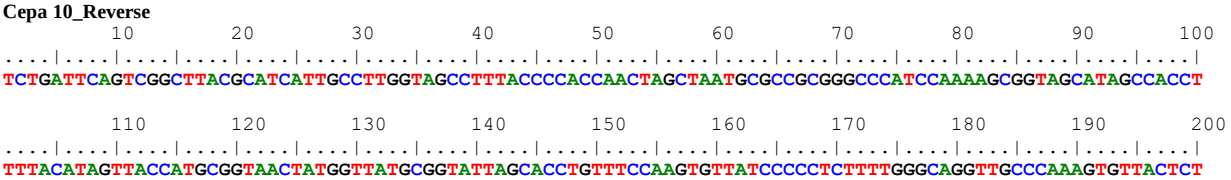
```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCGGATTCATTTCGGCTTACGCATCATTTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCAC
```



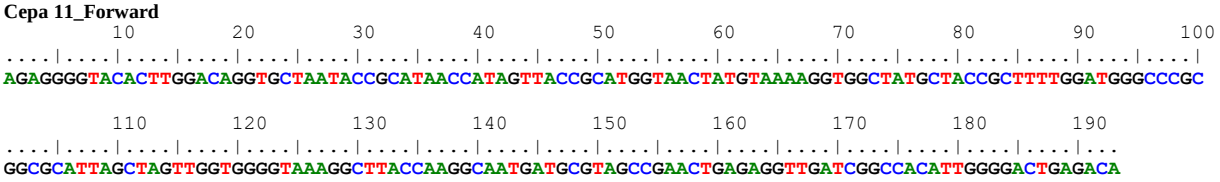
Cepa 10_Forward



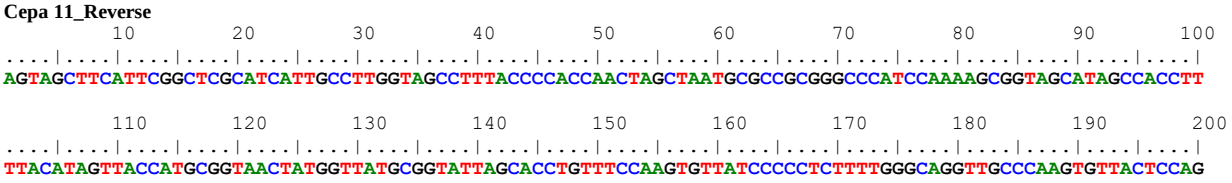
Cepa 10_Reverse



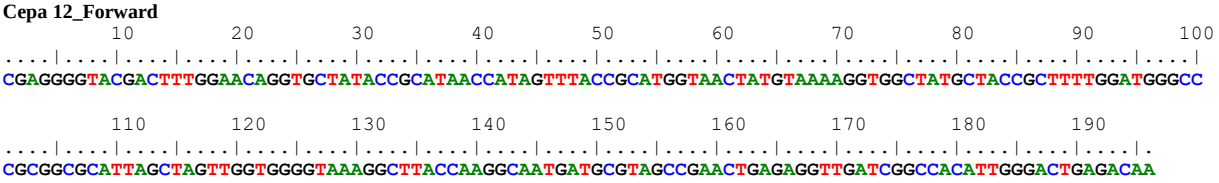
Cepa 11_Forward



Cepa 11_Reverse



Cepa 12_Forward



Cepa 12_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90        100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACTTATCATTCGGCTACGCATCATTGCCTTGGTAAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTT

        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCACGTGTTACTCCAA

        210       220       230       240       250       260       270
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
AGGCAGGATGCGTAACCGAACGGGGAGGTGATCGGGCAGAGAAAGGGAAGAGGGAGTGGTAGAGGGGAGAGAT
```

Cepa 13_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90        100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGCAGGGGTATACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGG

        110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGGACTGAGACAA

Cepa 13_Reverse
         10        20        30        40        50        60        70        80        90        100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCGAATTCGTCGGCTACGCATCATTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTTT

         110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCAAGTGTTACTCCAAA

         210       220       230       240       250
....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGCAATGATGTGTATCCGAACTGGAGGGGTTGATGGGGATGAAAAAAAAT
```

Cepa 14_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90        100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGCAGGGGGGTACACTTGGACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCC

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|.
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACAA

Cepa 14_Reverse
         10        20        30        40        50        60        70        80        90        100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CACTGTTCGGCTCGCATCATTGCCTTGGTAAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTTTTAC

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
ATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCAACGTGTTACTC
```

Cepa 15_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90        100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGGCAGGGGTATAACTTTGGAACAGGTGCTATACCGCATAACCATAGTTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGG

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACA

Cepa 15_Reverse
         10        20        30        40        50        60        70        80        90        100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GAAAGTCTCTGTCTTAGCCTTCATTTGCCTTGGTTAGCCTTTTTTATTCCACCAACTAGCTAATGCGCTCGCCGGGCCCATCCCAAAAGCCGGTAGCATAG
```

```
        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CCACCTTTTACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCACGTGTT

        210
....|....|....|
ACTTAGTTTGTCTCG
```

Cepa 16_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGGTCAGGGGTATCGGCTTTGGAACAGGTGCCTATACCGCATAACCATAGTTTATCGCATGGTAATATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATG

        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....| .
GGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGAATGCGTACCCAAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGAAACTGAGAC A
```

Cepa 16_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAATTTCTTTGGTTAGCCTCCTTTGCCTTGGTAGCCTTTACTCACAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCTCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTTTTAC

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCACGTGTTACTTAA
```

Cepa 17_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CCGGGGGGTTCCACTTGGAACAGGTGCTATACCGCATAACCATAGTTTACGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGCCC

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGGACTGAGACA
```

Cepa 17_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CATTATCTCGGTTACGCACCTTTGCTTGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTTTTACA

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCACAGTGTTACTTTA
```

Cepa 18_Forward

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAGTACGGGGTTCCACTTGGACAGGTGCTAATACCGCATAACCATAGTTACCGCATGGTAACTATGTAAAAGGTGGCTATGCTACCGCTTTTGGATGGGC

         110       120       130       140       150       160       170       180       190
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|..
CCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTAAAAACTGAGACA
```

Cepa 18_Reverse

```
         10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GATTTAATTTCGGCTACGCCATCCTTGCCTTGGTAGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCAAAAGCGGTAGCATAGCCACCTT

        110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTACATAGTTACCATGCGGTAACTATGGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCTCTTTTGGGCAGGTTGCCCACAGTGTTACTTTA
```

Anexo 2

Cuadro 15. Cinéticas de crecimiento de las cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón, incubadas a 37±2ºC en medio MRS (log UFC mL^{-1}). Datos expresados en valores de medias ± desviación estándar (n=3)

	log (UFC mL^{-1})						
Cepa	**0h**	**4h**	**8h**	**12h**	**16h**	**20h**	**24h**
1. *L. murinus* A1	7.21 ± 0.10	8.44 ± 0.37	8.87 ± 0.29	9.11± 0.43	8.99 ± 0.39	8.96 ± 0.38	8.92 ± 0.29
2. *L. murinus* A2	5.89 ± 0.17	7.26 ± 0.58	6.32 ± 0.59	6.58 ± 0.18	5.80 ± 0.16	5.59 ± 0.11	5.94 ± 0.22
3. *L. murinus* B1	6.28 ± 0.61	7.40 ± 0.55	7.30 ± 0.74	6.94 ± 0.18	6.60 ± 0.20	6.58 ± 0.19	6.69 ± 0.22
4. *L. murinus* C1	6.81 ± 0.21	8.09 ± 0.21	8.49 ± 0.65	8.47 ± 0.61	8.57 ± 0.48	8.12 ± 0.18	8.26 ± 0.25
5. *L. murinus* D1	5.62 ± 0.10	6.57 ± 0.30	6.77 ± 0.07	6.94 ± 0.38	6.56 ± 0.23	6.59 ± 0.17	6.47 ± 0.23
6. *L. murinus* E1	6.73 ± 0.30	7.77 ± 0.43	8.02 ± 0.62	7.55 ± 0.81	7.68 ± 0.85	7.54 ± 0.26	7.74 ± 0.44
7. *L. murinus* E2	6.52 ± 0.44	7.88 ± 0.51	7.58 ± 0.51	7.30 ± 0.39	6.62 ± 0.29	6.65 ± 0.30	6.75 ± 0.39
8. *L. murinus* E3	6.00 ± 0.52	8.16 ± 0.26	7.76 ± 0.22	7.16 ± 0.49	6.85 ± 0.60	6.80 ± 0.56	6.88 ± 0.43
9. *S. salivarius* E4	7.17 ± 0.12	9.14 ± 0.51	8.93 ± 0.63	8.88 ± 0.28	8.85 ± 0.23	8.34 ± 0.38	8.38 ± 0.52
10. *L. murinus* E5	6.86 ± 0.18	7.70 ± 0.33	8.59 ± 0.31	8.32 ± 0.33	7.26 ± 0.34	7.36 ± 0.61	6.93 ± 0.21
11. *L. murinus* F1	6.10 ± 0.23	7.17 ± 0.17	7.52 ± 0.31	7.46 ± 0.44	6.96 ± 0.23	6.66 ± 0.36	6.73 ± 0.11
12. *L. murinus* F2	6.83 ± 0.37	8.22 ± 0.41	9.24 ± 0.43	9.30 ± 0.40	9.39 ± 0.16	9.24 ± 0.30	9.19 ± 0.41
13. *L. murinus* F3	6.25 ± 0.37	7.13 ± 0.20	7.54 ± 0.41	7.98 ± 0.36	7.85 ± 0.04	7.71 ± 0.50	7.77 ± 0.50
14. *L. murinus* G1	7.18 ± 0.01	8.36 ± 0.23	9.20 ± 0.19	9.24 ± 0.18	8.48 ± 0.23	8.13 ± 0.04	8.25 ± 0.29
15. *L. murinus* H1	5.35 ± 0.16	6.23 ± 0.16	6.28 ± 0.03	6.22 ± 0.05	6.28 ± 0.25	6.15 ± 0.25	6.15 ± 0.45
16. *L. animalis* H2	7.79 ± 0.20	8.79 ± 0.07	9.46 ± 0.11	9.42 ± 0.31	9.23 ± 0.34	9.43 ± 0.18	9.38 ± 0.20
17. *L. murinus* H3	5.83 ± 0.05	6.20 ± 0.51	7.06 ± 0.43	6.98 ± 0.25	6.08 ± 0.08	6.35 ± 0.12	6.30 ± 0.35
18. *L. murinus* I1	5.91 ± 0.30	6.52 ± 0.50	7.88 ± 0.25	7.73 ± 0.35	6.76 ± 0.26	6.70 ± 0.26	6.77 ± 0.19

Anexo 3

Cuadro 16. Cinéticas de crecimiento de las cepas de BL aisladas de tracto intestinal de ratón, incubadas a 37±2ºC en medio MRS (D.O. $_{600nm}$). Datos expresados en valores de medias ± desviación estándar (n=3)

	D.O.						
Cepa	**0h**	**4h**	**8h**	**12h**	**16h**	**20h**	**24h**
1. *L. murinus* A1	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.60 ± 0.07	0.68 ± 0.05	0.82 ± 0.03	0.83 ± 0.05	0.85 ± 0.03
2. *L. murinus* A2	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.00	0.64 ± 0.05	0.68 ± 0.09	0.73 ± 0.02	0.75 ± 0.03	0.79 ± 0.02
3. *L. murinus* B1	0.09 ± 0.01	0.32 ± 0.09	0.67 ± 0.04	0.68 ± 0.05	0.77 ± 0.04	0.79 ± 0.03	0.80 ± 0.04
4. *L. murinus* C1	0.09 ± 0.01	0.29 ± 0.08	0.67 ± 0.06	0.74 ± 0.05	0.71 ± 0.09	0.74 ± 0.06	0.875 ± 0.03
5. *L. murinus* D1	0.09 ± 0.01	0.20 ± 0.05	0.60 ± 0.15	0.64 ± 0.10	0.70 ± 0.09	0.66 ± 0.10	0.65 ± 0.05
6. *L. murinus* E1	0.09 ± 0.01	0.28 ± 0.08	0.63 ± 0.08	0.70 ± 0.08	0.75 ± 0.01	0.80 ± 0.14	0.82 ± 0.04
7. *L. murinus* E2	0.09 ± 0.01	0.28 ± 0.10	0.58 ± 0.07	0.65 ± 0.07	0.73 ± 0.11	0.78 ± 0.11	0.79 ± 0.05
8. *L. murinus* E3	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.06	0.63 ± 0.06	0.69 ± 0.11	0.73 ± 0.07	0.72 ± 0.10	0.77 ± 0.01
9. *S. salivarius* E4	0.09 ± 0.01	0.27 ± 0.05	0.51 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.57 ± 0.07	0.58 ± 0.09	0.58 ± 0.05
10. *L. murinus* E5	0.09 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0.54 ± 0.02	0.66 ± 0.06	0.70 ± 0.06	0.74 ± 0.01	0.72 ± 0.06
11. *L. murinus* F1	0.09 ± 0.01	0.34 ± 0.07	0.79 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.84 ± 0.08	0.85 ± 0.05	0.86 ± 0.09
12. *L. murinus* F2	0.08 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.55 ± 0.08	0.72 ± 0.04	0.77 ± 0.06	0.81 ± 0.04	0.78 ± 0.05
13. *L. murinus* F3	0.08 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.71 ± 0.04	0.75 ± 0.03	0.82 ± 0.01	0.85 ± 0.01	0.83 ± 0.05
14. *L. murinus* G1	0.08 ± 0.00	0.20 ± 0.07	0.46± 0.02	0.67 ± 0.04	0.68 ± 0.02	0.70 ± 0.01	0.71 ± 0.02
15. *L. murinus* H1	0.08 ± 0.01	0.22 ± 0.04	0.60 ± 0.02	0.69 ± 0.01	0.67 ± 0.06	0.67 ± 0.01	0.68 ± 0.07
16. *L. animalis* H2	0.10 ± 0.00	0.39 ± 0.06	0.98 ± 0.09	1.12 ± 0.05	1.04 ± 0.08	1.05 ± 0.07	1.06 ± 0.08
17. *L. murinus* H3	0.09 ± 0.01	0.30 ± 0.07	0.68 ± 0.09	0.67 ± 0.08	0.66 ± 0.06	0.67 ± 0.05	0.66 ± 0.04
18. *L. murinus* I1	0.09 ± 0.00	0.26 ± 0.05	0.64 ± 0.09	0.68 ± 0.01	0.72 ± 0.05	0.75 ± 0.02	0.72 ± 0.02

Anexo 4

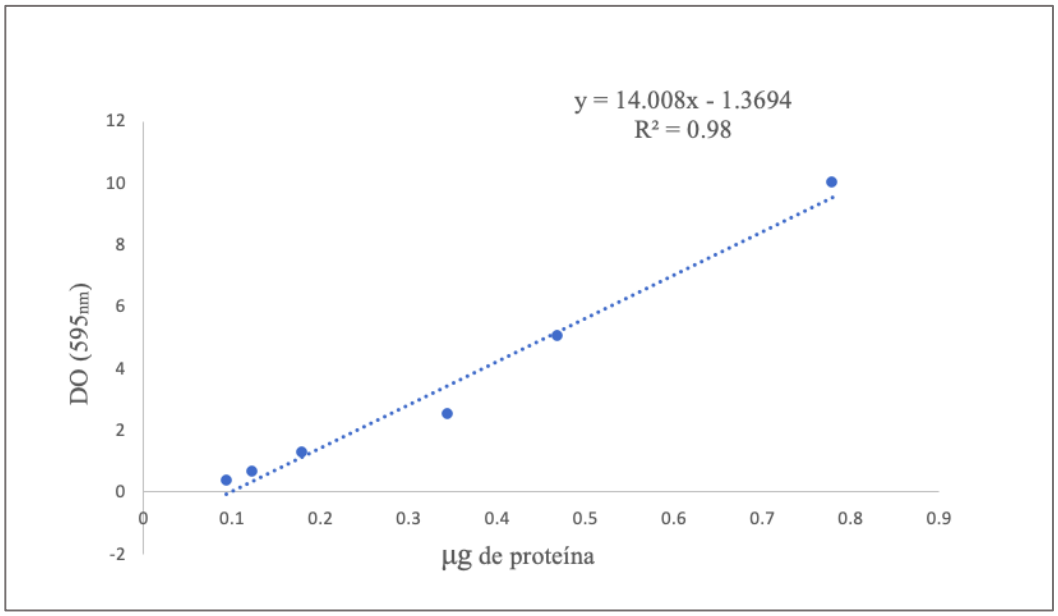


Figura 27. Curva estándar con Albúmina Sérica Bovina

Anexo 5

Preparación de soluciones para geles glicina SDS-PAGE

1. Buffer gel separador Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8

Tris base 18.15 g

Agua desionizada estéril 80 mL

Ajustar pH a 8.8 con HCl concentrado y aforar hasta 100 mL

2. Buffer gel concentrador Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8

Tris base 6 g

Agua desionizada estéril 60 mL

Ajustar pH a 6.8 con HCl concentrado y aforar hasta 100 mL

3. SDS 10% (p/v)

SDS 10 g

Agua desionizada estéril 90 mL

Disolver y aforar hasta 100 mL

4. Persulfato amónico (APS) 10% (p/v)

APS 0.1 g

Agua desionizada estéril 1.0 mL

Almacenar en Tubo eppendorf a -20ºC

5. Bis/Acrilamida (30%T, 2.67%C)

Acrilamida 29.2 g

NN-Bis-metilacrilamida 0.80 g

Agua desionizada estéril 80 mL

Aforar hasta 100 mL, almacenar en un frasco envuelto con papel aluminio a 4ªC (máximo 30 días)

6. Running Buffer 10x, pH 8.3 (1 L)

Tris base	30.3 g
Glycine	144 g
SDS	10 g
Agua desionizada estéril	1000 mL

No ajustar pH. Para su uso disolver 50 mL de Running Buffer 10x en 450 mL de agua desionizada.

7. Solución de teñido

Azul de coomassie (R-250)	1.0 g
Ácido acético	100 mL
Metanol	400 mL
Agua desionizada estéril	1000 mL

8. Solución decolorante

Etanol	100 mL
Ácido acético	50 mL
Metanol	200 mL
Agua desionizada estéril	650 mL

Cuadro 17. Preparación de soluciones para SDS-PAGE (Laemmli), formulación de geles (10 mL)

Solución	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
H_2O desionizada estéril	6 mL	3.4 mL
Acrilamida/bis acrilamida, (30%T, 2.67%C)	1.3 mL	4 mL
Gel amortiguador separador 2M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.5 mL
Gel amortiguador concentrador 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL	-
SDS, 20% (p/v)	0.1 mL	0.1 mL
TMED	10 µl	5 µl
APS, 10% (p/v)	50 µl	50 µl

Anexo 6

Preparación de soluciones para técnicas Zimográficas

1. Solución renaturalizante Tris HCl 25 mM con tritón al 1%(v/v), pH 8

Tris base	1.51 g
Tritón	5 mL
Agua desionizada estéril	500 mL

2. Solución de teñido

Azul de metileno	1.0 g
KOH	0.1 g
Agua desionizada estéril	100 mL

Anexo 7

Preparación de soluciones para geles tricina SDS-PAGE

1. Buffer del gel Tris-HCl 3 M, pH 8.45

Tris base	36.4 g
SDS	0.3 g
Agua desionizada estéril	60 mL

Ajustar pH a 8.45 con HCl concentrado y aforar hasta 100 mL, almacenar a temperatura ambiente.

2. Bis/Acrilamida (49.5%T, 3%C)

Acrilamida	48.3 g
NN-Bis-metilacrilamida	1.7 g
Agua desionizada estéril	80 mL

Aforar hasta 100 mL, almacenar en un frasco envuelto con papel aluminio a 4ªC (máximo 30 días)

3. Buffer superior del cátodo (interno), pH 8.25 (1 L)

Tris base (0.1 M) 12.11 g

Tricina (0.1 M) 17.93 g

SDS 0.1% 1 g

Agua desionizada estéril 1000 mL

Ajustar pH a 8.25 con HCl concentrado, almacenar a temperatura ambiente.

4. Buffer inferior del ánodo (externo), pH 8.93 (1 L)

Tris base (0.2 M) 24.06 g

Agua desionizada estéril 1000 mL

Ajustar pH a 8.93 con HCl concentrado, almacenar a temperatura ambiente.

Cuadro 18. Preparación de soluciones para geles tricina SDS-PAGE, formulación de geles (10 mL)

Solución	Gel concentrador 4%	Gel separador 16%
H_2O desionizada estéril	1.25 mL	940 µL
Acrilamida/bis acrilamida (49.5%T, 3%C)	250 µL	3 mL
Buffer del gel Tris-HCl 3 M, pH 8.45	500 µL	2.66 mL
Glicerol 70%	-	1.4 mL
APS, 10% (p/v)	20 µL	80 µL
TMED	2.5 µL	5 µL

Anexo 8

Cuadro 19. Sobrevivencia de *L. murinus* B1 simulado (log UFC mL^{-1}) a condiciones en medio gástrico. Datos expresados en valores de medias ± desviación estándar (n=5).

Grupo	Tiempo (h)	Media	DE	N
control	0	6.68	0.16	5
	2	6.48	0.16	5
	4	6.49	0.25	5
pH 4	0	6.88	0.18	5
	2	6.41	0.25	5
	4	6.39	0.16	5
pH 2	0	6.85	0.19	5
	2	6.00	0.45	5
	4	0.00	0	5

Cuadro 20. Porcentaje de sobrevivencia de *L. murinus* B1 en medio gástrico simulado. Datos expresados en valores de medias ± desviación estándar (n=5).

	Tiempo (horas)		
Grupo	**0**	**2**	**4**
pH 2	82.09 ± 8.07	67.87 ± 5.35	0 ± 0
pH 4	82.27 ± 7.55	94.04 ± 5.28	81.74 ± 5.87

Anexo 9

Cuadro 21. Sobrevivencia de *L. murinus* B1 (log UFC mL-1) a condiciones en medio intestinal simulado. Datos expresados en valores de medias ± desviación estándar (n=5).

Grupo	Tiempo (h)	Media	DE
control	0	7.15	0.02
	2	7.09	0.02
	4	7.02	0.05
0.3%	0	7.11	0.05
	2	6.15	0.27
	4	5.78	0.39
0.6%	0	6.93	0.1
	2	6.44	0.31
	4	5.64	0.29

Cuadro 22. Porcentaje de sobrevivencia de *L. murinus* B1 en medio intestinal simulado. Datos expresados en valores de medias ± desviación estándar (n=5).

	Tiempo (horas)		
Grupo	**0**	**2**	**4**
0.3%	91 ± 3.01	13 ± 0.60	8 ± 2.15
0.6%	61 ± 6.85	25 ± 2.06	4.94 ± 1.45

Anexo 10

Cuadro 23. Formación de biopelículas en placas de poliestireno. Datos expresados en valores de medias ± desviación estándar (n=20) de la DO_{595nm} del cristal violeta solubilizado de los cultivos.

	Tiempo (h)		
Cepas	**24**	**48**	**72**
Control (MRS)	0.049 ± 0.01	0.052 ± 0.01	0.049 ± 0.01
Lact. murinus	0.063 ± 0.01	0.065 ± 0.01	0.245 ± 0.01
Lact. rhamnosus	0.059 ± 0.01	0.064 ± 0.01	0.093 ± 0.01

Cuadro 24. Formación de biopelículas en tubos de vidrio. Análisis de varianza ANOVA de dos vías. Datos expresados en valores de medias ± desviación estándar (n=20) de la DO_{595nm} del cristal violeta solubilizado de los cultivos.

	Tiempo (h)		
Cepas	**24**	**48**	**72**
Control (MRS)	0.44±0.15	0.36±0.19	0.32±0.11
Lact. murinus	2.34±0.33	2.15±0.14	1.51±0.70
Lact. rhamnosus	0.92±0.39	0.97±0.29	0.97±0.14

Anexo 11

Cuadro 25. Adherencia a mucinas inmovilizadas en placas de poliestireno (OD $_{490nm}$). Datos expresados como valores de medias $\pm$ y desviación estándar (n=20)

Cepas	**Condición**	**DO$_{490nm}$**
MRS (control)	Pre lavado	0.067±0.01
	post lavado	0.054±0.00
Lact. murinus	Pre lavado	0.204±0.01
	post lavado	0.118±0.02
L. rhamnosus	Pre lavado	0.263±0.02
	post lavado	0.141±0.01

microorganisms

MDPI

Article

Ligilactobacillus murinus Strains Isolated from Mice Intestinal Tract: Molecular Characterization and Antagonistic Activity against Food-Borne Pathogens

Ivonne Lizeth Sandoval-Mosqueda [1], Adriana Llorente-Bousquets [2,*], Carlos Soto [3], Crisóforo Mercado Márquez [3], Silvina Fadda [4] and Juan Carlos Del Río García [3]

[1] Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastian Xhala, Cuautitlán Izcalli 54714, Mexico
[2] Ingeniería y Tecnología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastian Xhala, Cuautitlán Izcalli 54714, Mexico
[3] Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastian Xhala, Cuautitlán Izcalli 54714, Mexico
[4] Centro de Referencia para Lactobacilos, Batalla de Chacabuco 145 sur, San Miguel de Tucumán T4000, Argentina
* Correspondence: llorente@unam.mx; Tel.: +52-155-5623-1999 (ext. 39417)

Abstract: Considering the objectives of "One Health" and the Sustainable development Goals "Good health and well-being" for the development of effective strategies to apply against bacterial resistance, food safety dangers, and zoonosis risks, this project explored the isolation and identification of *Lactobacillus* strains from the intestinal tract of recently weaned mice; as well as the assessment of antibacterial activity against clinical and zoonotic pathogens. For molecular identification, 16S rRNA gene-specific primers were used and, via BLAST-NCBI, 16 *Ligilactobacillus murinus*, one *Ligilactobacillus animalis*, and one *Streptococcus salivarius* strains were identified and registered in GenBank after the confirmation of their identity percentage and the phylogenetic analysis of the 16 *Ligilactobacillus murinus* strains and their association with *Ligilactobacillus animalis*. The 18 isolated strains showed antibacterial activity during agar diffusion tests against *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, enteropathogenic *Escherichia coli* O103, and *Campylobacter jejuni* ATCC 49943. Electrophoretic and zymographic techniques confirmed the presence of bacteriolytic bands with a relative molecular mass of 107 kDa and another of 24 kDa in *Ligilactobacillus murinus* strains. UPLC-MS analysis allowed the identification of a 107 kDa lytic protein as an N-acetylmuramoyl-L-amidase involved in cytolysis and considered a bacteriolytic enzyme with antimicrobial activity. The 24 kDa band displayed similarity with a portion of protein with aminopeptidase function. It is expected that these findings will impact the search for new strains and their metabolites with antibacterial activity as an alternative strategy to inhibit pathogens associated with major health risks that help your solution.

Keywords: lactic acid bacteria; *Lactobacillus*; bioinformatics; food-borne pathogens; lytic activity

check for updates

Citation: Sandoval-Mosqueda, I.L.; Llorente-Bousquets, A.; Soto, C.; Márquez, C.M.; Fadda, S.; Del Río García, J.C. *Ligilactobacillus murinus* Strains Isolated from Mice Intestinal Tract: Molecular Characterization and Antagonistic Activity against Food-Borne Pathogens. *Microorganisms* **2023**, *11*, 942. https://doi.org/10.3390/microorganisms11040942

Academic Editor: Alex Galanis

Received: 1 March 2023
Revised: 26 March 2023
Accepted: 29 March 2023
Published: 4 April 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Zoonotic diseases, food safety dangers, and bacterial resistance are related and affect human, animal, and environmental health. Hence, the "One Health" comprehensive approach acknowledges the significant need to develop effective strategies to solve these global health issues [1]. In that sense, food-borne diseases, especially zoonotic diseases, are the cause of morbidity and mortality globally. In accordance with the European Food Safety Authority, *Campylobacter* spp. is the main zoonotic agent that causes diarrheic disease, with 120,946 cases, 8605 hospital admissions, and 45 deaths, which represents over 60% of the cases reported as of 2020 in the European Union. Enteropathogenic *E. coli* is acknowledged as the most important cause of acute diarrheal disease in children under four years old, and Shiga toxin-producing strains of *E. coli* (STEC) are highly virulent and associated with

4446 cases, 652 hospital admissions, and 13 deaths. In this case, enteropathogenic *E. coli* isolated from rabbit kidney (REPEC) O103 was used as the reference strain in this study [2]. *Listeria monocytogenes* is one of the most severe food-borne pathogens, with 1876 cases, 780 hospital admissions, and 167 deaths, with a fatality rate of 30%. The number of cases related to *L. monocytogenes* has increased over the last four years [3].

The use of antimicrobials at a large scale has been documented in animal production. In addition to causing resistant bacteria that, in turn, provoke infections in humans, it has been found that animals excrete a significant percentage (75–90%) of non-metabolized antimicrobials, which are scattered in the environment [4]. The increased resistance to antibiotics in these pathogens contributes to the severity of the diseases they provoke, as observed recently in human and animal isolations of multi-resistant *Campylobacter* spp. and *E. coli* strains [5,6].

Among the key strategies to address the constant infectious illnesses and emerging challenges, the One Health approach and the objective to achieve good health and well-being are considered. Both are essential multi-faceted frameworks to promote good health for everyone. Taking into account the importance of health for sustainable development, the 2030 Agenda highlights the complexity and interconnection of both schemes and considers the emerging global health priorities as well, which are not explicitly included in the sustainable development goals but require action, as it is the case of antimicrobial resistance [7]. Among the development of alternatives to reduce the use of antimicrobials is the use of vaccines, phage therapy and probiotics [4]. Probiotics are defined as "alive microorganisms that, when administered in adequate quantities, have a beneficial impact on the health of the host [8]. Among the studied beneficial effects are the control of pathogens, immunologic effects such as the preservation of the intestinal barrier, and immunomodulatory activity. Lactic Acid Bacteria (LAB) are the primary microorganisms used as probiotics. These are administered with the purpose of controlling pathogen microorganisms and improving the natural defense mechanisms of humans and animals. It has been suggested that the use of these strains in animal production can reduce the risk of pathogen transference from food to humans, and it can be an alternative to the use of antibiotic growth promoters, therefore reducing the development of bacterial resistance [9].

LABs are a heterogeneous group of microorganisms characterized by the production of lactic acid from the fermentation of carbohydrates. Throughout history, they have been used in the production and preservation of fermented food, and in 1988 the Code of Federal Regulations defined them as microorganisms Generally Recognized as Safe (GRAS) [10,11]. The preservation of food with LAB is attributed to the production of several metabolites with antimicrobial activity, such as organic acids, hydrogen peroxide, reuterin, diacetyl, and protein nature substances such as bacteriocins, peptidoglycan hydrolases (PGH) or bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) [12,13]. Several studies have shown that LAB and their metabolites can inhibit pathogen microorganisms, such as *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, and *E. coli*, so they represent an important line of research among different groups that look for the characterization of bacterial antagonism phenomena as an alternative against resistant pathogens for their use in animal production, safe food, and medicine [9,14].

LAB have been isolated from a variety of niches, generally plants and food [15], from human and animal microbiota [16,17], as well as from soil [18] and marine sediments [19]. The animal gastrointestinal tract represents the source with the highest potential to obtain LAB [16], mainly *Lactobacillus* spp. Specifically, huge proportions of *Lactobacillus* have been identified in experimental mice, as well as the importance of this genera in the control of pathogens and the prevention of gut dysbiosis [20,21]. Therefore, in this work, the objective was the isolation of *Lactobacillus* strains from mice intestinal tract, their identification at molecular and phylogenetic levels, as well as the evaluation of their in vitro antibacterial activity against the pathogens *L. monocytogenes*, enteropathogenic *E. coli* and *C. jejuni*.

It is expected that the results of this study will impact the detection of new strains and their metabolites with antibacterial activity in the search for strategies for the inhibition of

these pathogens of clinical and zoonotic interest. Furthermore, the presence of enzymes with broad-spectrum bacteriolytic activity can be safely applied as promoters of animal health growth as an alternative to the use of antibiotics for the control of antibiotic-resistant pathogenic bacteria.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation and Selection of LAB

LAB isolation was performed from just-weaned CD1 mice collected from the Animal Facility, Multidisciplinary Research Unit in FES Cuautitlan, UNAM. The project was evaluated and approved by the CICUAE—Institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals with protocol number C18_20, and the euthanasia was performed in accordance with NOM-062-ZOO-1999 [22]. Under sterile conditions, the duodenum, jejunum, and colon were extracted from each mouse in order to obtain the intestinal contents by washing through the lumen of each intestine portion with sterile peptone water (NaCl 8.5 mg·mL^{-1}, proteose peptone 1 mg·mL^{-1}). The collected intestinal matter was inoculated in Lactobacilli MRS broth (De Man Rogosa and Sharp, BD Difco^{TM}, USA), in proportion (1:10) and incubated at 30 ± 2 °C for 24 h in a jar anaerobic system (BD GasPak^{TM}, USA). Subsequently, streak seeding was performed in MRS agar incubation at 30 ± 2 °C for 48 h per intestine portion. The round, white colonies of 1–2 mm that, when stained, were Gram-positive were selected.

2.2. Strain Handling

Each of the isolated Gram-positive *Bacillus* strains was cultivated in MRS broth at 37 ± 2 °C for 24 h, with a pass of 2% (*v*/*v*) in the same medium incubated for 12 h. The cells were collected by centrifugation at 5000× *g* for 10 min at 4 °C (Centurion Scientific K2015 centrifuge, UK), resuspended in MRS broth and skim milk at 10% (*w*/*v*), ultra-frozen at −50 °C (Thermo Scientific Revco Ultima II, USA), and freeze-dried (Labconco® FreeZone 4.5L, KC, USA) for their preservation at the long term and in MRS-glycerol broth (50–50% *v*/*v*) for their use in subsequent tests.

Lacticaseibacillus rhamnosus ATCC 53103, *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014, and *Lactococcus lactis* ATCC 0205V reactivated in MRS broth for 24 h and a 2% (*v*/*v*) pass incubated for 12 h at 37 ± 2 °C, were used as reference strains.

Listeria monocytogenes ATCC 15313 was cultivated twice in BHI broth (Brain Heart Infusion, Difco^{TM}), incubated at 35 ± 2 °C for 24 h with a 2% (*v*/*v*) pass for 12 h. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 was cultivated in Pseudomonas P agar (Difco^{TM}) at 30 ± 2 °C for 24 h. *Escherichia coli* REPEC O103 isolated from rabbit kidneys [2], donated by Dr. Fernando Navarro-García (CINVESTAV-IPN, México), from a pure culture in LB agar (Luria Bertani, Difco^{TM}), was incubated in LB broth at 37 ± 2 °C for 24 h and with a 2% (*v*/*v*) pass for 12 h in an orbital shaking incubator (Lab-Line® 4628, USA). *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 49943 was propagated in Soy Trypticase agar (Difco^{TM}) with 5% (*v*/*v*) bovine defibrinated blood, incubated at 37 ± 2 °C for 48 h with an Anaerocult® C system (Millipore®, USA) 6–16% O_2, 7–10% CO_2, followed by a Brucella broth (Difco^{TM}) pass, incubated under the same conditions.

2.3. Microbiological Tests

The isolated strains were identified by colonial morphology in an agar plate, Gram stain, and cellular morphology by optical microscopy (Olympus® CX31, USA). Catalase and oxidase tests were performed using *L. rhamnosus* ATCC 53103, *L. plantarum* ATCC 8014, and *Lc. lactis* ATCC 0205V as a negative control, and *P. aeruginosa* ATCC 9027 (catalase) and *S. aureus* ATCC 6538P (oxidase), respectively, as positive controls. The oxidative and fermentative metabolism was determined with the carbohydrate oxidation-fermentation test [23]: 1% (*w*/*v*) glucose, 1% (*w*/*v*) sorbitol, 1% (*w*/*v*) xylose, 2% (*w*/*v*) lactose and 0.5% (*w*/*v*) saccharose.

2.4. Molecular Identification

2.4.1. Genomic DNA Extraction

Twelve-hour cultures from each one of the LAB strains were carried out for DNA extraction through a phenol-chloroform method [24], verifying its purity and concentration in a spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000, USA) ($A_{260–280\ nm}$), in addition to its integrity in agarose gels at 1.5%. The DNA of *L. lactis* ATCC 0205V and *L. rhamnosus* ATCC 53103 strains equally cultivated were used as control.

2.4.2. Primer Sequences Design

Species-specific primers for BAL strains were designed (Table 1) from the strains reported in the literature, usually found in mouse intestinal microbiota. The partial or total sequences of the 16S rRNA gene were obtained from the GenBank from each of these strains. These sequences were used for the design of primers in the Primer-BLAST software by setting the following parameters: 18 to 25 nucleotides length, percentage of guanine-cytokine (%GC) between 40% and 50%, and difference of fusion temperature less than or equal to 5 °C. The designed primers were synthesized by Sigma Aldrich Química S de RL de CV.

Table 1. Species-specific primers were used for the identification of isolated LAB strains from the mouse intestinal tract.

LAB Name	PrimerID	Sequence (5′→3′)	Amplicon Size (bp)	Annealing Temp. (°C)
Lactobacillus intestinalis	Lbinte-F Lbinte-R	GTACAACGAGAAGCGAGCCT CACATAAGTGGTTAGGCCACC	213	58
Ligilactobacillus animalis	Lbanim-F Lbanim-R	GAGTAACACGTGGGCAACCT TGTCTCAGTCCCAATGTGGC	224	57
Limosilactibacillus reuteri	Lbreute-F Lbreute-R	AGTCACGGCTAACTACGTGC TTCGGTTAAGCCGAGTTTCCA	127	57
Lactobacillus delbrueckii spp. *bulgaricus*	Lbdelb1-F Lbdelb1-R	CCAAGGCAATGATGCGTAGC TTGCTCCATCAGACTTGCGT	127	56
Lactobacillus acidophilus	Lbacid-F Lbacid-R	ACGTCAAGTCATCATGCCCC TTAGACGGCTCCTTCCCGAGT	277	59
Limosilactobacillus fermentum	Lbferm-F Lbferm-R	TCTTGCGCCAACCCTAGAGA GACTCGGTGTTTGGGTGTTACAAAC	446	63
Lactococcus lactis spp. *lactis*	Lclact1-F Lclact1-R	GAGCGCTGAAGGTTGGTACT TGTCTCAGTCCCAATGTGGC	272	57
Lactococcus lactis spp. *cremoris*	Lclact2-F Lclact2-R	GGCGTGCCTAATACATGCAA CCGTTCGCTGCTCTTCAAAT	70	55
Lactobacillus gasseri	Lbgass-F Lbgass-R	GAGCGAGCTTGCCTAGATGA CTCTAGACATGCGTCTAGTGTT	163	58
Ligilactobacillus murinus	Lbmuri-F Lbmuri-R	AAGAGTTGAGCTGAGCGAACG CGTAGAAGTTTGGGCCGTGTTT	268	60
Lactobacillus crispatus	Lbcris-F Lbcris-R	GTACCAAGCCAAAGCAAGAC GTTTGAAGCCTTTACGTAAGTC	383	55
Lactiplantibacillus plantarum	Lbplan-F Lbplan-R	CCGTTTATGCGGAACACCTA TCGGGATTACCAAACATCAC	318	55

2.4.3. PCR Conditions

A PCR reaction was conducted with a final volume of 25 µL according to Master Mix (Promega©) kit specifications and 5 µL of the DNA sample (~150 ng) under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s, with annealing temperature for each primer (Table 1) for 30 s, 72 °C for 30 s and one final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were resolved through electrophoresis in agarose gels at 2% (*w*/*v*), at 90 V for 1 h, using GeneRuler™ (DNA Ladder Mix) as molecular weight standard, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Enzymatic cleaning was performed with Exo-Sap IT™ (Applied Biosystems, USA) for sequencing at the Laboratory of Molecular Biochemistry in UBIPRO, FES Iztacala, UNAM, using the Sanger method.

2.4.4. Sequence Analysis and Identity Percentage Matrix

The 16S rRNA sequences of each bacterial isolation obtained from the chromatograms were edited with BioEdit 7.2 software, and the sense and antisense sequences of each strain were aligned with ClustalW to create their consensus sequence. Every consensus sequence was aligned with BLAST from NCBI and compared with the sequences from the GenBank database. The similarity percentage between the sequences was obtained with multiple alignments in ClustalW and the option of an identity matrix.

2.4.5. GenBank Submission

The *Ligilactobacillus murinus* sequences were submitted in GenBank and obtained the accession numbers: LGM A1 (OK668196); LGM A2 (OK668197); LGM B1 (OK668198); LGM C1 (OK668199); LGM D1 (OK668200); LGM E1 (OK668201); LGM E2 (OK668202); LGM E3 (OK668203); LGM E5 (OK668204); LGM F1 (OK668205); LGM F2 (OK668206); LGM F3 (OK668207); LGM G1 (OK668208); LGM H1 (OK668209); LGM H3 (OK668210) and LGM I1 (OK668211).

2.4.6. Phylogenetic Tree Building

The sequences of the 18 isolated LAB strains were used for the building of phylogenetic trees, in addition to 12 reference sequences obtained from the alignment in BLAST-NCBI software. The phylogenetic analysis was performed in MEGA11 software, with the Maximum-Likelihood method of the suggested Jukes-Cantor model [25]. Confidence levels were determined by bootstrap analysis with 1000 repetitions.

2.5. Antagonistic Activity by Agar Diffusion Tests

Inhibitory activity was detected by diffusion tests in agar plates [26], with some modifications. MRS-based agar plates (BD, Difco™) at 1.5% (*w*/*v*) were used, upon which 5µL aliquots of a logarithmic phase culture of each isolated LAB were placed, corresponding to 7–9 log CFU mL^{-1}. In parallel, for each test, a 10 mL soft agar overlay (0.6% *w*/*v*), BHI agar for *L. monocytogenes*, LB agar for *E. coli*, and Brucella agar for *C. jejuni* was prepared, added with 100 µL from a 12 h culture of each test pathogen. Each overlay was conducted at 45 °C, and it was poured over every MRS-based agar plate. Solidified plates were incubated at 37 ± 2 °C for 24 h, and the test was conducted with *C. jejuni*. The plates were incubated with the use of the Anaerocult® C system (5–7% O_2, 8–10% CO_2) at 40 ± 2 °C for 48 h.

2.6. Bacterial Growth Parameters

The growth kinetics of every isolated strain was created from new cultivation in MRS broth at 37 ± 2 °C, and OD and CFU mL^{-1} were obtained at 0, 4, 8, 12, 16, 20, and 24 h. Growth parameters were calculated with the CFU mL^{-1} from the logarithmic phase and the following formulas [27]:

Specific growth rate (µ): means the growth rate per unit of CFU or biomass

$$\mu = 2.3 \cdot (\text{Log X} - \text{Log Xo})/\text{t} - \text{to}$$

Generation time (τ): the time required to form one generation of cells (time between two divisions).

$$\tau = \text{Log } 2 \cdot (\text{t} - \text{to}/\text{Log X} - \text{Log Xo})$$

2.7. Supernatant Bacteriolytic Activity

2.7.1. Obtention of Supernatants Culture

Cultures of every LAB strain in logarithmic phase (4 h), in 1 mL MRS broth, in Eppendorf tubes, were centrifuged at 5000× *g*, for 10 min at 4 °C (Centurion Scientific K2015, UK), neutralized at pH 7 (NaOH 6N) and sterilized by membrane filtration 0.22 µm (Merck Millipore™, Ireland) [28].

2.7.2. Protein Quantification

Proteins from Sterile-filtered, neutralized supernatants were precipitated with the Methanol/Chloroform method [29]. The protein concentration of each sample was determined by the Bradford method [30], with Bradford reactive (Bio-Rad, cat. no. 5000205, USA). In every test, a standard curve was built via Bovine Seric Albumin 1 mg·mL^{-1} (Bio-Rad cat no. 5000206).

2.7.3. Electrophoretic Profile of Supernatants Proteins (SDS-PAGE)

Electrophoresis was performed on denaturing and reducing polyacrylamide gels at 12% (30%T,2.67%C) [31]. Fifteen µL of the sample containing the precipitated proteins (1 µg/µL) and 5 µL of Laemmli sample buffer 4× (Bio-Rad, cat no. 1610747) were heated to 95 °C for 5 min and placed in each well of the gel. Precision Plus Protein™ All Blue molecular Weight marker (Bio-Rad, cat. no. 1610373) was used. The gels were run in an electrophoresis chamber (MiniPROTEAN III, Bio-Rad) at 90 volts for 180 min and 20 mA (Bio-Rad, PowerPac Basic). After electrophoresis, the gels were washed with sterile distilled water, stained with Coomassie brilliant blue (Bio-Rad cat. no. 1610400) for 1 h, and destained with a solution (20% methanol (J.T. Baker®, USA), 15% acetic acid (J.T. Baker®, USA) and 65% deionized water) for 12 h. Gels were analyzed in the Gel Logic 100 imaging system (Kodak, USA) to establish the electrophoretic profile of protein bands.

2.7.4. Zymograms

The zymography tests were carried out with the cells obtained from 60 mL of a culture of *L. monocytogenes*, *E. coli* REPEC, or *C. jejuni*, washed twice with sterile saline solution (0.9% *w*/*v*), which were used as a substrate when adding them in 12% polyacrylamide mixtures. *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 was used as a positive control at 0.2% (*w*/*v*) for the identification of PGH activity [32]. Precipitated proteins of every LAB strain were placed in the wells, and the SDS-PAGE was carried out under the same conditions previously described. When the electrophoresis was finished, the gels were disassembled and put in a container with deionized water for 30 min, proceeded by incubation in a renaturing solution (25 mM Tris-HCl pH 8 with 1% *v*/*v* Triton) for 6 h with the purpose of identifying lytic bands. In order to obtain a better definition, the gels were stained with methylene blue at 1% (*w*/*v*) in KOH solution at 0.1% (*w*/*v*) for 30 min and were subjected to destaining with distilled water [33].

2.7.5. UPLC-MS Fingerprinting of *L. murinus* B1 Lytic Proteins

The protein bands that demonstrated lytic activity separated in SDS-PAGE gels, stained with Coomassie brilliant blue G-250 0.02% (*w*/*v*), were cut out of the gel with a sterile scalpel and transferred to an Eppendorf tube. The preparation of the samples was carried out according to the protocol developed at the Research and Industry Support Services Unit (USAII), Faculty of Chemistry, UNAM [34]. The gel fragments were incubated in 100 µL of destaining solution (80 mg ammonium bicarbonate, 20 mL analytically pure water (J.T. Baker®), and 20 mL acetonitrile) for 15 min in an orbital shaker at 50 rpm.

To reduce and alkylate the proteins in the samples, the liquid phase was discarded, and 5.5 µL of 0.5 M TCEP (Tris-(2-Carboxyethyl)phosphine) and 50 µL of 25 mM ammonium bicarbonate were added for 10 min at 60 °C. The liquid phase was discarded and alkylated with 200 µL of 200 mM iodoacetamide (J.T. Baker®) for 1 h in a dark tube. The samples were washed with 200 µL of destaining solution for 5 min, then dehydrated with 200 µL of 100% acetonitrile (J.T. Baker®) for 15 min at 24 °C and dried for 5 min in a vacuum concentrator (Genevac™).

Enzymatic digestion was performed with 1 µL of trypsin (Promega cat #V528A) (1µg/µL) and 100 µL of 25 mM ammonium bicarbonate, incubated for 18 h at 37 °C. Peptides were extracted with 50% (*v*/*v*) acetonitrile and 5% formic acid (J.T. Baker®), and the sample placed in a new tube was dried in a vacuum concentrator for 2 h. Peptides were resuspended in 10 µL of 0.1% (*v*/*v*) formic acid, and sample salts were removed with a

protein concentrator (Bond Elut OMIX, C18, No. A5700310K) and eluted in 25 µL of mobile phase (3% acetonitrile, 97% analytically pure water and 0.1% formic acid).

Peptide analysis was performed on an SYNAPT G2-S integrated nano-LC-ESI-/MS system (Waters Corporation, UK) equipped with a NanoLockSpray ion source and coupled online to a nanoACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatograph (UPLC; Waters Corporation). The binary solvent system was composed of 2% acetonitrile with 0.1% formic acid (mobile phase A) and 98% acetonitrile with 0.1% formic acid (mobile phase B). The sample was injected onto a nanoACQUITY UPLC 2G Trap column, 5 µm, 180 µm × 20 mm (S/N 03073720616583) and subsequently washed with mobile phase A at a flow rate of 0.4 µL/min. Peptides were separated on a nanoACQUITY UPLC HSS T3 C18 column, 1.8 µm, 75 µm × 150 mm (S/N 01973716416209) using a linear gradient to 40% mobile phase B with a flow rate of 0.4 µL/min.

Data were acquired and processed using Protein Lynxs Global Selver 2.5.1™ software, Waters (PLGS). For the identification of the proteins, the databases extracted from the website were used: https://www.uniprot.org, accessed on 5 January 2023, for *Ligilactobacillus*.

2.8. Statistical Analysis

Three independent replicates of each assay were performed in duplicate for each one. A variance analysis ANOVA was applied to the obtained data, expressed as means and standard deviation. The Tukey test was conducted for the comparison of the media with a significance level ($p < 0.05$) with the Minitab® statistical software.

3. Results

3.1. LAB Isolation and Microbiological Tests

Eighteen LAB strains were isolated under anaerobiosis conditions from the intestine of just-weaned CD1 mice per intestine section with a distribution of 28% duodenum (5 isolations), 22% jejunum (4 isolations), and 50% colon (9 isolations). In biochemical tests, the 18 isolated strains were negative for catalase and oxidase. In oxidation-fermentation tests, all strains fermented glucose, while only E4 and H2 strains fermented sorbitol. Moreover, A2, C1, and D1 strains were negative to xylose; E1, F3, and H1 strains were negative to lactose, and D1, E1, F2, and H1 strains were negative to saccharose.

3.2. Molecular Identification

Amplicons of 224 pb were obtained with the primers for *L. animalis* (Figure S1). The results of the alignment in BLAST-NCBI identified 16 strains as *Ligilactobacillus murinus*, of which the D1, E2, and G1 strains displayed 100% identity, while 13 others shared similarity percentages between 97.89% and 99.51%. The H2 strain was identified as *Ligilactobacillus animalis* (95.10%), and the E4 strain as *Streptococcus salivarius* (97.54%) (Table S1).

3.2.1. Identity Percentage Matrix

The identity matrix allowed the authors to establish the similarity of the isolated BAL sequences. As a result, 100% similarity was obtained between *L. murinus* C1 and E1 and between *L. murinus* E2 and D1. The similarity for the rest of the *L. murinus* strains was between 92% and 99% (Table 2).

3.2.2. Phylogenetic Tree

The phylogenetic tree built by the Maximum-Likelihood based on the Jukes-Cantor model shows that strains with similar sequences are clustered in the same clade level [35]. In particular, the isolated *L. murinus* E3 and I1 strains in this study were clustered in the same clade as the *L. murinus* DSM 100193, TCD6, NM28, and V10 (isolated from mice), *L. animalis* P38 and FR12 (isolated from chicken) and *L. animalis* JCM8692 (isolated from pork) strains found in GenBank. Likewise, the remaining *L. murinus* and *L. animalis* H2 strains isolated in this study were located in different clades (Figure 1).

Table 2. Identity percentage matrix. Similarity values of the V2 variable region of the 16S rRNA gene of the isolated LAB.

	I1	H3	H2	H1	G1	F3	F2	F1	E5	E4	E3	E2	E1	D1	C1	B1	A2	A1
L. murinus A1	96.0	99.0	89.8	97.5	94.2	94.0	98.0	97.0	93.2	71.4	97.0	96.5	97.5	96.5	97.5	97.0	97.5	100
L. murinus A2	94.6	97.0	87.9	96.0	92.7	93.5	96.0	96.5	93.1	71.0	95.1	96.0	96.0	96.0	96.0	96.5	100	
L. murinus B1	96.5	97.5	89.8	98.0	94.6	92.1	97.5	98.5	92.2	72.4	97.0	99.5	98.0	99.5	98.0	100		
L. murinus C1	98.0	97.5	90.7	98.0	96.0	92.1	97.5	98.5	92.7	72.0	99.0	97.5	100	97.5	100			
L. murinus D1	96.0	97.0	89.8	98.5	94.6	91.6	97.0	99.0	92.2	72.4	96.5	100	97.5	100				
L. murinus E1	98.0	97.5	90.7	98.0	96.0	92.1	97.5	98.5	92.7	72.0	99.0	97.5	100					
L. murinus E2	96.0	97.0	89.8	98.5	94.6	91.6	97.0	99.0	92.2	72.4	96.5	100						
L. murinus E3	99.0	97.0	91.2	97.5	97.0	91.7	97.0	97.5	92.2	71.2	100							
S. salivarius E4	71.1	71.9	67.4	71.9	70.3	69.6	71.9	72.4	68.9	100								
L. murinus E5	92.2	94.1	86.6	93.6	91.3	90.2	93.2	93.1	100									
L. murinus F1	97.0	97.5	90.2	99.5	95.6	92.1	97.5	100										
L. murinus F2	98.0	99.0	90.7	98.0	95.1	93.6	100											
L. murinus F3	91.7	94.5	87.8	92.6	89.9	100												
L. murinus G1	97.0	95.1	91.2	95.6	100													
L. murinus H1	97.0	98.0	90.7	100														
L. animalis H2	91.2	90.7	100															
L. murinus H3	97.0	100																
L. murinus I1	100																	

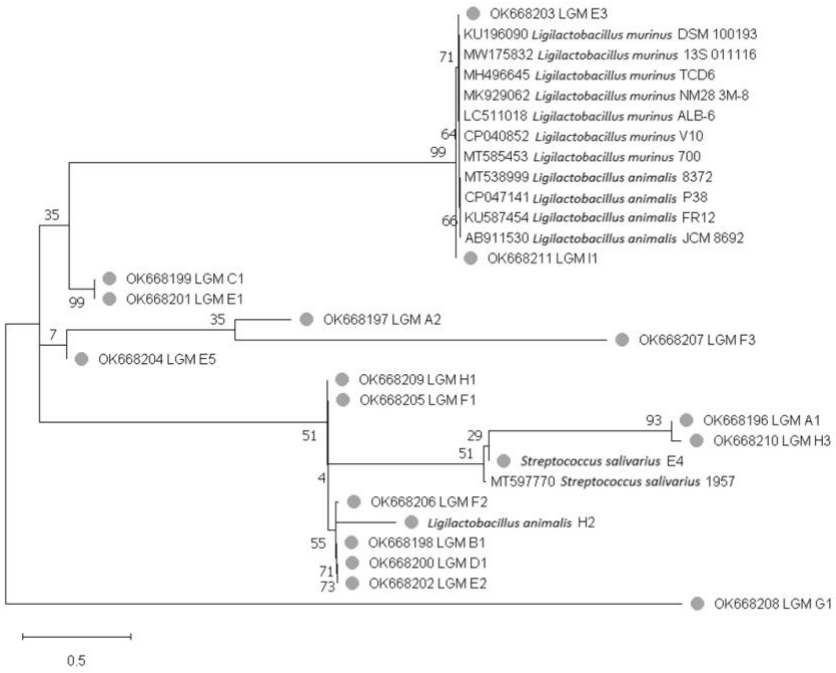


Figure 1. Phylogenetic tree built by the Maximum-Likelihood method, using the sequences of V2 variable region of the 18 LAB strains isolated from mice intestinal tract (●), compared with strains found in GenBank. The numbers expressed before each clade (shown in percentages) show the trust levels generated from 1000 bootstrap.

3.3. Bacterial Growth Parameters

The growth parameters for every strain are listed in Table 3. *L. murinus* E3 and *S. salivarius* E4 displayed the highest μ values with 1.25 h^{-1} and 1.13 $h^{-1,}$ respectively; on the other hand, *L. murinus* D1, E5, H1, and H3 were clustered with intervals between 0.39 and 0.51 h^{-1}. Regarding τ, *L. murinus* H3 had the highest value at 2.12 h, and the lowest values were observed for *L. murinus* A1, A2, E3, and *S. salivarius* E4 with intervals between 0.59 and 0.84 h.

Table 3. Kinetic parameters of the isolated LAB strains. Data are expressed as a mean and standard deviation. ^{abcdef} shows a significant difference per column (Tukey).

Isolated LAB	Specific Growth Rate (μ) h^{-1}	Generation Time (τ) h
1. *L. murinus* A1	0.82 ± 0.04^{cd}	0.84 ± 0.04^{cd}
2. *L. murinus* A2	0.91 ± 0.11^{bc}	0.77 ± 0.06^{cd}
3. *L. murinus* B1	0.60 ± 0.02^{def}	1.11 ± 0.15^{bcd}
4. *L. murinus* C1	0.74 ± 0.03^{cde}	0.93 ± 0.04^{bcd}
5. *L. murinus* D1	0.51 ± 0.06^{ef}	1.43 ± 0.32^{b}
6. *L. murinus* E1	0.56 ± 0.09^{def}	1.19 ± 0.18^{bc}
7. *L. murinus* E2	0.78 ± 0.04^{cde}	0.88 ± 0.05^{bcd}
8. *L. murinus* E3	1.25 ± 0.27^{a}	0.59 ± 0.14^{d}
9. *S. salivarius* E4	1.13 ± 0.18^{ab}	0.62 ± 0.13^{d}
10. *L. murinus* E5	0.50 ± 0.06^{ef}	1.26 ± 0.23^{bc}
11. *L. murinus* F1	0.60 ± 0.04^{def}	1.15 ± 0.09^{bcd}
12. *L. murinus* F2	0.79 ± 0.01^{cde}	0.91 ± 0.06^{bcd}
13. *L. murinus* F3	0.54 ± 0.06^{def}	1.41 ± 0.14^{b}
14. *L. murinus* G1	0.72 ± 0.02^{cde}	0.93 ± 0.06^{bcd}
15. *L. murinus* H1	0.50 ± 0.06^{ef}	1.43 ± 0.26^{b}
16. *L. animalis* H2	0.54 ± 0.04^{def}	1.28 ± 0.18^{bc}
17. *L. murinus* H3	0.39 ± 0.05^{f}	2.12 ± 0.36^{a}
18. *L. murinus* I1	0.56 ± 0.06^{def}	1.29 ± 0.28^{bc}

3.4. Agar Diffusion Tests

The inhibitory activity against *L. monocytogenes* was observed in the 18 isolated strains, highlighting the activity of *L. animalis* H2 with inhibition diameters of 17 mm ($p < 0.5$) and *L. murinus* A1, A2, B1, C1, E2, F1 and F3 with inhibition diameters of 15 mm. Additionally, the isolated LAB strains showed an inhibitory effect against *E. coli* REPEC, with larger inhibition halos for *L. animalis* H2 with 25 mm and *L. murinus* G1, A1, and F3 with 23 mm. During the tests performed with isolated LAB strains against *C. jejuni*, a significant inhibitory effect was observed, highlighting the activity of *L. animalis* H2 with inhibition diameters of 44 mm ($p < 0.5$) (Table 4).

3.5. SDS-PAGE and Zymograms

As a result, in protein profiles, some differences were observed in the number and intensity of protein bands. Zymograms against the different testing microorganisms evidenced two bands with an apparent molecular mass of 108 and 25 kDa, corresponding to two lytic bands of 107 and 24 kDa. The 107 kDa lytic bands were identified in the 16 *L. murinus* strains against *M. lysodeikticus* ATCC4698, *E. coli* REPEC O103, and *C. jejuni.* Moreover, the lytic band was identified in renatured zymograms after two hours against *C. jejuni* ATCC 49943, and after renaturation, for six hours, the lytic activity was observed as diffuse. On the other hand, the 24 kDa lytic bands were detected with different intensities in the *L. murinus* strains against *L. monocytogenes*, *E. coli* REPEC O103, and *C. jejuni.* It is important to highlight that the 107 kDa lytic band found in *L. murinus* B1 supernatants displayed a higher density against *E. coli* REPEC, and 24 kDa lytic bands in *L. murinus* H3 and I1 supernatants against *L. monocytogenes* (Figure 2). *L. animalis* and *S. salivarius* strains did not show lytic activity against the testing microorganisms.

Table 4. Inhibition halos on isolated LAB strain agar plates (mm). Data are expressed as means and standard deviation. [abc] for columns indicates a significant difference (Tukey).

	Inhibition Diameter (mm)		
Isolated LAB	***L. monocytogenes***	***E. coli***	***C. jejuni***
1. *L. murinus* A1	15 ± 0.5^{ab}	21 ± 1.2^{abc}	36 ± 3.7^{b}
2. *L. murinus* A2	15 ± 0.1^{ab}	19 ± 1.6^{bc}	42 ± 1.0^{ab}
3. *L. murinus* B1	15 ± 0.6^{ab}	20 ± 1.0^{bc}	39 ± 2.6^{ab}
4. *L. murinus* C1	15 ± 0.6^{ab}	20 ± 0.5^{bc}	42 ± 2.5^{ab}
5. *L. murinus* D1	14 ± 0.6^{ab}	19 ± 1.5^{bc}	41 ± 1.1^{ab}
6. *L. murinus* E1	14 ± 0.6^{ab}	19 ± 1.0^{c}	38 ± 2.0^{ab}
7. *L. murinus* E2	15 ± 1.1^{ab}	19 ± 1.5^{c}	41 ± 2.3^{ab}
8. *L. murinus* E3	14 ± 1.1^{ab}	18 ± 1.1^{c}	41 ± 3.7^{ab}
9. *S. salivarius* E4	14 ± 0.6^{ab}	18 ± 1.1^{c}	38 ± 1.5^{ab}
10. *L. murinus* E5	14 ± 0.0^{ab}	18 ± 1.5^{c}	40 ± 2.6^{ab}
11. *L. murinus* F1	15 ± 0.6^{ab}	20 ± 1.8^{bc}	41 ± 2.0^{ab}
12. *L. murinus* F2	15 ± 0.6^{ab}	20 ± 1.8^{bc}	40 ± 2.0^{ab}
13. *L. murinus* F3	15 ± 0.6^{ab}	21 ± 0.5^{abc}	41 ± 2.5^{ab}
14. *L. murinus* G1	14 ± 1.0^{ab}	23 ± 1.6^{ab}	40 ± 1.5^{ab}
15. *L. murinus* H1	14 ± 1.0^{ab}	19 ± 1.1^{bc}	41 ± 3.2^{ab}
16. *L. animalis* H2	17 ± 0.6^{a}	25 ± 1.5^{a}	44 ± 1.7^{a}
17. *L. murinus* H3	13 ± 0.1^{b}	20 ± 1.2^{bc}	36 ± 2.0^{b}
18. *L. murinus* I1	14 ± 1.1^{ab}	18 ± 1.1^{c}	36 ± 2.0^{b}

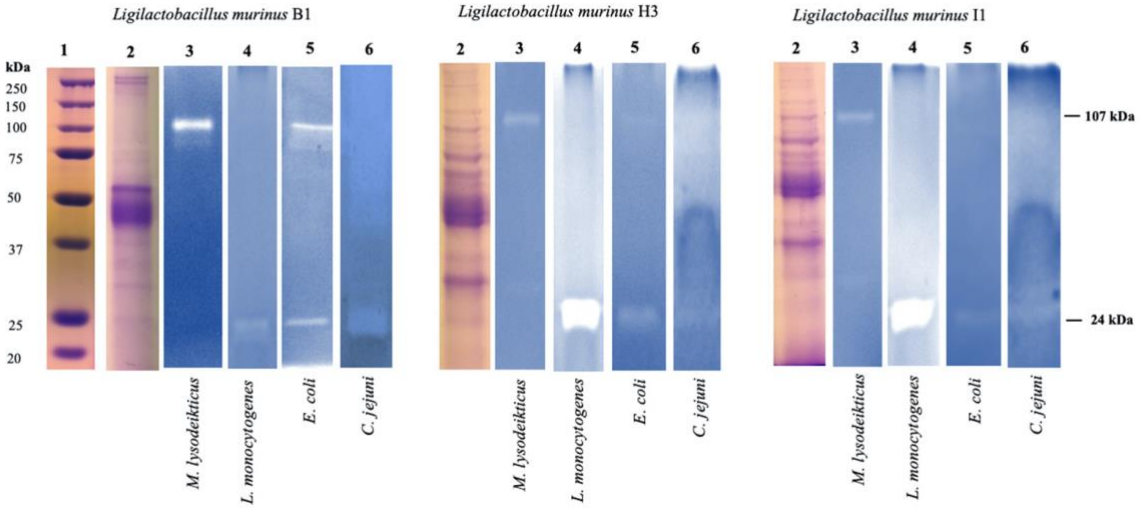


Figure 2. SDS-PAGE, 12%, and Zymograms. Line 1 Molecular Weight Marker, Precision Plus Protein™ All Blue, Bio-Rad. Line 2 Protein profile of culture supernatant in logarithmic phase. Zymograms copolymerized with Line 3 *Micrococcus lysodeikticus*, Line 4 *Listeria monocytogenes*, Line 5 *Escherichia coli* REPEC, and Line 6 *Campylobacter jejuni*.

3.6. UPLC-MS Analysis

The UPLC-MS analysis confirmed the presence of several specific peptides obtained from the protein bands with lytic activity (Figure 3). Through the detection of 20 peptides (Table 5), the lytic band with a molecular mass of 107 kDa was identified as a PGH with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. This PGH has a molecular structure made of a catalytic domain formed by two 1,4-beta-N-acetylmuramoylhydrolase regions and one domain bound to the peptidoglycan formed by nine repeated sequences of amino acids called LysM (lysin-like motif) domains (UniProt accession A0A4S2EQ32_9LACO).

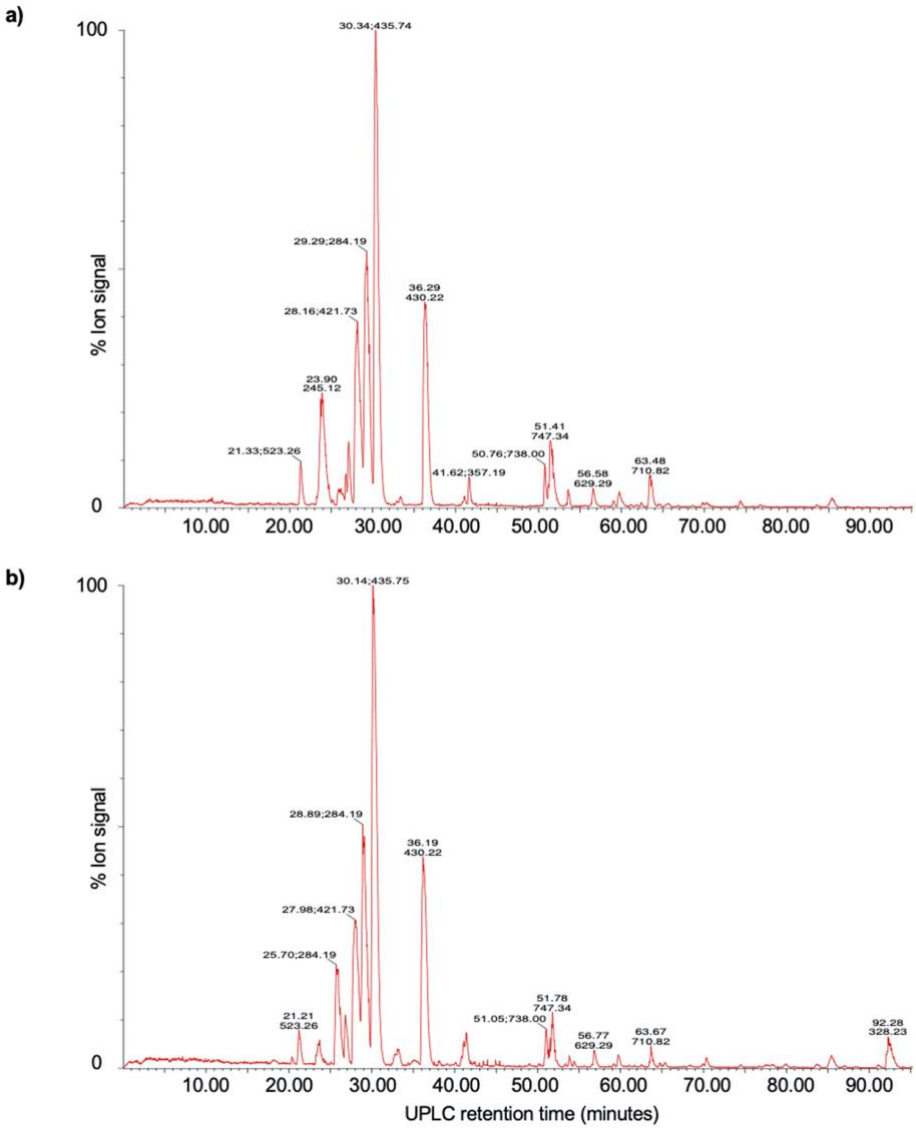


Figure 3. UPLC-MS of the SDS-PAGE gel bands with lytic activity, (**a**) protein with an apparent molecular mass of 107 kDa, and (**b**) 24 kDa. The masses in the spectra are protonated masses of the most prominent detected compounds.

Eight peptides were identified in the 24 kDa lytic band via the UPLC-MS analysis. Such peptides showed similarities with 12% of coverage with a protein fragment containing the GA (protein G-related Albumin-binding) domain within the genomic sequence of *L. salivarius* with aminopeptidase molecular function (UniProt accession A0A1V9RCV3_9LACO).

Table 5. Peptides obtained from the SDS-PAGE gel bands with lytic activity by UPLC-MS, (**a**) protein with an apparent molecular mass of 107 kDa and (**b**) 24 kDa.

Time	Sc	Sequence	Prec *m*/*z*	*z*	Prec MW	Theor MW	ΔMass
(a) Peptidoglycan hydrolase OS *Ligilactobacillus murinus* OX 1622: PLGS Score 6997; coverage, 29%							
69.95	7.49	TYPGNVQTFLNNIAGPAQQVAQQR	872.44	3	2615.32	2615.32	−1.87
64.18	7.90	VNNLSSDLIYVGQTLK	882.47	2	1763.95	1763.95	−1.33
42.18	7.78	AGDSLWAIANSHK	457.23	3	1369.68	1369.68	−0.36
72.07	7.58	SLNNLNSDLIFAGQVLK	923.50	2	1846.00	1846.00	−2.75
39.78	7.99	YGVYGTYATAPDYADK	877.89	2	1754.78	1754.78	−1.11
34.11	7.58	ANSANYAIAAQNLR	738.88	2	1476.75	1476.75	−0.36
62.06	7.61	NLNNLSSNLIMPGQVLK	928.00	2	1855.00	1855.00	−1.08
62.06	7.63	NLNNLSSNLIMPGQVLK	928.00	2	1855.00	1855.00	−1.08
28.11	7.65	AGDSLWR	402.70	2	804.39	804.39	−1.26
53.61	6.96	YSSYAESLNGYANVITTR	1004.9	2	2008.95	2008.95	−2.34
76.54	6.01	GAVTTANKPNTQSNTNK	873.46	2	1745.92	1745.92	24.50
56.39	8.52	NLNNLSSNLIMPGQVLK	936.00	2	1871.00	1871.00	−0.09
49.63	7.67	ALNNLTSDMIYVGQNLK	955.48	2	1909.96	1909.96	−1.43
69.20	0.00	VQTFLNNIAGPAQQVAQQR	689.36	3	2066.08	2066.08	3.36
28.11	0.00	DSLWR	676.34	1	676.34	676.34	−0.85
28.11	0.00	SLWR	561.31	1	561.31	561.31	0.35
42.43	0.00	AIANSHK	370.70	2	740.40	740.40	3.84
28.11	0.00	GDSLWR	733.36	1	733.36	733.36	−1.68
28.12	0.00	AGDSLWR	393.69	2	786.38	786.38	−1.73
42.19	0.00	AGDSLWAIANSHK	451.22	3	1351.67	1351.67	−2.99
(b) GA domain-containing protein Fragment *Ligilactobacillus salivarius* OX 1624: PLGS Score 31.20; coverage, 12%							
49.06	3.56	EPETPVNPSEPGK	690.83	2	1380.66	1380.66	2.87
53.41	3.40	EPETPVDPSEPEK	727.34	2	1453.67	1453.67	4.37
53.81	4.27	SPQELDQIFTGNNDTIDK	678.98	3	2034.94	2034.94	−6.90
48.88	3.85	EPETPVDPSESGKEPETPVDPSEPGK	684.32	4	2734.29	2734.29	14.27
49.06	3.56	EPETPVNPSEPGK	690.83	2	1380.66	1380.66	2.87
56.78	3.77	IDQMLELTVDQKDNFNK	684.34	3	2051.00	2051.00	−1.02
75.87	3.70	EIYLTGHSLGGYLAEYFAATK	768.74	3	2304.21	2304.21	25.52
51.72	3.92	ISVEFDPQYEYYKK	904.94	2	1808.87	1808.87	1.61

Sc, peptide score; prec m/z, precursor mass-to-charge ratio; z, charge; prec MW, precursor molecular Weight; theor MW, theoretical molecular weight. Data were processed using Protein Lynxs Global Selver 2.5.1^{TM} software, Waters (PLGS).

4. Discussion

Several niches were explored to obtain LAB, including human and animal gastrointestinal tract [16,17]. In this study, LAB strains were isolated under anaerobiosis conditions from recently weaned CD1 mice intestines. The 18 catalase and oxidase-negative isolated strains showed differences in their fermentation profile. All the strains fermented the glucose (hexose) used by LAB as the main source of energy. Meanwhile, most strains fermented pentose (xylose) and disaccharides (lactose and saccharose). On the other hand, the strains identified as *L. murinus* did not ferment sorbitol (polyol sugar). These results match those reported for the *L. murinus* 313 reference strain in terms of glucose, lactose, and saccharose fermentation, which does not ferment xylose and sorbitol [36]. Based on the fermentation type, lactobacilli are classified into three groups: obligately homofermentative, fermenting via the glycolytic pathway; facultative heterofermentative, fermenting via the glycolytic/pentose phosphoketolase pathway and obligately heterofermentative, fermenting via the pentose phosphoketolase pathway. Therefore, obligately homofermentative lactobacilli cannot assimilate pentoses [37]. However, there are exceptions for some strains, such as the homolactic fermentation of a pentose, for instance, phosphoketolase is induced in the presence of xylose, and the metabolism may shift between these two pathways according to the xylose concentration in the medium [38].

Molecular identification allowed the detection of a high proportion of *L. murinus* and one *L. animalis*. Specifically, *L. murinus* strains have been isolated from different niches, such as rodent gastrointestinal tract [39], dog feces [40], fermented dough [41], and marine sediments [19], while *L. animalis* has been found in the gastrointestinal tract of several animal species [42]. Furthermore, the identity matrix and the phylogenetic analysis determined the similarity between the sequences using the V2 variable region of the 16S rRNA gene from the 16 *L. murinus* strains and confirmed its close relationship with *L. animalis*, which has been described by several authors, identifying these two species at the same phylogenetic level with similarity percentages of up to 99% between 16S rRNA gene regions [41,43].

The isolated LAB inhibitory activity against the testing pathogens was demonstrated by the agar diffusion method. *L. animalis* H2 and *L. murinus* A1, A2, B1, C1, E2, F1 and F3 strains displayed more inhibition ($p < 0.5$) against *L. monocytogenes*, while *L. animalis* H2 and *L. murinus* G1, A1 and F3 showed larger halos against *E. coli* REPEC. In these studies, the inhibitory activity of the 18 isolated strains was highlighted against *C. jejuni*. According to reports, several LABs have displayed antagonistic activity against *Campylobacter* strains. For instance, *Pediococcus pentosaceus* CWBI B73, *Lactiplantibacillus pentosus* CWBI B78, and *Enterococcus faecium* THT inhibited *C. jejuni* and *C. coli* species [44]. On the other hand, *L. salivarius* SMXD51, MMS122, and MMS151 showed inhibition capacity against *C. jejuni* and *C. coli* [45]. In these studies, besides evaluating the antagonistic activity of LAB through the agar-diffusion method, cell supernatants were assessed, confirming that the inhibition capacity of the isolated strains was related to the production of protein compounds.

In general, antibacterial compounds with a protein nature are produced by LAB in low quantities, which makes them difficult to detect and analyze. Therefore, in this study, SDS-PAGE electrophoretic and zymography techniques were used, which are highly sensitive methods for the detection of enzymatic activity [46], which showed the presence of two proteins with lytic activity existing in the supernatants of the 16 strains of *L. murinus* isolated.

The 107 kDa lytic band, found in copolymerized gels with *M. lysodeikticus*, *E. coli* REPEC O103, and *C. jejuni*, was identified via the UPLC-MS fingerprinting method as an extracellular PGH with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity, considered as a bacteriolytic enzyme with antibacterial activity. According to the literature, the PGH are enzymes that hydrolyze peptidoglycan (PG) links, known as the main component of the cellular wall for Gram-positive and Gram-negative bacteria. The PG is formed by chains of alternate N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc) units, bound by B-1,4 links and cross-linked by peptides formed out of L- and D-amino acids. Specifically, the bacteriolytic activity from N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase originated due to the specific site of hydrolysis in the PG, which cleaves the amide link between MurNAc and the L-alanine of the peptide [47]. Furthermore, the efficiency of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity identified can be attributed to the number of binding LysM modules, which recognize the GlcNAc scraps of the PG and contribute to their additive junction [48].

The 24 kDa band with lytic activity against *L. monocytogenes*, *E. coli* REPEC O103, and *C. jejuni* displayed 12% similarity with a GA domain-containing protein fragment, reported in the *L. salivarius* genome. Particularly, the GA domain identified in this lytic band via the IDQMLELTVDQKDNFNK peptide is a domain localized in a variety of proteins of the cellular surface in different bacteria [49].

Similar to this research, several studies have reported the lytic activity from PGH against Gram-positive and Gram-negative pathogens [28,50]. One of the most researched PGH is lysostaphin, a 25 kDa peptidase produced *by Staphylococcus simulans*, that disrupts the peptide link between the third and fourth glycine residues of the pentaglycine cross-link in the *S. aureus* PG, which was demonstrated to be efficient in infections caused by *Staphylococcus* spp. [51].

The findings of this study can be applied from the perspective of the sustainable health and well-being objective [7] and the multidisciplinary effort with the One Health framework

to reduce health risks such as sanitary problems, zoonotic illnesses, and antimicrobial resistance because these issues represent a growing threat for human and animal well-being. In the search for alternative solutions, there is the use of new probiotic strains and their bioactive components to reduce the use of antimicrobials because they provide health benefits and do not generate risks of resistance mechanisms. In this context, our research is important because it explores a new niche in the pursuit of *Lactobacillus* strains, which displayed inhibitory capacity against test pathogen microorganisms, *C. jejuni*, which is considered the main bacterial cause of gastroenteritis in humans around the world and the zoonotic pathogen responsible for gastroenteritis in humans associated to chicken meat consumption [52]. *E. coli* EPEC was identified as one of the main causes of diarrhea in humans and animals [2] and acknowledged as the primary bacteria that causes diarrhea in children under five years old [53], and *L. monocytogenes* considered as one emergent Food-borne pathogen, provokes severe health issues that appear sporadically or as an epidemic [54]. Due to the inhibitory capacity of the 16 *Ligilactobacillus murinus* isolated strains presented in this study, as well as the identification of their antibacterial metabolites, a feasible alternative is suggested for the prevention and control of these pathogens in order to promote animal health and well-being and, subsequently, human health as well.

5. Conclusions

The molecular identification of 16 strains of *Ligilactobacillus murinus* isolated from mice intestinal tract, its wide spectrum antibacterial activity against clinical and zoonotic pathogens, and the presence of bacteriolytic enzymes, one of them being PGH are important finding that contributes to the antagonist potential of these strains. In addition, these enzymes have a potential application as alternative antibacterial agents and treatment of infections caused by antibiotic resistant bacteria because the molecular mechanisms of resistance to antibiotics are not related to the hydrolysis of the PG.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11040942/s1, Figure S1: Products obtained through PCR with *Ligilactobacillus animalis* primers for the 18 isolated LAB strains. Table S1: Molecular identification (BLAST-NCBI) of isolated LAB strains from mice intestinal tract.

Author Contributions: Conceptualization, I.L.S.-M. and A.L.-B.; methodology, I.L.S.-M. and A.L.-B.; software, I.L.S.-M. and C.S.; validation, I.L.S.-M., A.L.-B. and C.S.; formal analysis, I.L.S.-M. and A.L.-B.; investigation, I.L.S.-M., A.L.-B., C.S. and C.M.M.; data curation, I.L.S.-M., A.L.-B., C.S. and S.F.; writing—original draft preparation, I.L.S.-M. and A.L.-B.; writing—review and editing, I.L.S.-M., A.L.-B., S.F. and J.C.D.R.G.; visualization, I.L.S.-M., A.L.-B., C.S., S.F. and J.C.D.R.G.; supervision, A.L.-B., C.S., S.F. and J.C.D.R.G.; project administration, A.L.-B.; funding acquisition, A.L.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) 639637 for I.L.S.-M. from DGAPA-PAPIIT (IN230820 project) and FESC-PIAPI CI2239.

Data Availability Statement: The sequence data that support the findings of this study are openly available in GenBank (RRID:SCR_002760) at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/, accessed on 3 November 2021, accession numbers: OK668196, OK668197, OK668198, OK668199, OK668200, OK668201, OK668202, OK668203, OK668204, OK668205, OK668206, OK668207, OK668208, OK668209, OK668210, OK668211. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: Hugo Ramírez Álvarez from the Laboratory of Virology, Genetics and Molecular Biology, FES Cuautitlan, UNAM, for support in Bioinformatics tools.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. World Health Organization; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Organization for Animal Health. Taking a Multisectoral, One Health Approach: A Tripartite Guide to Addressing Zoonotic DISEASES in Countries. WHO 2019. Available online: https://apps.who.int/iris/handle/10665/325620 (accessed on 2 November 2022).
2. Oliver-Gonzalez, R.; García-Tovar, C.; Juárez-Mosqueda, L.; Navarro-Garcia, F. Infection of rabbit kidney cells (RK13) by enteropathogenic *Escherichia coli* as a model to study the dynamics of actin cytoskeleton. *Can. J. Microbiol.* **2008**, *54*, 748–757. [CrossRef]
3. European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J.* **2021**, *19*, e06971. [CrossRef]
4. Velazquez-Meza, M.E.; Galarde-López, M.; Carrillo-Quiróz, B.; Alpuche-Aranda, C.M. Antimicrobial resistance: One Health approach. *Veter. World* **2022**, *15*, 743–749. [CrossRef]
5. World Health Organization. World Health Organization PUBLISHES list of BACTERIA for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. WHO 2021. Available online: https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms (accessed on 3 March 2022).
6. Sarno, E.; Pezzutto, D.; Rossi, M.; Liebana, E.; Rizzi, V. A Review of Significant European Foodborne Outbreaks in the Last Decade. *J. Food Prot.* **2021**, *84*, 2059–2070. [CrossRef] [PubMed]
7. United Nations. Sustainable Development Goals. 17 Goals to Transform Our World. 2015. Available online: https://www.un.org/sustainabledevelopment/ (accessed on 3 March 2022).
8. FAO/WHO. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization*; FAO/WHO Working Group: London, ON, Canada, 2002.
9. Yang, S.-C.; Lin, C.-H.; Sung, C.T.; Fang, J.-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 241. [CrossRef] [PubMed]
10. Collins, B.; Cotter, P.D.; Colin, H.; Ross, R.P. *Applications of Lactic Acid Bacteria-Produced Bacteriocins in Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, 2016; pp. 89–100.
11. Federal Register. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Regist.* **1988**, *54*, 11247–11251.
12. Magnusson, J. Antifungical Activity of Lactic Acid Bacteria. Uppsala. Sveriges Lanthbruksuniversitet. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Agraria 2003, 397. Available online: http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-31 (accessed on 3 March 2022).
13. Siedler, S.; Balti, R.; Neves, A.R. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 138–146. [CrossRef]
14. Gao, Z.; Daliri, E.B.-M.; Wang, J.; Liu, D.; Chen, S.; Ye, X.; Ding, T. Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria on Foodborne Pathogens: A Review. *J. Food Prot.* **2019**, *82*, 441–453. [CrossRef]
15. de Albuquerque, T.M.R.; Garcia, E.F.; Araújo, A.D.O.; Magnani, M.; Saarela, M.; de Souza, E.L. In Vitro Characterization of Lactobacillus Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2018**, *10*, 704–716. [CrossRef] [PubMed]
16. Oyewole, O.; Maria, C.; Tope, P.; Funmi, O. In vitro Study of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from The Gut of Chickens in Abeokuta, Nigeria. *Alex. J. Veter. Sci.* **2018**, *59*, 73–84. [CrossRef]
17. Sornplang, P.; Piyadeatsoontorn, S. Probiotic isolates from unconventional sources: A review. *J. Anim. Sci. Technol.* **2016**, *58*, 26. [CrossRef]
18. Yanagida, F.; Chen, Y.-S.; Shinohara, T. Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2006**, *52*, 21–28. [CrossRef]
19. Elayaraja, S.; Annamalai, N.; Mayavu, P.; Balasubramanian, T. Production, purification and characterization of bacteriocin from Lactobacillus murinus AU06 and its broad antibacterial spectrum. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, S305–S311. [CrossRef] [PubMed]
20. Heeney, D.D.; Gareau, M.G.; Marco, M.L. Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *49*, 140–147. [CrossRef] [PubMed]
21. Morikawa, M.; Tsujibe, S.; Kiyoshima-Shibata, J.; Watanabe, Y.; Kato-Nagaoka, N.; Shida, K.; Matsumoto, S. Microbiota of the Small Intestine Is Selectively Engulfed by Phagocytes of the Lamina Propria and Peyer's Patches. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163607. [CrossRef]
22. Norma Oficial Mexicana. *Especificaciones TéCnicas Para la ProducciÓN, Cuidado Y Uso de Los Animales de Laboratorio*; [NOM-062-ZOO-1999]. 6 December 1999; Diario Oficial de la Federación: Ciudad de México, México, 1999.
23. MacFaddin, J.F. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*; Medica Panamericana: Madrid, Spain, 2003; pp. 344–353.
24. Burbano, E.; Sierra, S.; Torres, K.; Mercado, M.; Carrascal, A.; Poutou, R. Rapid DNA extraction and PCR validation for direct detection of Listeria monocytogenes in raw milk. *Rev. MVZ Córdoba* **2006**, *11*, 715–724. [CrossRef]
25. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 2731–2739. [CrossRef]

26. Orihuel, A.; Terán, L.; Renaut, J.; Vignolo, G.M.; De Almeida, A.M.; Saavedra, M.L.; Fadda, S. Differential Proteomic Analysis of Lactic Acid Bacteria—Escherichia coli O157:H7 Interaction and Its Contribution to Bioprotection Strategies in Meat. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1083. [CrossRef]
27. Kushkevych, I.; Kotrsová, V.; Dordević, D.; Buňková, L.; Vítězová, M.; Amedei, A. Hydrogen Sulfide Effects on the Survival of Lactobacilli with Emphasis on the Development of Inflammatory Bowel Diseases. *Biomolecules* **2019**, *9*, 752. [CrossRef]
28. Llorente, B.A. Caracterización de la Actividad Antibacteriana de Pediococcus Acidilactici ATCC 8042. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. 2008. Available online: http://132.248.9.195/ptd2008/junio/0628529/Index.html (accessed on 3 March 2022).
29. Wessel, D.; Flügge, U.I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **1984**, *138*, 141–143. [CrossRef]
30. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [CrossRef]
31. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [CrossRef] [PubMed]
32. Mora, D.; Musacchio, F.; Fortina, M.; Senini, L.; Manachini, P. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in Pediococcus acidilactici and Pediococcus pentosaceus strains. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *94*, 561–570. [CrossRef] [PubMed]
33. Valence, F.; Lortal, S. Zymogram and Preliminary Characterization of Lactobacillus helveticus Autolysins. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3391–3399. [CrossRef]
34. Salgado, A.M.; Herrera, D.J.; Dinkova, T.D. Caracterización de patrones de hordeínas en variedades mexicanas de cebada maltera. *Tip. Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* **2015**, *18*, 43–51.
35. Bos, D.H.; Posada, D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. *Dev. Comp. Immunol.* **2005**, *29*, 211–227. [CrossRef] [PubMed]
36. Söhngen, C.; Bunk, B.; Podstawka, A.; Gleim, D.; Overmann, J. BacDive the Bacterial Diversity Metadatabase. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D592–D599. [CrossRef]
37. Gunkova, P.I.; Buchilina, A.S.; Maksimiuk, N.N.; Bazarnova, Y.G.; Girel, K.S. Carbohydrate Fermentation Test of Lactic Acid Starter Cultures. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2021**, *852*, 012035. [CrossRef]
38. Axelsson, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*; Salmine, S., Wright, A.V., Ouwehand, A., Eds.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 2004; pp. 1–67.
39. Singer, J.R.; Blosser, E.G.; Zindl, C.L.; Silberger, D.J.; Conlan, S.; Laufer, V.A.; DiToro, D.; Deming, C.; Kumar, R.; Morrow, C.D.; et al. Preventing dysbiosis of the neonatal mouse intestinal microbiome protects against late-onset sepsis. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1772–1782. [CrossRef]
40. Perelmuter, K.; Fraga, M.; Zunino, P. In vitro activity of potential probiotic Lactobacillus murinus isolated from the dog. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, 1718–1725. [CrossRef]
41. Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C.M.A.P.; Harris, H.M.B.; Mattarelli, P.; O'Toole, P.W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 2782–2858. [CrossRef]
42. Jimenez-Trigos, E.; Toquet, M.; Barba, M.; Gómez-Martín, Á.; Quereda, J.J.; Bataller, E. Search of antimicrobial lactic acid bacteria from Salmonella-negative dogs. *BMC Veter. Res.* **2022**, *18*, 12. [CrossRef]
43. Park, S.; Itoh, K. Species-specific oligonucleotide probes for the detection and identification of *Lactobacillus* isolated from mouse faeces. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99*, 51–57. [CrossRef]
44. Dubois, D.R.; Sabrina, V.; Isabelle, D.; Christopher, M.; Andre, T.; Philippe, T. In Vitro Antagonistic Activity Evaluation of Lactic Acid Bacteria (LAB) Combined with Cellulase Enzyme Against *Campylobacter jejuni* Growth in Co-Culture. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *21*, 62–70. [CrossRef]
45. Messaoudi, S.; Kergourlay, G.; Rossero, A.; Ferchichi, M.; Prevost, H.; Drider, D.; Manai, M.; Dousset, X. Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*. *Int. Microbiol.* **2011**, *14*, 103–110. [CrossRef]
46. Vandooren, J.; Geurts, N.; Martens, E.; Steen, P.E.V.D.; Opdenakker, G. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 211–220. [CrossRef] [PubMed]
47. Sharma, A.K.; Kumar, S.; Dhakan, D.B.; Sharma, V.K. Prediction of peptidoglycan hydrolases—A new class of antibacterial proteins. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 411. [CrossRef] [PubMed]
48. Mesnage, S.; Dellarole, M.; Baxter, N.J.; Rouget, J.-B.; Dimitrov, J.D.; Wang, N.; Fujimoto, Y.; Hounslow, A.M.; Lacroix-Desmazes, S.; Fukase, K.; et al. Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM domains. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4269. [CrossRef] [PubMed]
49. Johansson, M.U.; de Château, M.; Wikström, M.; Forsén, S.; Drakenberg, T.; Björck, L. Solution structure of the albumin-binding GA module: A versatile bacterial protein domain. *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 859–865. [CrossRef]
50. Lopez-Arvizu, A.; Rocha-Mendoza, D.; Ponce-Alquicira, E.; García-Cano, I. Characterization of antibacterial activity of a N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase produced by *Latilactobacillus sakei* isolated from salami. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *37*, 65. [CrossRef]

51. Jayakumar, J.; Kumar, V.; Biswas, L.; Biswas, R. Therapeutic applications of lysostaphin against *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 1072–1082. [CrossRef] [PubMed]
52. WHO. Campylobacter. 2018. Available online: https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/campylobacter (accessed on 10 March 2022).
53. Farfán-García, A.E.; Ariza-Rojas, S.C.; Vargas-Cárdenas, F.A.; Vargas-Remolina, L.V. Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena. *Rev. Chil. Infectol.* **2016**, *33*, 438–450. [CrossRef] [PubMed]
54. Beier, R.C.; Foley, S.L.; Harvey, R.B. Editorial for the Special Issue: Foodborne Pathogen Distribution, Ecology, Inactivation, and Methods of Differentiation. *Microorganisms* **2019**, *7*, 701. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.