



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO
DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS A
PARTIR DE GRÁNULOS DE KÉFIR**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
ABIGAIL CARRILLO HUESCA**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	PROFESOR:	ESCALANTE LOZADA JOSÉ ADELFO
VOCAL	PROFESORA:	DÍAZ RUÍZ GLORIA
SECRETARIO	PROFESORA:	GILES GÓMEZ MARTHA
1er. SUPLENTE	PROFESOR:	RUÍZ TERÁN FRANCISCO
2do. SUPLENTE	PROFESORA:	MINA CETINA ALEIDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CEPARIO. LABORATORIO 1-C, PRIMER PISO, EDIFICIO A.
FACULTAD DE QUÍMICA
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA

M. en B. MARTHA GILES GÓMEZ

SUSTENTANTE

ABIGAIL CARRILLO HUESCA

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Proyecto DGAPA-PAPIME-UNAM PE-203821 “Evaluación de probióticos en alimentos fermentados y productos farmacéuticos de México”.

ÍNDICE GENERAL

1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	9
3. Antecedentes.....	11
3.1 Influencia de la microbiota intestinal en la salud humana.....	11
3.2 Probióticos.....	13
3.2.1 Evaluación de potencial probiótico.....	17
3.3 Alimentos fermentados.....	19
3.4 Kéfir.....	21
3.4.1 Qué es y origen.....	21
3.4.2 Tipos de kéfir.....	21
3.4.3 Composición del kéfir.....	22
3.4.4 Características físicas y composición de los gránulos de kéfir de leche.....	23
3.4.5 Microorganismos identificados como probióticos en el kéfir y sus beneficios a la salud.....	26
3.5 Bacterias ácido lácticas.....	29
3.5.1 <i>Lactobacillus</i>	30
3.5.2 <i>Streptococcus</i>	31
3.5.3 Metabolismo de bacterias ácido lácticas.....	31
3.5.4 Métodos de identificación de BAL.....	32
4. Justificación.....	36
5. Objetivos.....	37
5.1 Objetivo general.....	37
5.2 Objetivos particulares.....	37
6. Hipótesis.....	37
7. Metodología y materiales.....	38
.....	41
7.1 Preparación inicial de gránulos de kéfir.....	42
7.2. Concentración de bacterias lácticas y levaduras presentes en el Kéfir.....	42
7.3. Separación de grupos microbianos presentes en el Kéfir.....	42
7.3.1 Tratamiento general de extracción.....	42
7.3.2 Obtención de consorcios microbianos.....	43
7.4. Aislamiento y purificación de bacterias con morfología bacilar a partir de los consorcios.....	43

7.5. Aislamiento y purificación de bacterias con morfología de cocos a partir de los consorcios.	43
7.6. Conservación en ultracongelación a -70 °C.	44
7.7. Reactivación y verificación de pureza.	44
7.8. Prueba de catalasa.	44
7.9. Evaluación de potencial probiótico.	44
7.10. Determinación de la concentración aproximada de UFC para consorcios microbianos.	45
7.11. Determinación de la concentración aproximada de células para bacterias puras.	46
7.12. Ensayo cualitativo de antibiosis.	46
7.13. Ensayo de resistencia a lisozima.	47
7.14. Extracción de DNA cromosomal.	47
7.15. Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR.	48
7.16. Purificación del gen ribosomal 16S.	48
7.17. Secuenciación del gen que codifica para la región ARNr 16S e identificación microbiana.	49
8. Resultados y Discusión.	51
8.1 Aislamiento de bacterias ácido-lácticas.	52
8.1.1 Separación de consorcio bacterias-levaduras.	52
8.1.2 Características macroscópicas y microscópicas de los consorcios (bacterias- levaduras) obtenidos.	53
8.1.3 Selección de colonias y aislamiento de bacilos y cocos.	58
8.2 Evaluación del potencial probiótico.	59
8.3 Evaluación de potencial antagónico contra patógenos.	66
8.4 Ensayo con lisozima.	71
8.5 Identificación microbiana mediante el gen ribosomal 16S.	73
8.5.1 Extracción de ADN cromosomal y electroforesis.	73
8.5.2 Amplificación del gen que codifica para la región ARNr 16S por PCR. ..	74
8.5.3 Análisis de secuencias del gen que codifica para la región ARNr 16S e identificación.	76
9. Conclusiones.	83
10. Perspectivas.	84
11. Referencias.	85
12. Anexos.	97

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Microorganismos reportados en kéfir y gránulos de kéfir. Gao y Li, (2016).</i>	24
<i>Tabla 2. Reactivos empleados en la amplificación del gen ribosomal 16S del kit Thermo Scientific™</i>	49
<i>Tabla 3. Condiciones del programa empleado en el termociclador Perkin-Elmer para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S de acuerdo con Weisburg et al., 1991.</i>	50
<i>Tabla 4. Cuantificación de bacterias ácido-lácticas y levaduras en gránulos de kéfir</i>	51
<i>Tabla 5. Características morfológicas de consorcios microbianos en agar APT.</i>	55
<i>Tabla 6. Características morfológicas de colonias de aislamientos en agar MRS.</i>	56
<i>Tabla 7. Resultados de la tinción de Gram y prueba catalasa colonias de cocos.</i>	59
<i>Tabla 8. Concentración de microorganismos desarrollados a partir de la colonia mixta 22 en caldo APT.</i>	60
<i>Tabla 9. Valores de UFC/mL obtenidos por D.O._{600nm} por colonias mixtas para el ensayo de pH y sales biliares.</i>	61
<i>Tabla 10. Porcentajes de sobrevivencia obtenidos para el ensayo de resistencia a pH 3.5 y sales biliares al 0.3%. Colonias mixtas.</i>	62
<i>Tabla 11. Concentración de células a partir de cuenta microscópica obtenida para el ensayo de resistencia a pH 3.5 y sales biliares al 0.3% para colonias puras. ...</i>	63
<i>Tabla 12. Resultados en porcentaje de sobrevivencia obtenidos para el ensayo de resistencia a pH 3.5 y sales biliares al 0.3%. Colonias puras.</i>	64
<i>Tabla 13. Resultados positivos del ensayo de antibiosis colonias mixtas.</i>	67
<i>Tabla 14. Resultados positivos ensayo de antibiosis bacilos puros ajustados a D. O. 600 nm0.2 contra patógenos D. O. 600 nm0.2.</i>	68
<i>Tabla 15. Resultados positivos ensayo de antibiosis bacilos puros ajustados D. O. 600 nm0.7 contra patógenos D. O. 600 nm0.2.</i>	69
<i>Tabla 16. Ensayo de lisozima bacilos puros.</i>	71
<i>Tabla 17. Concentración de ADN en productos de PCR por nanodrop (Thermo).</i>	76
<i>Tabla 18. Identificación de microorganismos a partir de las secuencias del gen que codifica para la región ARNr 16S con 100% de identidad.</i>	81
<i>Tabla 19. Identificación de microorganismos por género y especie a partir del gen que codifica para la región ARNr 16S.</i>	81
<i>Tabla 20. Disoluciones empleadas para la extracción de DNA.</i>	98

Tabla 21. Características de los primers universales Fd1 y Rd1 empleados en la amplificación del gen que codifica para la región ARNr 16S..... 99

Tabla 22. Protocolo para purificación del gen ribosomal 16S con Thermo Scientific GeneJet PCR Purification kit. Protocolo A. Purificación de ADN utilizando una centrífuga. 99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica de bacterias ácido lácticas. 32

Figura 2. Esquema general de trabajo: cuantificación de microorganismos en gránulos de kéfir..... 38

Figura 3. Esquema general de trabajo: Obtención de consorcios microbianos aisladas a partir de gránulos de kéfir..... 39

Figura 4. Esquema general de trabajo: evaluación de consorcio bacteriano. 40

Figura 5. Esquema general de trabajo: separación de consorcio microbiano. 41

Figura 6. Crecimiento del consorcio microbiano en agar APT..... 54

Figura 7. Crecimiento en agar MRS con cicloheximida 1.4% V/V..... 55

Figura 8. Tinción simple con cristal violeta 1000x de microorganismos presentes en los gránulos del kéfir. 57

Figura 9. Resultados obtenidos del ensayo de antibiosis, colonia mixta y pura... 70

Figura 10. Ensayo de lisozima colonia 8. 73

Figura 11. ADN cromosomal cocos..... 74

Figura 12. Amplificación del gen que codifica para la región ARNr 16S mediante PCR..... 75

Figura 13. Árbol filogenético para los microorganismos en estudio. 80

Figura 14. ADN cromosomal bacilos..... 102

Figura 15. Amplificación del gen que codifica para la región ARNr 16S por técnica de PCR..... 103

1. Resumen.

El kéfir es una bebida obtenida a partir de la fermentación de la leche (generalmente de vaca), mediante un cultivo iniciador denominado gránulos de kéfir, los cuales están conformados por un consorcio de bacterias y levaduras. Diversos estudios de los gránulos de kéfir de diferentes regiones del mundo señalan la presencia de microorganismos con capacidad probiótica, los cuales presentan diferencias por diversos factores destacando la región de origen, por lo que es conveniente hacer estudios de la microbiota que compone a los gránulos de kéfir en una región de la República Mexicana.

A partir de gránulos provenientes de un comerciante del centro de Xochimilco, desarrollados de manera casera, se realizó la separación de colonias que estuvieron conformadas por consorcios microbianos, para ello se desintegró mecánicamente el gránulo en disolución salina, seguido de la separación de bacterias y levaduras mediante el uso de medios de cultivo selectivos seleccionando 10 colonias redondas conformadas por bacilos y cocos, 7 colonias por cocos y 12 colonias redondas con textura mucoide conformadas por bacterias con morfología bacilar de diferente tamaño, Gram-positivas, catalasa negativas.

El potencial probiótico de las bacterias ácido-lácticas fue probado cualitativamente mediante el uso de medios con pH 3.5 y sales biliares 0.3% en las colonias mixtas y en bacilos puros. Todas aquellas que resistieron a las condiciones expuestas, se sometieron a un ensayo de antibiosis contra *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes*, de las cuales solo 6 mixtas y 5 puras lograron inhibir el crecimiento de estos microorganismos patógenos, siendo 2 de las colonias puras los que se expusieron y fueron resistentes a un medio con lisozima en una concentración de 7 mg/mL, por lo que se consideran poseen potencial probiótico. Mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S se realizó la identificación de las bacterias aisladas siendo estas *Lactobacillus kefirifaciens* y *Lactobacillus kefiri* y los cocos pertenecientes al género *Staphylococcus* como microbiota acompañante.

2. Introducción.

Debido a los crecientes problemas de salud en la población no solo en el país, si no alrededor de todo el mundo, es que los profesionales de la salud siguen en búsqueda de soluciones y la prevención de estos.

Diversos estudios han asociado enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal, la obesidad, el cáncer de colon y algunas alergias como consecuencia de las alteraciones en el microbioma intestinal (Banan-Mwine y Lee, 2015). En América Latina algunos estudios han señalado la mejora de parámetros relacionados con la obesidad tras el consumo del kéfir en modelos animales. En humanos, se ha observado un papel beneficioso de su consumo en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Peluzio *et al.*, 2021).

El término microbioma hace referencia al conjunto de la microbiota, sus genes y sus metabolitos (Icaza-Chávez, 2013). La microbiota intestinal ha pasado de considerarse un consorcio acompañante a un “órgano metabólico” con funciones en la nutrición, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica, es debido a ello que una alteración en esta que no es asimilada de forma benéfica en el hospedero (disbiosis) tiene como consecuencia la generación de enfermedades en la salud humana (Icaza-Chávez, 2013).

Es debido a esta relación de disbiosis-enfermedad que los profesionales de la salud se han enfocado en revertir las alteraciones de la microbiota, utilizando para ello probióticos; microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedero (FAO/OMS, 2002).

El efecto benéfico de los alimentos probióticos en salud y nutrición humana ha sido reconocido cada vez más en el campo de la salud. Diversos estudios de las propiedades y funcionalidad de los microorganismos vivos en los alimentos sugieren que los probióticos poseen un papel importante en las funciones inmunológica, digestiva y respiratoria y éstas pueden tener un efecto significativo en la mejora de enfermedades infecciosas en niños y otros grupos de riesgo (FAO/OMS, 2002; Álvarez *et al.*, 2021).

En alimentos fermentados tradicionales se han encontrado microorganismos con potencial probiótico. El kéfir (llamado comúnmente como búlgaros) es ampliamente conocido como una excelente fuente de probióticos con posibles beneficios para la salud (Assumpcao *et al.*, 2017).

El kéfir es una masa biológica elástica gelatinosa compuesta por proteínas, lípidos y una cápsula de polisacárido llamado kefirano (Lopitz-Ostsoa *et al.*, 2006) que poseen una compleja composición microbiológica: *Lactococos*, *Leuconostoc* spp., lactobacilos termófilos y mesófilos, levaduras (lactosa positivas y negativas) y bacterias ácido acéticas (Lopitz-Ostsoa *et al.*, 2006).

Debido a lo antes mencionado a partir de los gránulos de kéfir o búlgaros multiplicados de forma casera, en este proyecto se aislaron bacterias lácticas con forma bacilar y se determinaron algunas características cualitativas para evaluar su potencial probiótico.

3. Antecedentes.

3.1 Influencia de la microbiota intestinal en la salud humana.

La salud de un individuo depende de su biología (genética, desarrollo, envejecimiento), estilo de vida (alimentación, ejercicio, consumo de fármacos, hábitos tóxicos, etc.), medio ambiente (factores externos físicos, químicos, biológicos, psicosociales, socioculturales, etc.), y del sistema sanitario que le atiende (utilización de servicios, eficacia, eficiencia, etc.). La colonización microbiana está implicada, de un modo u otro, en muchas de esas variables y su papel por tanto es relevante en la salud y en la enfermedad debido a su influencia en el desarrollo del sistema inmunitario y la homeostasis del individuo (Álvarez *et al.*, 2021).

Hay cuatro hábitats para la microbiota intestinal, representados por la superficie de las células epiteliales, las criptas del íleon, ciego y colon, la capa de moco que lo recubre y la luz del intestino. La densidad microbiana es en general baja en el intestino delgado y abundante en la luz del colon (Castañeda, 2018). El estómago y el duodeno poseen de $0-10^3$ UFC/mL, en el yeyuno de 10^4 UFC/mL, 10^7 UFC/mL en el íleon distal y el colon densamente poblado hasta por 10^{12} UFC/mL (Ghoshal *et al.*, 2017; Guarner *et al.*, 2017).

La colonización bacteriana del tracto gastrointestinal comienza cuando los recién nacidos son expuestos a un ambiente no estéril, en adelante, se transforma durante toda la vida, dependiendo de una interacción compleja y dinámica entre diversos factores (Rout *et al.*, 2018). A los tres años la microbiota se asemeja a la del adulto aunque algunos grupos microbianos alcanzan sus niveles definitivos en la adolescencia (Álvarez *et al.*, 2021). En el adulto, el 90% de las bacterias intestinales pertenecen a 2 phyla: *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, pero también incluye levaduras, protistas y bacteriófagos. Con la llegada de la senescencia se inicia un nuevo periodo de inestabilidad. El envejecimiento se asocia a pérdida de diversidad microbiana y cambios en los niveles de algunos microorganismos (Álvarez *et al.*, 2021).

Cuando esta microbiota intestinal se encuentra sana tiene la capacidad de volver al estado previo a la perturbación como un episodio de diarrea o después de un tratamiento de antibióticos (Álvarez *et al.*, 2021). Las comunidades microbianas que habitan establemente un nicho viven en un estado de equilibrio que se caracteriza por la abundancia de especies que tienen una relación de comensalismo y mutualismo con el hospedador, de modo que tanto el hospedador como sus huéspedes se ven beneficiados por la simbiosis. Esta situación se conoce como «eubiosis». En contraste, el término «disbiosis» define un desequilibrio que implica perturbación del estado de simbiosis y se reconoce por cambios cualitativos y/o cuantitativos en la composición y funciones de la microbiota.

Múltiples factores como el uso de antibióticos y otros medicamentos, estrés, factores genéticos, dieta, estilo de vida, etc., se han implicado en el origen de la disbiosis. Si el factor desencadenante es intenso o persistente en el tiempo, el proceso puede conducir a enfermedad, generalmente de tipo crónico o recurrente y de patrón inflamatorio (Álvarez *et al.*, 2021).

La disbiosis de la microbiota intestinal se ha asociado a una lista amplia de enfermedades inflamatorias, autoinmunes, metabólicas, neoplásicas, y con algunos trastornos de la conducta.

Algunos de los ejemplos de enfermedades relacionadas con disbiosis son:

- Enterocolitis necrosante en recién nacidos; esta enfermedad es precedida por el aumento de gamma-proteobacterias (enterobacterias) las cuales son causantes de inflamación y la disminución de anaerobios productores de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).
- Desarrollo de alergias; particularmente respiratorias, se asocia con mayor abundancia fecal de *Ruminococcus gnavus*, que tiende a ser baja en sujetos no alérgicos. Los AGCC, y particularmente el butirato, pueden promover tolerancia. El microbioma de bebés que desarrollan sensibilización alérgica en la infancia carece de genes que codifican enzimas clave para el metabolismo de hidratos de carbono y la producción de butirato.

- Diabetes mellitus tipo 2, debido a que la respuesta glucémica a una comida está determinada tanto a la fisiología del hospedador como por la composición de la microbiota intestinal (Álvarez *et al.*, 2021).
- Colitis ulcerosa, es una enfermedad inflamatoria intestinal caracterizada por la respuesta inmuno-inflamatoria exageradas contra microorganismos no patógenos de la microbiota intestinal. Los pacientes presentan pérdida de riqueza y diversidad microbiana en comparación con los controles sanos. La ruptura del equilibrio simbiótico debida al desajuste en el control inmuno-inflamatorio de la población microbiana intestinal conduce a la selección de especies resistentes al oxígeno con potencial inflamatorio.
- Trastorno funcional digestivo; el síndrome de intestino irritable es el trastorno funcional más frecuente, y se caracteriza por la presencia de dolor abdominal recurrente asociado a alteraciones del ritmo deposicional, ya sea en forma de estreñimiento o de diarrea. Los productores de butirato, como *Faecalibacterium prausnitzii*, y la diversidad microbiana están reducidos en pacientes con predominio de diarrea, mientras que los metanógenos están aumentados en pacientes con estreñimiento (Álvarez *et al.*, 2021).
- Obesidad: se ha descrito una microbiota humana de tipo obeso, asociada al exceso de peso y al síndrome metabólico, con un incremento de la razón *Firmicutes/Bacteroidetes*, en experimentos de ratones genéticamente obesos se encontró que estos poseen 50% menos de *Bacteroidetes* y más *Firmicutes* que sus hermanos delgados (Icaza-Chávez, 2013).

3.2 Probióticos.

De acuerdo con la definición de la FAO/OMS (2002) los probióticos son microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedero. Son bacterias Gram-positivas y se

clasifican fundamentalmente en dos géneros, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (FAO, 2006). En los últimos años, la investigación sobre los probióticos ha progresado considerablemente y se han realizado avances notables en la selección y caracterización de cultivos de probióticos concretos y la justificación de las declaraciones de propiedades saludables en relación con su consumo.

Según lo que se menciona en la FAO (2006), los microorganismos probióticos deben tener como característica primordial sobrevivir al paso por el aparato digestivo y poder proliferar en él, por lo que deben ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes en el intestino, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis.

Además de lo antes mencionado, es fundamental que cuente con las siguientes características; 1) debe de encontrarse vivo al momento de ser administrado, 2) debe haber pasado por una evaluación rigurosa que sustente los beneficios a la salud, 3) debe de ser un microorganismo o un conjunto de microorganismos bien definidos taxonómicamente en cuanto a género y especie, y 4) debe de ser seguro para los fines deseados (FAO, 2006).

Con el transcurso del tiempo se han sumado diversas características que deben estar presentes en un microorganismo para ser considerado y utilizarse como probiótico (Rondon *et al.*, 2015):

- No patógenos ni tóxicos.
- No portar genes transmisibles de resistencia a antibióticos utilizados con fines clínicos.
- Contener un número adecuado de cepas viables que conduzcan al efecto beneficioso demostrado.
- Resistencia a fagos.
- Viabilidad durante el procesado.
- Estabilidad en el producto y durante el almacenamiento.
- Evidencia científica: estudios controlados de eficacia en seres humanos

En cuanto a su funcionalidad un probiótica mejora al menos una de las tres funciones principales de la microbiota normal del tracto gastrointestinal: resistencia a la colonización por bacterias patógenas y la inmunomodulación o contribución nutricional cuando este es ingerido ya sea por un humano o por un animal (Vázquez, 2015).

El objetivo del empleo de probióticos está dirigido a su potencial para aportar un efecto beneficioso en la salud. Dicho beneficio puede tener lugar a distintos niveles: (1) el lumen intestinal, mediante su interacción con la microbiota intestinal o ejerciendo un efecto metabólico directo, (2) la mucosa y el epitelio intestinales, incluyendo los efectos de barrera, los procesos digestivos y el sistema inmunológico asociado a la mucosa y (3) otros órganos extraintestinales (Rodríguez *et al.*, 2013).

En el lumen producen fermentación de sustratos no absorbibles o poco absorbidos, modulan la producción de gas, favorecen la desconjugación de las sales biliares, actúan en la acidificación de los ácidos grasos de cadena corta y aumentan el tránsito intestinal. En la mucosa, tienen efecto de barrera, son bactericidas, inactivan toxinas, disminuyen la inflamación y estimulan el sistema inmunológico. Existen múltiples probióticos disponibles, sin embargo, son pocos los que han demostrado un beneficio claro en la salud humana y ninguno es capaz de producir todos los efectos a la vez (Vizcaíno *et al.*, 2016).

Con la amplia investigación que se ha realizado de la influencia de los probióticos en la salud humana, se han encontrado diversos beneficios clínicos de salud en patologías como la diabetes, obesidad, actividad anticancerígena, alérgica y angiogénica, así como antiinflamatorio y antipatogénica, además de su efecto sobre el cerebro y el sistema nervioso central (SNC) (Rodríguez *et al.*, 2013; Vázquez, 2015; Álvarez *et al.*, 2021).

Es importante mencionar que además de la presencia de los probióticos viables, existen diversos productos bacterianos no viables o subproductos metabólicos de este tipo de microorganismos que tienen actividad biológica en el hospedero y contribuyen a los beneficios que estos proporcionan. Dependiendo de la bacteria

ácido láctica se pueden generar: bacteriocinas, ácidos orgánicos, etanol, diacetil, acetaldehídos y peróxido de hidrógeno, los cuales pueden ejercer actividad biológica en el hospedero y tienen una amplia propiedad inhibitoria hacia patógenos (Rout *et al.*, 2018).

Las cepas probióticas comúnmente usadas son: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, *E. coli* Nissle 1917 y *Saccharomyces boulardii*. Cuando se adscribe un efecto benéfico a una cepa, este no se puede extrapolar a las restantes cepas de la misma especie (Sánchez *et al.*, 2015).

Para que los microorganismos puedan desarrollarse adecuadamente en el tracto gastrointestinal, es necesario el consumo de prebióticos, es decir, nutrimentos que no son digeridos por humanos, pero tienen un papel selectivo en la estimulación del crecimiento o la actividad de especies bacterianas benéficas en el intestino, un ejemplo de ellos es la fibra dietética de los alimentos. El desarrollo en la investigación microbiana ha llevado a la formación de simbióticos, que es una fusión de probióticos y productos prebióticos los cuales ayudan a mejorar la supervivencia de microorganismos vivos en el intestino (Rout *et al.*, 2018).

La enorme actividad biológica en el intestino puede ser manipulada y regulada a través de la nutrición (Khaneghah *et al.*, 2020). Los alimentos en los que podemos encontrar probióticos son principalmente aquellos que están constituidos por matrices de suero debido a que ofrecen una condición adecuada para que las bacterias probióticas sobrevivan y crezcan debido a su alta actividad de agua, baja concentración de sal, y ausencia de conservadores comunes, entre ellos se encuentran los productos fermentados como el yogurt, yogurt congelado, quesos como el cheddar, cottage, helado, etc., (Khaneghah *et al.*, 2020).

Para obtener beneficios sobre la salud, es recomendada una dosis de 5 mil millones de unidades formadoras de colonias (UFC) durante al menos 5 días (5×10^9 UFC/día) (Sánchez *et al.*, 2015). Puesto que la principal vía de administración de los microorganismos probióticos es la oral, con objeto de proporcionar estos efectos beneficiosos en el hospedador, las bacterias probióticas

deben sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal, tolerar el ácido, la bilis y las enzimas a nivel gástrico y, posteriormente, adherirse al epitelio intestinal (Sánchez *et al.*, 2015); es por ello que deben administrarse incluidos en formas farmacéuticas o bien en alimentos que le otorguen protección frente a esas condiciones adversas. Estos productos probióticos, además, deben garantizar la supervivencia de los microorganismos en forma viable durante el almacenamiento hasta el final de vida útil ($>10^6$ UFC/g) (Sánchez *et al.*, 2015).

En la actualidad existen diversas presentaciones para la administración de probióticos; alimentos, complementos alimenticios y productos farmacéuticos, que permiten que su consumo esté más al alcance de la población. Dentro de los microorganismos que se encuentran en estos productos están los siguientes; *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. biphidus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *B. bifidus*, *S. thermophilus*, *L. paracasei*, *L. helveticus*, *L. reuteri*, *B. lactis*, *B. subtilis*, *Saccharomyces boulardii* entre otros (Sánchez *et al.*, 2015).

3.2.1 Evaluación de potencial probiótico

De acuerdo con la FAO (2006) con el fin de evaluar las propiedades de los probióticos es necesario seguir las siguientes directrices.

3.2.1.1 Selección de cepas probióticas para su utilización en seres humanos.

Verificar que una cepa tenga la capacidad de seguir siendo viable en el lugar de destino y de ser eficaz, es decir, que siga aportando los beneficios buscados. Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deberían ser capaces no solo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Con el fin de evaluar lo antes mencionado se llevan a cabo los siguientes ensayos *in vitro* (FAO, 2002):

- Resistencia a la lisozima.

En el caso de la lisozima es necesaria su evaluación debido a que es una enzima presente en la saliva de la boca que posee una actividad bactericida o

bacteriostática frente a bacterias Gram-positivas como es descrito por Fleming en 1902 y pequeño efecto sobre Gram-negativas (Salinas, 2012). La lisozima o muramidasa forma parte del grupo de las hidrolasas glucosídicas y cataliza la hidrólisis del enlace beta 1-4 entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico de las paredes celulares de las bacterias (Gálvez-Irqui *et al.*, 2020).

- Resistencia a la acidez gástrica y sales biliares

En cuanto a la evaluación de resistencia a acidez gástrica y sales biliares de acuerdo con distintas investigaciones (Gutiérrez, 2015; Morales, 2019) se evalúa mediante la exposición a pH 3.5 y sales biliares 0.3% por 24 h. La selección de estas condiciones está fundamentada en el hecho de que el pH en el estómago oscila en un rango de 2.5 a 3.5 (Gutiérrez, 2015) y en general, la concentración fisiológica de sales biliares en el humano está en un rango de 0.3% a 0.5% como mencionan Song *et al.*, (2015), en donde realizaron la caracterización de *Lactobacillus* bajo estas condiciones de sales.

- Evaluación de la actividad antimicrobiana contra bacterias potencialmente patógenas.
- Determinación de patrones de resistencia a antibióticos.

Para corroborar los efectos *in vitro*, se deben realizar los ensayos *in vivo* con modelos animales apropiados antes de someterse a cualquier ensayo en humanos.

3.2.1.2 Clasificación e identificación de las distintas cepas.

Determinar a qué taxón pertenece la nueva cepa identificada. De acuerdo con el consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología, la cepa de un probiótico se identifica con el género, la especie y la designación alfanumérica, siguiendo el Código Internacional de Nomenclatura y la clasificación de los organismos procariontes. Las técnicas moleculares actuales utilizadas para la identificación incluyen técnicas basadas en PCR, secuenciación del gen que codifica para el

ARNr 16S y técnicas de huellas dactilares de ADN como ribotipificación y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

3.2.1.3 Definición y medición de los beneficios de los probióticos para la salud.

Cuando se utilizan microorganismos probióticos a fin de conferir al huésped beneficios para la salud deben indicarse los regímenes de dosificación y duración recomendados por el fabricante de cada cepa o producto sobre la base de datos científicos y según lo aprobado en el país donde se vende. Se indicará la cantidad mínima diaria de cada producto necesaria a fin de que éste confiera beneficios específicos para la salud. Estos datos deberían, siempre que sea posible, ser el resultado de estudios *in vivo*, en animales (cuando sea pertinente) y en seres humanos.

3.3 Alimentos fermentados.

Bioquímicamente, la fermentación es el proceso metabólico en el cual los carbohidratos y compuestos relacionados se oxidan parcialmente con la liberación de energía en ausencia de aceptores externos de electrones. Los aceptores de electrones finales son compuestos orgánicos producidos directamente a partir de la descomposición de los carbohidratos. En consecuencia, se produce una oxidación incompleta del compuesto original, y solo una pequeña cantidad de energía se libera durante el proceso. Los productos de fermentación consisten en algunos productos orgánicos, compuestos que son más reducidos que otros y que son precursores de metabolitos esenciales para la célula (Jay *et al.*, 2005).

Durante la fermentación, los microorganismos transforman los componentes del alimento original produciendo ácidos orgánicos (láctico y acético), dióxido de carbono, alcohol, exopolisacáridos y metabolitos antimicrobianos como las bacteriocinas, entre otros dependiendo del fermento utilizado, además, se mejora el valor nutricional de los productos, ya que se ve favorecida la digestibilidad de las

proteínas por la proteólisis llevada a cabo por los microorganismos iniciadores o aumenta la producción o biodisponibilidad de vitaminas (Ferreira *et al.*, 2020).

Dentro de los microorganismos probióticos estudiados, se encuentran aquellos que han sido encontrados en los alimentos fermentados; los alimentos fermentados, son aquellos producidos a través del crecimiento microbiano controlado y por la acción enzimática que estos llevan a cabo de los componentes del alimento (García *et al.*, 2004; Dimidi *et al.*, 2019).

Históricamente, la fermentación de alimentos se ha utilizado como un método de conservación, ya que la generación de metabolitos antimicrobianos (por ejemplo, ácidos orgánicos, etanol y bacteriocinas) reduce el riesgo de contaminación con microorganismos patógenos. La fermentación también se usa para mejorar las propiedades sensoriales, por ejemplo, sabor y textura (Dimidi *et al.*, 2019).

Aunque en la actualidad hay alimentos fermentados que se producen de manera industrial, existen otros que se producen en menor escala, de forma artesanal, semicomercial, o bien, sólo se consumen por ciertos grupos sociales o etnias. Estos son conocidos como “alimentos fermentados tradicionales” (Wacher-Rodarte, 2002).

Se cree que en el mundo existen cerca de 3 500 alimentos fermentados tradicionales. En México, se cree que existen más de 200 bebidas y alimentos fermentados. Dentro de las técnicas culinarias ancestrales que distinguen a la cocina mexicana se encuentran las fermentaciones a partir de ingredientes locales diversos: el maíz (*Zea mays*) del cual derivan alimentos como el atole agrio, pozol y tescüino, a partir de savia extraída de *Agave atrovirens* derivando el pulque (Quintero-Salazar *et al.*, 2012). También se han usado ingredientes como lo son las frutas, obteniendo tepache y tejuino, y leche derivando jocoque y kéfir el cual, aunque no tiene como origen México, también es una bebida que se consume en los hogares por ser un producto de fácil preparación.

3.4 Kéfir.

3.4.1 Qué es y origen.

Dentro de los principales productos lácteos fermentados se encuentra el kéfir que es una bebida tradicional obtenida a través de la fermentación de la leche por los gránulos de kéfir. El nombre kéfir se deriva de la palabra turca keyif, que significa "buen sentimiento" para los sentimientos experimentados después de beberlo (Gao y Li, 2016). El kéfir tiene su origen en los Balcanes, al este de Europa y en el Cáucaso (Prado *et al.*, 2015).

3.4.2 Tipos de kéfir.

Los gránulos de kéfir son capaces de fermentar distintos tipos de leche y distintos tipos de jugos (Gao y Li, 2016), los que son capaces de fermentar bebidas azucaradas son conocidos como kéfir de azúcar, agua o tibicos, los que fermentan leche, se conocen como kéfir de leche y ambos están compuestos principalmente de bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras como *Leuconostoc*, *Acetobacter syzygii*, *Kluyveromyces*, *Pichia* y *Saccharomyces*, respectivamente (Assumpcao *et al.*, 2017).

La principal diferencia entre los gránulos de kéfir de agua y de leche es su origen. El origen de los gránulos de kéfir de agua es aún incierto. Existen algunas descripciones de gránulos similares llamados "plantas de cerveza de jengibre" que soldados ingleses importaron de la guerra de Crimea en 1855 (Monard *et al.*, 2014), y el principal microorganismo formador del polisacárido que ayuda a la formación de la matriz, ya que como se mencionó anteriormente, en el caso del kéfir de leche corresponde a *Lactobacillus kefiranofaciens* y en el caso del kéfir de agua *Lactobacillus hilgardii* (Monard *et al.*, 2014).

La matriz del kéfir de agua está compuesta por un polisacárido formado por glucosa unida por enlaces alfa 1-6, con ramificaciones en uniones alfa 1-3, hecho que lo

diferencia de la matriz del gránulo de kéfir de leche compuesta por proteínas y kefirano (Ferrari *et al.*, 2020).

3.4.3 Composición del kéfir.

Esta bebida es obtenida a partir de la incorporación de los gránulos de kéfir como cultivo iniciador a la leche, llevándose a cabo el proceso de fermentación ácido láctica, el kéfir es recuperado a partir de una matriz granular utilizándose para el siguiente proceso de fermentación (Vázquez, 2015).

Las características de la bebida varían dependiendo de diversos factores;

- 1) Origen de los gránulos: la composición microbiana de los gránulos varía dependiendo de su origen geográfico.
- 2) El tipo y el volumen de leche: la leche de vaca es la más comúnmente utilizada para la elaboración del kéfir, sin embargo, se puede utilizar cualquier tipo de leche como la de cabra o de oveja y esta puede ser entera o descremada. Debe tenerse en cuenta que cuanto mayor sea la cantidad de grasa de la leche, más cremoso y espeso será el producto (Gao y Li 2016; Ferrari *et al.*, 2020).
- 3) Relación gránulo/leche; los gránulos se inoculan normalmente al 1-10% (p/v) dependiendo de las características deseadas.
- 4) Temperatura y tiempo de fermentación: habitualmente el kéfir se prepara a temperatura ambiente, de manera tal que la fermentación se lleve a cabo entre 18 y 30°C durante 18 a 72 h, siendo la temperatura óptima 25°C.

La composición típica de la bebida del kéfir dependiendo de la fuente de la leche es del 89-90% humedad, 3.0% lípidos, 3.0-3.4% proteínas, 2-3.5% de lactosa, 0.5-2% de alcohol, 0.6-1% ácido láctico y 0.08-0.2% de CO_2 (Vázquez, 2015) siendo estos últimos y el CO_2 los principales productos de la fermentación (Arslan, 2015), en donde el contenido de CO_2 está relacionado positivamente con el contenido de gránulos de kefir.

El kéfir contiene vitaminas (B1, B2, B5, C, A y K), minerales y aminoácidos esenciales provenientes de proteínas parcialmente digeridas que facilitan su digestión por el cuerpo (valina, isoleucina, metionina, lisina, treonina, fenilalanina y triptófano) que son benéficos para la salud y la homeostasis (Arslan, 2015). Con respecto a los minerales, el kéfir es una buena fuente de calcio, magnesio y fósforo. Además, se encuentran presentes diversos ácidos orgánicos que le confieren sabor y aroma a la bebida; ácido acético, pirúvico, propiónico, butírico, diacetilo, acetaldehído que se encuentran en concentraciones de ppm (Arslan, 2015).

3.4.4 Características físicas y composición de los gránulos de kéfir de leche.

Los gránulos de kéfir son masas gelatinosas, irregulares, con forma de coliflor, de tamaño variable (0.3 a 3.5 cm de diámetro), de color blanco o ligeramente amarillento y consistencia elástica. Contienen aproximadamente un 83% (p/p) de agua, 4-5% (p/p) proteínas y un 10% (p/p) de polisacáridos (Ferrari *et al.*, 2020). Están formados por una matriz de polisacárido (denominado “kefirano”) y proteínas. El kefirano es un heteropolisacárido compuesto en proporciones iguales de glucosa y galactosa y es producido principalmente por *Lactobacillus kefiranofaciens* (Prado *et al.*, 2015). Su peso molecular es de 1000-4000 kDa, es soluble en agua (Vázquez, 2015).

Un estudio realizado por los investigadores chinos Lu *et al.*, (2014), entre otros, demostró que los gránulos de kéfir están formados de unidades globulares con un diámetro de entre 2.0 y 9.0 mm, los cuales poseen una estructura de red poliédrica formada por bacterias y levaduras en la superficie exterior de los gránulos. De acuerdo con estudios de microscopía de barrido, en los gránulos de kéfir mexicano, se detectan tres tipos de lactobacilos; largo, corto y curvo (Vázquez, 2015).

La matriz de los gránulos de kéfir se encuentra formada por bacterias ácido lácticas con una concentración de 10^8 UFC/g, 10^5 UFC/g de bacterias ácido acéticas y de 10^6 - 10^7 UFC/g levaduras (Prado *et al.*, 2015). Las levaduras y los lactobacilos son mutuamente dependientes y crecen en proporciones equilibradas en los gránulos

de kéfir (Arslan, 2015), por lo que la población de los gránulos de kéfir se ha citado como una comunidad simbiótica, lo cual hace problemática la identificación y el estudio de los microorganismos que los constituyen (Arslan, 2015), sin embargo, su estudio ha ido creciendo con el tiempo, hasta llegar a posicionar al kéfir como una excelente fuente de probióticos con posibles beneficios para la salud (Assumpcao, 2017).

Es importante mencionar que los microorganismos comúnmente aislados de gránulos de kéfir presentan diferencia de acuerdo a la región de origen, el sustrato empleado en el proceso de fermentación y el método de mantenimiento del cultivo (Sarkar, 2008; Prado *et al.*, 2015; Gao y Li, 2016), pero tienen como punto en común los grupos de bacterias lácticas homo y heterofermentativas que los componen; los principales géneros de bacterias ácido lácticas son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Gao y Li, 2016), mientras que para las levaduras las principales especies son *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *Yarrowia lipolytica* (Lu *et al.*, 2014). Se cuenta con una extensa lista de microorganismos identificados dentro de esta compleja matriz (tabla 1), los cuales serán responsables de las características de cada kéfir.

Tabla 1. Microorganismos reportados en kéfir y gránulos de kéfir. Gao y Li, (2016).

Nombre	Producto de origen	Países o regiones
Lactobacilos		
<i>L. acidophilus</i>	Gránulos de kéfir, bebida de kéfir	España, Argentina, Dinamarca, Turquía
<i>L. amylovorus</i>	Gránulos de kéfir	Dinamarca, Brasil
<i>L. brevis</i>	Gránulos de kéfir	España
<i>L. buchneri</i>	Bebida de kéfir	Argentina, Italia

<i>L. casei</i>	Gránulos de kéfir	España, Tibet
<i>L. crispatus</i>	Gránulos de kéfir, bebida de kéfir	Argentina, Sudáfrica, Irlanda, Turquía
<i>L. delbrueckii</i>	Gránulos de kéfir	Sudáfrica
<i>L. fermentum</i>	Gránulos de kéfir	España, Sudáfrica
<i>L. gasseri</i>	Gránulos de kéfir	España
<i>L. gallinarum</i>	Gránulos de kéfir	Sudáfrica, Irlanda
<i>L. helveticus</i>	Bebida de kéfir, gránulos de kéfir	Argentina, Tibet, Turquía
<i>L. hilgardii</i>	Agua de kéfir, gránulos de kéfir	Alemania y Turquía
<i>L. hordei</i>	Agua de kéfir, gránulos de kéfir	Alemania, Taiwán
<i>L. jenseii</i>	Bebida de kéfir	Argentina, Tibet
<i>L. kefiranofaciens</i>	Gránulos de kéfir, bebida de kéfir	Italia, Bulgaria, Argentina, Taiwán, Tíbet, Dinamarca, Brasil, Italia, Eslovenia, Turquía
<i>L. kefirgranum</i>	Gránulos de kéfir	Italia, Bélgica, Taiwán
<i>L. kefiri</i>	Gránulos de kéfir, leche de kéfir, bebida de kéfir	Grecia, Tibet, Brasil, Argentina, Taiwán, Italia, Eslovenia
<i>L. nagelii</i>	Agua de kéfir	Alemania

<i>L. otakiensis</i>	Bebida de kéfir, gránulos de kéfir	Argentina, Italia
<i>L. parabuchneri</i>	Kéfir	Brasil
<i>L. paracasei</i>	Gránulos de kéfir	Argentina
<i>L. parakefir</i>	Gránulos de kéfir	Argentina, Eslovenia
<i>L. plantarum</i>	Gránulos de kéfir	Tibet
<i>L. reuteri</i>	Gránulos de kéfir	Turquía
<i>L. rhamnosus</i>	Gránulos de kéfir	España
<i>L. satsumensis</i>	Leche de kéfir, gránulos de kéfir	Brasil, México
<i>L. sunkii</i>	Bebida de kéfir	Argentina, Italia
<i>L. viridescens</i>	Gránulos de kéfir	España

3.4.5 Microorganismos identificados como probióticos en el kéfir y sus beneficios a la salud.

Existe una creciente evidencia de que el kéfir puede contener ingredientes bioactivos, lo que indica que este producto único de leche fermentada es un importante alimento probiótico y/o funcional (Kesenkas, 2017).

Los péptidos con actividad biológica o ‘bioactivos’ son secuencias de aminoácidos, liberados de la estructura nativa de las proteínas, caracterizados por generar un efecto biológico medible a nivel fisiológico, que pueden impactar benéficamente a la salud. Los péptidos resultantes pueden presentar características estructurales químicas similares a las de los péptidos endógenos que actúan en el organismo

como hormonas, neurotransmisores o reguladores (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2017).

La diversidad de los microorganismos presentes en los gránulos de kéfir demanda que una gran cantidad y variabilidad de nutrimentos estén disponibles en el medio de cultivo empleado. Aunque el uso de lactosa en la leche ha quedado dilucidado, el de las proteínas es necesario esclarecerlo, aún cuando se habla de auxotrofia para varios de los aminoácidos en las bacterias ácido lácticas (BAL), estas poseen un sistema proteolítico complejo, logrando hidrolizar las proteínas lácteas y liberar péptidos, lo que aumenta la existencia de péptidos con actividad biológica, esto abre la posibilidad a mecanismos de señalización y regulación como lo es el quorum sensing (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2017). De acuerdo con un estudio realizado por Dallas *et al.* (2016) los gránulos de kéfir son capaces de generar una digestión sustancial de las proteínas de la leche, demostrado a través de un análisis espectrofotométrico de masas que hay liberación de 609 fragmentos de proteínas y alteración en la abundancia de más de 1500 péptidos.

El kéfir contiene 25 péptidos identificados en la literatura con actividad biológica, incluidos aquellos con funciones antihipertensivas, antimicrobianas, inmunomoduladores, opioides y antioxidantes (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2017). Algunos ejemplos de péptidos bioactivos derivados de proteínas de suero de leche: albutensina que inhibe a la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y estimula la contracción del íleon y la soroforina con actividad opioide, ambas derivadas de la albúmina sérica. La α -lactoforina, que proviene de la α -lactoalbúmina, inhibe la ECA. Los péptidos β -lactoforina y β -lactotensina, derivados de la β -lactoglobulina, inhiben y estimulan la contracción del íleon respectivamente. La lactoferricina y otros estrechamente relacionados, derivados de la digestión peptídica de la lactoferrina, poseen actividad antimicrobiana/antiviral, inmunomoduladora y antioxidante (Londero, 2012).

El consumo de este producto fermentado ha sido relacionado con una variedad de beneficios a la salud, no solo ligado a la microbiota, también a la presencia de algunos productos metabólicos como ácidos orgánicos (Prado *et al.*, 2015). La actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas radica en la generación de metabolitos que establecen factores tales como aumento de la acidez del medio, biogeneración rápida de ácidos orgánicos, bacteriocinas, péptidos antimicrobianos, peróxido de hidrógeno, kefirano, etanol y diacetilo, además de bajo potencial redox y disminución del contenido de nutrientes en el medio (Rodríguez-Figueroa, 2017), es decir, generan competencia por nutrimentos. Estas características del kéfir, aunadas a las propiedades pre y probiótica, lo sitúan de manera destacada como alimento funcional (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2017).

Por lo tanto, dentro del consorcio de kéfir, se maximiza la posibilidad de encontrar BAL que pudieran presentar actividad antimicrobiana; la cepa *Lactobacillus paracasei* spp. *tolerans* fue identificada como productora de la bacteriocina F1. Esta mostró amplio rango de bioactividad antimicrobiana (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2017) contra bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus thuringiensis*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Shigella dysenteriae*) y hongos (*Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizopus nigricans* y *Penicillium glaucum*) (Rodríguez-Figueroa, 2017), *L. plantarum* CIDCA 83114 es capaz de antagonizar el efecto biológico de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) *in vitro*, asimismo, se ha descrito su efecto protector sobre la invasión de *Shigella flexneri* a células epiteliales. Por su parte, cepas de *L. kefir* pueden inhibir la adhesión y la invasión de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium a células Caco-2/TC-7 (Ferrari *et al.*, 2020).

En humanos, también se ha observado un papel benéfico del kéfir en el tratamiento de la diabetes mellitus, como se comenta en un trabajo con 60 pacientes diabéticos, de 35 a 65 años en donde, los pacientes suplementados con kéfir presentaron valores más bajos de glucosa en ayunas y de hemoglobina glicosilada que los que recibieron la otra bebida fermentada (Peluzio *et al.*, 2021).

En América Latina algunos estudios han señalado la mejora de parámetros relacionados con la obesidad tras el consumo de esta bebida fermentada en modelos animales (Peluzio *et al.*, 2021). Tras la suplementación con kéfir en estos modelos animales, se redujeron los triglicéridos plasmáticos, los lípidos hepáticos, resistencia a la insulina, la glucosa en ayunas entre otros compuestos relacionados con el síndrome metabólico (Rosa *et al.*, 2016). Lo que indica su potencial para controlar la obesidad con una función metabólica mejorada. También se ha observado una mejor calidad de vida para las personas con intolerancia a la lactosa y osteoporosis (Peluzio *et al.*, 2021).

3.5 Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram-positivos, no esporulados, inmóviles, anaerobios, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Ramírez *et al.*, 2011). Además, son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a pH tan alto como 9.6 y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no resistirían las condiciones generadas por los ácidos orgánicos (Ramírez *et al.*, 2011). Para su multiplicación requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento, por lo que medios complejos son necesarios para su proliferación siendo algunos de ellos la leche, masas de cereales, los vegetales y la carne (Ramírez *et al.*, 2011).

La clasificación de las BAL en géneros diferentes se basa en principio en la morfología, modo de fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas) el crecimiento a diferentes temperaturas, habilidades para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina (Ramírez *et al.*, 2011).

Las especies de las BAL se encuentran en dos phylum distintos, a saber, Firmicutes y Actinobacteria.

Dentro del phylum Firmicutes, las BAL pertenecen al orden de los Lactobacillales e incluían, entre otros, los siguientes géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Streptococcus*, que son todos organismos con bajo contenido de GC (guanina-citosina) (31-49%) (Rosetti, 2016).

El género *Lactobacillus* ha sido reclasificado recientemente por científicos en 25 géneros. Los nuevos géneros son *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y los 23 nuevos géneros incluyen: *Amylolactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* y *Secundilactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

3.5.1 *Lactobacillus*.

Los lactobacilos son bacterias Gram-positivas, no son esporulados, sacarolíticos obligados, su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por concentraciones de oxígeno reducidas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-40°C. Son acidúricos, creciendo óptimamente en un pH comprendido entre 5.5-6.2. Requieren medios nutricionales complejos, por ello el medio de cultivo más empleado es el medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) que contiene magnesio, manganeso, acetato y polisorbato 80 (Tween 80) facilitan su crecimiento, para mayor selectividad se le adiciona ácido acético. Tienden a hacer cadenas.

Algunos ejemplos de las bacterias más representativas de este género son; *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* Shirota, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. plantarum* y *L. reuteri* (Collado, 2004).

3.5.2 Streptococcus.

Son microorganismos esféricos u ovoides de 0.7-0.9 micrómetros de diámetro, distribuidas en o parejas formando cadenas. Son anaerobios facultativos, quimioorganótrofos con metabolismo fermentativo, catalasa negativos y homofermentativos. No crece a pH superior de 9.6, ni en leche que posea un 0.1% de azul de metileno. La temperatura mínima de crecimiento es de 19-21°C. El principal microorganismo perteneciente a este género es *Streptococcus thermophilus*, con temperatura óptima de crecimiento de 42- 45°C (Collado, 2004).

3.5.3 Metabolismo de bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas se dividen en dos grupos de acuerdo a los productos del metabolismo de la glucosa. Aquellos que producen ácido láctico como producto único o mayoritario de la fermentación de la glucosa se conocen como homofermentativos. Los microorganismos homofermentativos son capaces de extraer alrededor de dos veces más energía de la glucosa, que los heterofermentativos. Todas las bacterias del género *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* son homofermentativas, incluyendo algunos lactobacilos.

Aquellas bacterias que producen la misma cantidad molar de lactato, dióxido de carbono y etanol a partir de hexosas, son denominadas heterofermentativas, a las cuales pertenecen los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, y algunos lactobacilos. Los heterofermentativos tienen un papel más importante en la producción de componentes de sabor y aroma, como el acetaldehído y diacetilo (Jay *et al.*, 2005).

Las diferencias de producto final entre los homos y heterofermentadores cuando metabolizan glucosa son el resultado de diferencias genéticas y fisiológicas básicas. Las BAL homofermentativas poseen las enzimas aldolasas y hexosa isomerasa pero carecen de fosfoetolasa. Estas usan la vía Embden Meyerhof-Parnas (EMP) produciendo dos lactatos por molécula de glucosa. Los heterofermentativos, por

otro lado, poseen fosfoctolasa pero no aldolasa y hexosa isomerasa, y en lugar de la vía EMP para la degradación de glucosa, estos organismos usan la vía hexosa monofosfato o pentosa (Jay *et al.*, 2005).

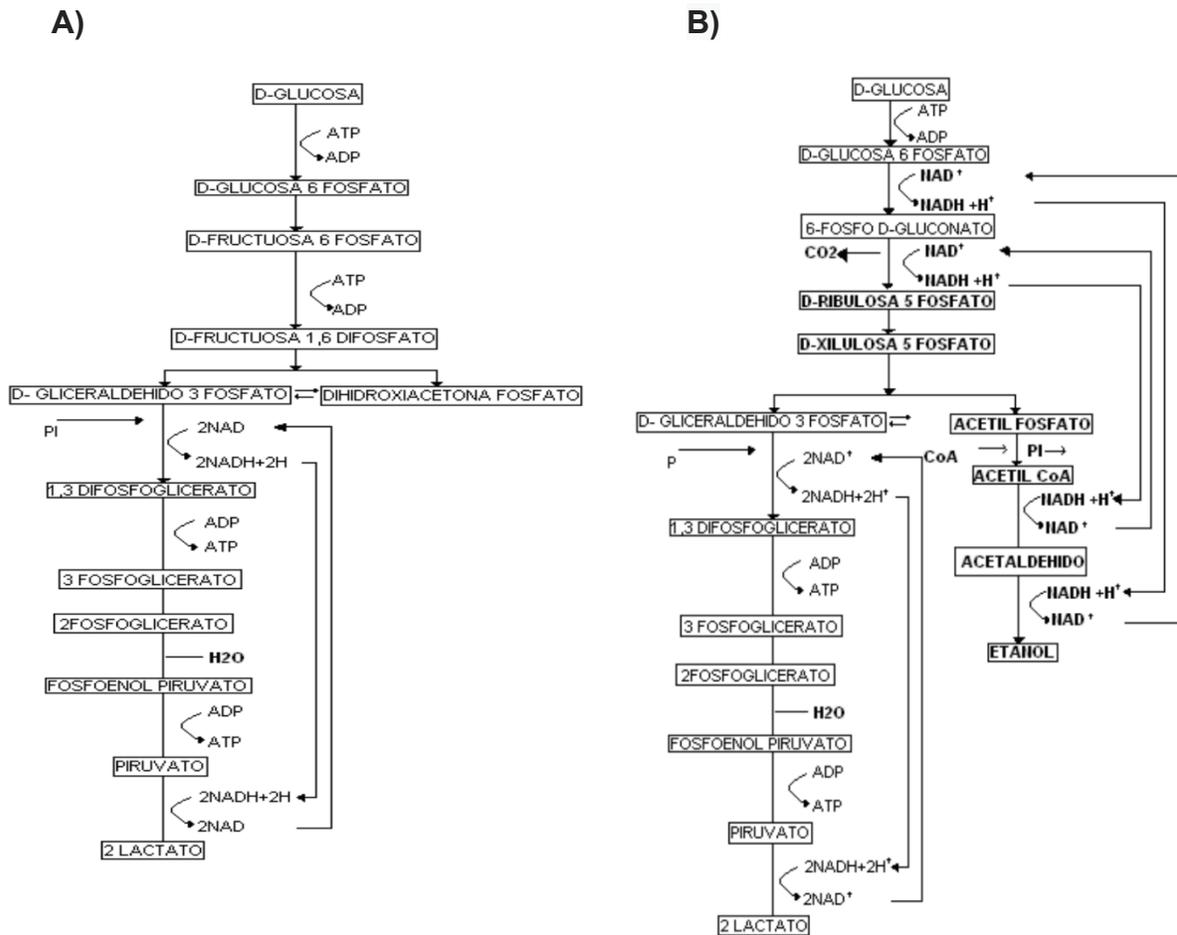


Figura 1. Ruta metabólica de bacterias ácido lácticas.

A) Homofermentativas. B) Heterofermentativas. (Parra, 2010).

3.5.4 Métodos de identificación de BAL.

El estudio de la microbiota ha presentado varios retos en el pasado: no todos los microorganismos son fáciles de cultivar. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas debido al uso de métodos moleculares que no requieren el cultivo de

microorganismos y al uso de herramientas usadas en estudios filogenéticos para identificarlos.

Asumiendo que los cambios se producen al azar y que aumentan con el tiempo de manera lineal, las diferencias en la secuencia de los monómeros (nucleótidos o aminoácidos) que integran macromoléculas homólogas, presentes en dos formas de vida, reflejan la distancia evolutiva existente entre ellas, por ello se ha venido utilizando durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación (Rodicio *et al.*, 2004).

Se utilizan entonces ciertas macromoléculas que funcionan como cronómetros evolutivos (indicadores de cambios evolutivos). Se puede medir la distancia evolutiva entre dos organismos por diferencias en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de macromoléculas homólogas aisladas de ellos.

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Esto se debe a que estas moléculas son funcionalmente constantes, se encuentran distribuidas universalmente y sus secuencias son moderadamente conservadas en la mayoría de los organismos (Díaz *et al.*, 2003). Es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos (nt), codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), su amplificación origina amplicones de 1,500 pb, aproximadamente (Rodicio *et al.*, 2004).

La secuenciación de las regiones variables del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN identifica el parecido filogenético de las bacterias y las arqueas, y permite clasificarlas sin el uso de cultivos. La identificación de una bacteria a nivel de especie no requiere necesariamente la secuenciación completa del ARNr 16S completo debido a que la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases correspondientes al extremo 5' (Rodicio *et al.*, 2004). La información genética

obtenida del microbioma por medio del ARNr 16S se agrupa en las llamadas unidades taxonómicas operacionales, de acuerdo con el porcentaje de semejanza de sus ARNr 16S. Cuando hay una semejanza en el ARNr 16S del 95% se habla de género, y cuando la semejanza es del 97%, se habla de especie (Icaza- Chávez, 2013).

Para realizar el estudio de la microbiota presente en una matriz compleja a partir del ARNr 16S, se parte de extraer y purificar el ADN de los microorganismos aislados, amplificar por PCR ciertas regiones del gen ribosomal 16S mediante el uso de primers, secuenciar estas zonas y comparar con secuencias identificadas anteriormente contenidas en bancos de datos. Esta técnica ha sido utilizada como se menciona en Díaz *et al.*, (2013) para identificar los microorganismos presentes en el pozol.

Además de la técnica antes mencionada, es posible tipificar microorganismos a nivel de especie y cepa a través a distintas técnicas dependientes de cultivo (Díaz *et al.*, 2003):

- Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) consiste en extraer el DNA (genoma completo) de cada cepa, se digiere con enzimas de restricción, los fragmentos obtenidos se transfieren a una membrana, se hibridan con una sonda de ARNr marcada y se visualizan los fragmentos hibridados con sondas de referencia.
- Análisis de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) consiste en amplificar al azar regiones del DNA extraído de los microorganismos. Los cebadores se escogen al azar, se utilizan temperaturas de alineamiento bajas, de manera que se obtengan productos de PCR que permitan el alineamiento de los cebadores a pesar de que existan una o dos bases que no coincidan. Después de su separación mediante electroforesis en geles de agarosa se obtienen patrones simples de fragmentos de DNA de diferentes tamaños.

- El polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) es una combinación de PCR y el uso de enzimas de restricción. Se basa en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción de DNA genómico. La separación de genes se realiza en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, obteniendo patrones de 50 a 100 fragmentos.
- Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) basado en la obtención de ADNr mediante amplificación por PCR usando cebadores universales, el producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa. Se obtienen patrones de bandas de cada microorganismo que se analizan con un software que determina sus diferencias y se construyen dendrogramas en donde se incluyen cepas de referencia.

En cuanto al análisis de comunidades complejas en el que no se emplea cultivo, se parte de la extracción y purificación del ADN de las muestras de manera total o extrayendo los microorganismos de la muestra seguida de la extracción del ADN. Posteriormente se amplifican mediante PCR, ciertas regiones del gen ribosomal 16s utilizando cebadores generales y específicos. Se realiza la secuenciación y análisis de los productos obtenidos y se determina la diversidad microbiana (Beldarraín *et al.*, 2017).

4. Justificación.

Existen diversos estudios de la evaluación del kéfir proveniente de distintas partes del mundo por ser un consorcio microbiano de gran diversidad en el cual se ha encontrado la presencia de microorganismos con alto potencial probiótico.

Se reporta que la composición de este varía de una región a otra, por lo que la caracterización de la microbiota presente en él aún es de interés por la gran posibilidad que representa para obtener microorganismos probióticos, principalmente BAL que puedan ser distintos a los ya evaluados.

El interés en este tipo de microorganismos son los beneficios que aporta al consumidor debido a que cada vez se reporta mayor influencia de la microbiota presente en el intestino humano y la salud de este último.

En este caso el aislamiento y evaluación de bacterias provenientes de este consorcio tiene el objetivo de encontrar cepas con potencial probiótico para seleccionar aquellas con mejores características y que posteriormente sea posible su uso sin estar sujeto al consumo del kéfir que si bien es un alimento que se consume en la CD.MX., su uso, beneficios y estudio aún no es tan difundido, por ello se seleccionaron gránulos de kéfir desarrollados de manera casera y comercializados en una de sus alcaldías, Xochimilco.

En el presente trabajo se utilizó la técnica de aislamiento y tipificación de los microorganismos presentes en los gránulos de kéfir debido a que se pretende evaluar el potencial probiótico de cada microorganismo aislado y no sólo identificarlos como parte del consorcio.

5. Objetivos.

5.1 Objetivo general.

-Caracterizar el potencial probiótico de bacterias ácido-lácticas aisladas de una muestra proveniente del kéfir de la región del centro de Xochimilco, Ciudad de México.

5.2 Objetivos particulares.

-Aislar consorcios microbianos presentes en los gránulos de kéfir para el estudio de las bacterias ácido lácticas.

-Purificar bacterias ácido lácticas presentes en los consorcios microbianos obtenidos.

-Evaluar el potencial probiótico *in vitro* de consorcios y las bacterias ácido-lácticas aisladas mediante su exposición a pH ácido, sales biliares, lisozima y efecto antimicrobiano contra patógenos.

-Identificar las bacterias aisladas de los gránulos de kéfir mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S.

6. Hipótesis.

Es posible determinar el potencial probiótico de los consorcios microbianos y/o de las bacterias ácido lácticas aisladas a partir de gránulos de kéfir provenientes de la región del centro de Xochimilco.

7. Metodología y materiales

A continuación, se presenta el esquema general de trabajo del proyecto dividido en cuatro secciones: cuantificación de microorganismos en gránulos, obtención de consorcio microbiano a partir de los gránulos de kéfir, su evaluación y separación.

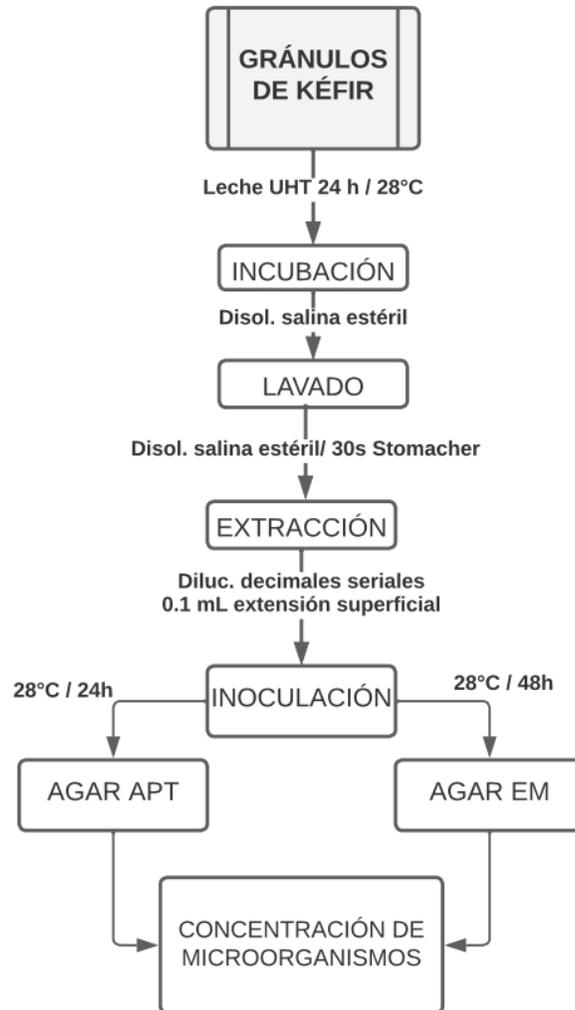


Figura 2. Esquema general de trabajo: cuantificación de microorganismos en gránulos de kéfir.

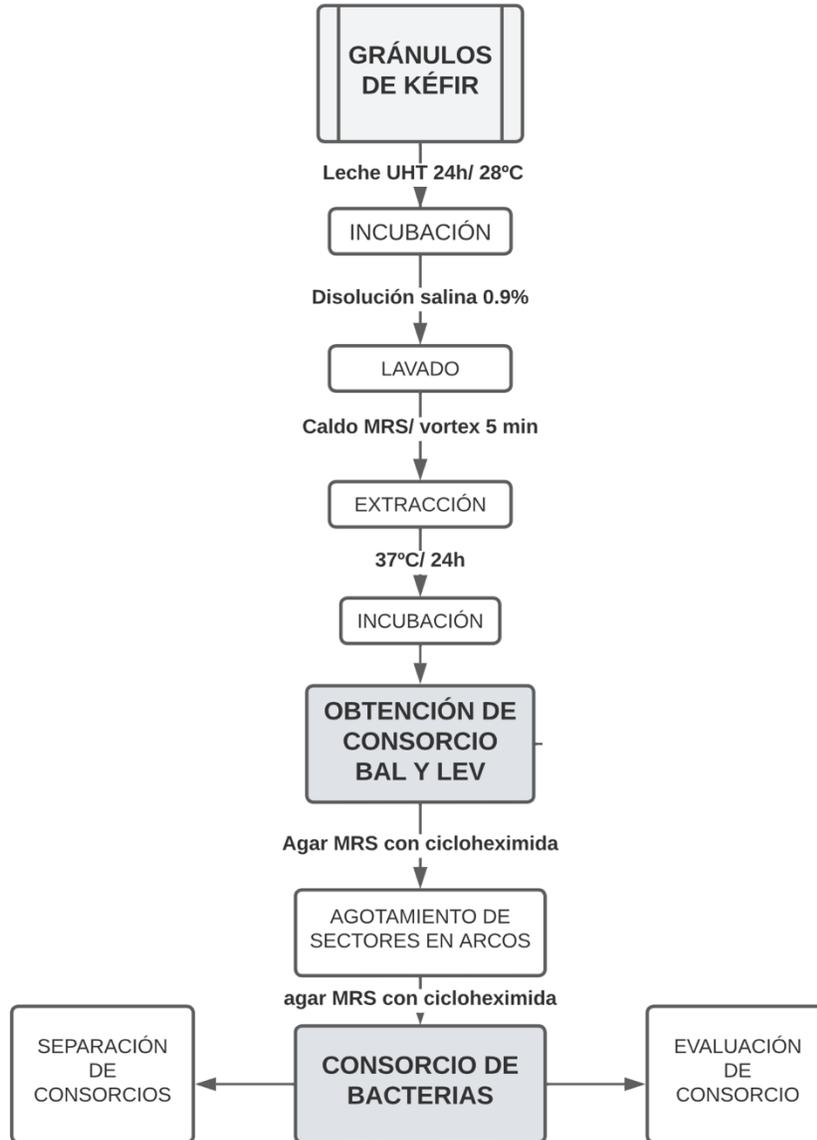


Figura 3. Esquema general de trabajo: Obtención de consorcios microbianos aisladas a partir de gránulos de kéfir.

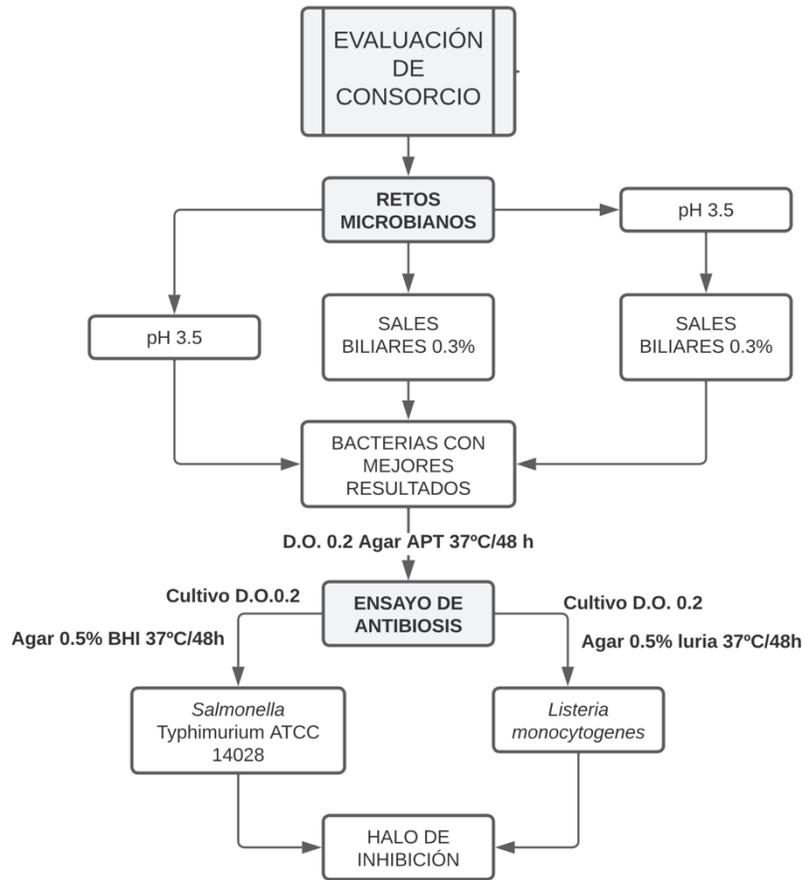


Figura 4. Esquema general de trabajo: evaluación de consorcio bacteriano.

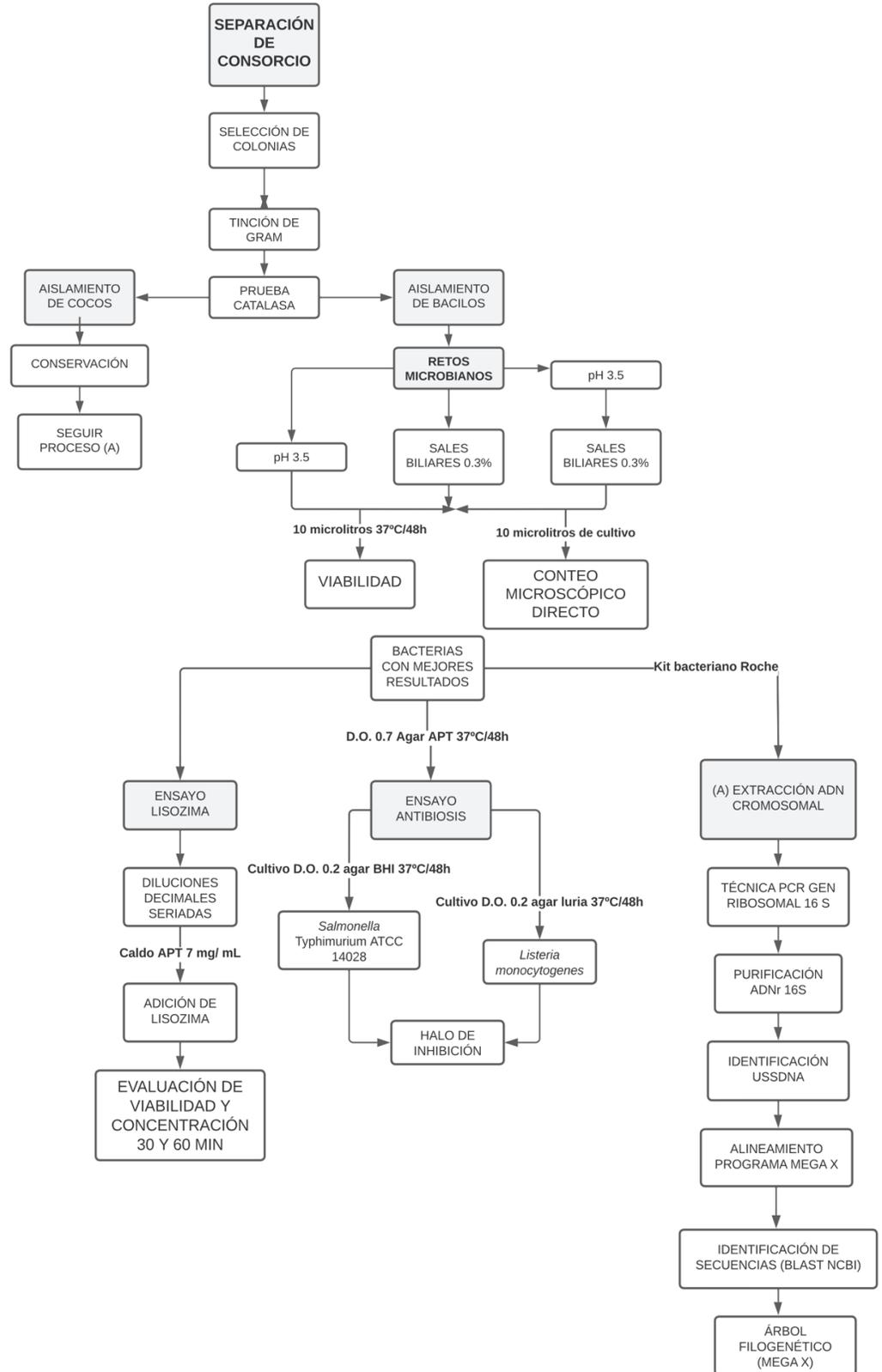


Figura 5. Esquema general de trabajo: separación de consorcio microbiano.

7.1 Preparación inicial de gránulos de kéfir.

A partir de los gránulos de kéfir provenientes del centro de Xochimilco y cultivados de manera casera, se realizó la obtención de los microorganismos presentes en esta matriz, para ello se colocaron aproximadamente 40 g de gránulos en una probeta estéril, se adicionaron 50 ml de leche UHT (Santa Clara^{MR}), e incubó a 28°C/24h. De este tratamiento se tomaron 10 g de gránulos y se realizaron lavados disolución salina al 0.9% estéril, con el fin de eliminar los restos de leche y medio que estos pudieran contener (Simova *et al.*, 2002).

7.2. Concentración de bacterias lácticas y levaduras presentes en el Kéfir.

Se obtuvo la dilución primaria pesando 10 g de gránulos y diluyendo con NaCl 0.9% (P/V), en una relación 1:10 y se homogeneizó en Stomacher^{MR} /30 s por duplicado (2 lotes). De cada lote se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de la dilución primaria ya mencionada. Se alicuotó 1 mL de la muestra en 9 mL de disolución salina isotónica estéril por duplicado desde la dilución 10^{-1} a 10^{-8} y se plaquearon 0.1 mL por extensión superficial en agar APT e incubaron a 28°C/24h para cuantificar las bacterias ácido lácticas (BAL), y en extracto de malta (EM) incubando a 28°C/48h para cuantificar levaduras (LEV) presentes en el consorcio. Después de la incubación en las placas de agar se cuantificaron las UFC considerando las placas que tuvieran el rango estadísticamente confiable (25 a 250 UFC para el caso de bacterias desarrolladas en el agar APT y 10 a 150 para el caso de colonias levaduriformes desarrolladas en el agar EM).

7.3. Separación de grupos microbianos presentes en el Kéfir.

7.3.1 Tratamiento general de extracción.

Se colocaron 10 g de búlgaros con caldo MRS (Difco) en un tubo de centrifuga estéril con perlas de vidrio empleando el equipo Vortex (Thermolyne) por 5 minutos, seguido de su incubación a 37°C/24h.

7.3.2 Obtención de consorcios microbianos.

A partir de esta extracción (inciso 7.3.1.), se prosiguió con diluciones decimales seriadas y plaqueó 0.1 mL de las diluciones por extensión en superficie en agar MRS (Difco) con 1.4% de cicloheximida para el aislamiento de las colonias de consorcios y se incubaron 37°C/24h en jarra de anaerobiosis con bicarbonato sódico y ácido cítrico (aproximadamente 1 g de cada uno), para la producción de CO_2 generando así las condiciones de microaerofilia. Las colonias obtenidas se conservaron en ultracongelación a -70 °C como se describe en el inciso 7.6.

7.4. Aislamiento y purificación de bacterias con morfología bacilar a partir de los consorcios.

A partir de las colonias mantenidas en ultracongelación (inciso 7.6.), se reactivaron los consorcios microbianos con la metodología descrita en el inciso 7.7. Las colonias reactivadas fueron inoculadas en agar MRS por agotamiento de sectores en arcos, y se incubaron a 37°C/48h en microaerofilia en jarra de anaerobiosis. A cada colonia con características morfológicas diferentes entre sí, se le realizó una tinción de Gram para seleccionar aquellas únicamente como bacilos Gram-positivos y catalasa negativas (inciso 7.8). Una vez aislados los bacilos se prosiguió a su separación por tamaño utilizando las condiciones descritas anteriormente. Cada colonia seleccionada se conservó bajo las mismas condiciones descritas en el inciso 7.6.

7.5. Aislamiento y purificación de bacterias con morfología de cocos a partir de los consorcios.

Partiendo de las colonias obtenidas según lo descrito en el numeral 7.3.2 y mantenidas en ultracongelación (inciso 7.6) estas se reactivaron y se prosiguió a inocularlas en agar MRS por agotamiento de sectores en arcos, incubándose en microaerofilia en jarra de anaerobiosis. A cada colonia que se seleccionó se le realizó una tinción de Gram eligiendo sólo aquellas con cocos Gram-positivos y una

prueba de catalasa (inciso 7.8) eligiendo las catalasa negativas. Cada colonia seleccionada se conservó bajo las mismas condiciones descritas en el punto 7.6.

7.6. Conservación en ultracongelación a -70 °C.

Cada colonia seleccionada o purificada se colocó en caldo APT e incubó 37°C/48h para su crecimiento y posteriormente se conservó en ultracongelador a -70°C en caldo APT (Difco) empleando como crioprotector 50% glicerol (V/V), para su utilización y análisis durante el proyecto.

7.7. Reactivación y verificación de pureza.

Las colonias conservadas en ultracongelación fueron reactivadas tomando una asada del cultivo y colocándolo en caldo MRS (Difco) a 37°C/48h en jarra de anaerobiosis bajo las condiciones de microaerofilia generadas de la manera anteriormente descrita. Una vez reactivadas para verificar la pureza de los cultivos puros de bacterias (incisos 7.4 y 7.5), se realizó un frotis fijo y tinción de Gram.

7.8. Prueba de catalasa.

Para la prueba de catalasa se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos y se disolvió con ayuda de un asa, cultivo proveniente de la colonia seleccionada, adicionando una gota de agua oxigenada (H_2O_2).

7.9. Evaluación de potencial probiótico.

A partir de la reactivación en caldo APT de cada colonia (consorcios bacterianos y/o cultivos puros), se tomó una asada a partir de los microtubos que se conservaron de acuerdo con el inciso 7.6. en ultracongelación y estos fueron incubados a 37 °C por 48 h y se les realizó el ensayo de tolerancia a condiciones gastrointestinales como se describe a continuación.

Los medios empleados fueron caldo APT ajustado a pH 3.5 con ácido clorhídrico 1N con potenciómetro Ion 510 (OAKTON), así como caldo APT con 0.3% de sales biliares de buey (OXOID).

Para cada ensayo se tomaron 100 μ L de cada consorcio o cultivo bacteriano purificado para inocular los respectivos medios; 4.5 mL de caldo APT ajustado a pH 3.5 y 4.5 mL de caldo APT con sales biliares al 0.3% incubados bajo las mismas condiciones (Gutiérrez, 2015; Arenas, 2015; Morales, 2019).

Adicionalmente, para cada consorcio o aislado desarrollado a pH 3.5 fueron tomados a las 3 horas de incubados 100 μ L y se colocaron en 4.5 mL de medio con sales biliares 0.3% por 24 horas.

7.10. Determinación de la concentración aproximada de UFC para consorcios microbianos.

Se seleccionó el consorcio de la colonia 22 como estándar para determinar la concentración aproximada de los consorcios evaluados.

A partir del cultivo de este consorcio reactivado en caldo APT (inciso 7.7.), se realizaron diluciones decimales seriadas y plaquéó 0.1 mL de cada dilución en agar APT por extensión en superficie, y se incubaron 37°C/48h. Al mismo tiempo, a 1 mL de este cultivo reactivado se le determinó la $D. O.600 nm$ (espectrofotómetro Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech). Después de la incubación en las placas de agar se cuantificaron las UFC considerando las placas que tuvieran el rango estadísticamente confiable.

En cuanto al resto de las colonias conformadas por el consorcio de bacilos y cocos una vez reactivadas (inciso 7.7), se determinó la $D. O.600 nm$, y se realizó una extrapolación considerando la $D. O.600 nm$ y UFC/mL determinados para el consorcio de la colonia ya descrita. Estos datos se emplearon como control para determinar el porcentaje de sobrevivencia (S%) a cada factor (pH 3.5 y sales biliares 0.3%).

7.11. Determinación de la concentración aproximada de células para bacterias puras.

La concentración aproximada celular de cada cultivo de bacteria purificada se determinó a partir del cultivo reactivado (incisos 7.4 y 7.5), así como después de haber sido sometidas a pH 3.5, sales biliares 0.3% o bien ambos factores (inciso 7.9). Se determinó la concentración aproximada de células por conteo microscópico a partir de 10 microlitros de cultivo en un área de 1 cm², utilizando un portaobjetos micrométrico (calibración 1 mm de longitud total subdividido en 0.01mm) para el cálculo del %S.

Al mismo tiempo, se inoculó en agar APT colocando 3 µL del cultivo en una caja dividida en 3 cuadrantes para verificar el crecimiento colonial y su viabilidad antes y después de las condiciones a las que fueron sometidas, incubando 37°C/ 48h.

7.12. Ensayo cualitativo de antibiosis.

De acuerdo con los resultados obtenidos con las condiciones de pH y sales biliares, se seleccionaron los cultivos que presentaron mejor crecimiento después de exponerse a ambos tratamientos de manera consecutiva.

Los cultivos mixtos conformados por bacterias lácticas (consorcios), fueron ajustados mediante el uso de un espectrofotómetro a una $D.O_{.600\text{ nm}}$ aproximada de 0.2 y los puros fueron ajustados a una $D.O_{.600\text{ nm}}$ de 0.2 y 0.7 y se colocaron 3 µL en agar APT e incubaron a 37°C/ 48h.

Los patógenos empleados para el ensayo fueron *Listeria monocytogenes* CFQ-B-1 03 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 ambas provenientes de la colección del Cepario de la Facultad de química. Estas fueron reactivadas tomando una asada del cultivo contenido en microtubos y se colocaron en 4.5 mL de caldo BHI (Dibico) para *L. monocytogenes* y 4.5 mL de caldo Luria (Dibico) para *Salmonella* Typhimurium, incubando por 24h/37°C. Posteriormente se realizó una tinción de Gram para comprobar su pureza.

Para continuar con la prueba se elaboró agar suave con 0.5% de agar a partir de caldo BHI (Dibico) y caldo Luria (Dibico) respectivamente, se inoculó con las cepas patógenas de prueba ajustadas aproximadamente una $D.O_{600\text{ nm}}$ de 0.2 y se adicionaron a la caja del cultivo de bacilos en forma de sobrecapa, incubando por 24h/37°C. Se interpretó como un resultado positivo aquellas pruebas que desarrollaron un halo de inhibición alrededor de la colonia evaluada y se realizó la medición del halo. Tanto en la prueba de colonias mixtas como en las puras se siguió la misma metodología.

7.13. Ensayo de resistencia a lisozima.

Aquellos bacilos que fueron antagónicos al crecimiento de los microorganismos patógenos mencionados en el inciso 7.12, se sometieron al ensayo de lisozima, para ello se reactivaron los bacilos identificados con los códigos 8 y 26.1 a 37 °C por 48 h en 4.5 mL de caldo APT, a este cultivo se le adicionó lisozima [7 mg/ml] y se incubó por 30 y 60 min a 37 °C. Se realizaron diluciones decimales seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} en disolución salina inmediatamente después de agregar lisozima (tiempo 0 min) y con 30 min de exposición tomando 100 µL de cada una para efectuar un conteo en placa por extensión superficial en agar APT con perlas de vidrio. En el caso de los 60 min de exposición únicamente se plaqueo los 100 µL del cultivo directo para verificar viabilidad. En todos los casos se incubó a 37°C/48h.

7.14. Extracción de DNA cromosomal.

A partir de un cultivo puro saturado en caldo APT incubado 24h/37°C de las cepas seleccionadas con mejor potencial probiótico fue realizada la extracción del DNA cromosomal empleando el sistema comercial para extracción de DNA de Roche (anexo 1).

Como parte de la confirmación de la extracción del DNA, fue realizada una electroforesis en gel de agarosa al 1% P/V con 4 µL de bromuro de etidio al 0.04% utilizando como buffer una disolución de Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, pH 8. Y como marcador de peso molecular O'GenerRuler 1kb DNA ladder™ (Thermo Scientific)

con colorante de carga (figura 11). La corriente empleada fue de 100V y 80 A por aproximadamente 30 minutos. El gel fue observado con luz UV en el transiluminador 2000 de BioRad.

7.15. Amplificación del gen ribosomal 16S por PCR.

Partiendo del DNA cromosomal extraído, se realizó la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S por PCR, empleando los primers universales Fd1 y Rd1 descritos por Weisburg *et al.* (1991), cuyas características se encuentran en el anexo 2 del presente documento. Las características de los reactivos empleados en esta técnica se encuentran descritas a continuación en la tabla 2. El termociclador empleado fue Perkin-Elmer, las condiciones empleadas para la reacción se encuentran descritas en la tabla 3. Para la verificación de la obtención de la amplificación del gen esperado se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las mismas características y condiciones que lo descrito en la extracción del ADN cromosomal (inciso 7.14).

7.16. Purificación del gen ribosomal 16S.

Los productos obtenidos a partir de la reacción PCR fue purificada con el kit GeneJet PCR purification kit de la marca *Thermo ScientificTM* en el cual se emplea una membrana a base de sílice en una columna de centrifugación. Como paso 1 se adiciona el buffer de unión que contiene colorante para el monitoreo del paso por la columna y sales caotrópicas para unir el ADN con la columna. El ADN es eluido con un buffer de elución. La pureza y concentración del ADN obtenido fue corroborada mediante la relación de absorbancia a 260nm/280nm y 260nm/230nm para cada secuencia utilizando el equipo Nanodrop (*Thermo ScientificTM*) que refiere la pureza con respecto a la proteína o compuestos solubles en fenol, respectivamente.

7.17. Secuenciación del gen que codifica para la región ARNr 16S e identificación microbiana.

Para realizar la identificación de los bacilos a nivel de género y especie, las secuencias fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas fueron identificadas en la plataforma Genbank NCBI con el uso de la aplicación Blastn. Con el programa MEGA X se analizaron las secuencias mediante un alineamiento de bases y la generación de una matriz de distancia por pares con el método maximum composite likelihood. Para la elaboración del árbol filogenético con el programa MEGA X se usaron como grupos externos *Zymomonas mobilis* (AY35073) y *Sulfolobus acidocaldarius* (D14053), con el método Neighbor-Joining Tree con un Bootstrap de 1000 réplicas.

Tabla 2. Reactivos empleados en la amplificación del gen ribosomal 16S del kit *Thermo Scientific™*

Reactivo	Volumen (µL)
10X Taq Buffer con KCl	5
<i>MgCl₂</i> 25 mM	3
dNTP's (dATP. dTTP. dGTP 10 mM)	1
Primer forward fD1 (1.0 µM)	0.17
Primer reverse rD1 (1.0 µM)	0.15
Agua mili Q	36.68
Taq DNA Polimerasa, 5 U/µL	0.25
Templado	1

Tabla 3. Condiciones del programa empleado en el termociclador Perkin-Elmer para la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S de acuerdo con Weisburg *et al.*, 1991.

Etapa	Número de ciclos		Condiciones
Desnaturalización inicial	1		95°C/ 3 min
Amplificación	30	Desnaturalización	95°C/ 30s
		Alineamiento	42°C/ 30s
		Amplificación	72°C / 1.5 min
Extensión final	1		72°C/ 5 min

8. Resultados y Discusión.

La concentración aproximada de BAL y LEV presentes en los gránulos de kéfir empleados en este proyecto provenientes del centro de Xochimilco desarrollados de forma casera en la Ciudad de México en agar APT y EM se muestran en la tabla 4. La microbiota endógena de los gránulos de kéfir y la relación entre los grupos microbianos mencionados anteriormente depende en gran medida del origen del grano, la cultura local y los procesos de almacenamiento y manipulación (Kesenkas *et al.*, 2017), por lo que el resultado de concentración de microorganismos en los gránulos reportados será variable y dependerá en gran medida de la técnica y medios que se utilicen para la extracción de los microorganismos a partir de la matriz de kéfir y para su desarrollo.

Simova *et al.*, (2002), menciona que las bacterias lácticas representan 83-90% de la cuenta microbiana de los granos de kéfir, mientras que las levaduras representan del 10-17% del total de la microbiota. A pesar de que se emplearon medios selectivos para determinar la concentración de BAL y levaduras, no fue posible la separación de estos grupos en el consorcio. En la muestra analizada la concentración de microorganismo en agar APT tuvo una diferencia de un orden de magnitud (10^6 UFC/g) en comparación con la concentración en agar EM (10^5 UFC/g).

Tabla 4. Cuantificación de bacterias ácido-lácticas y levaduras en gránulos de kéfir

	Agar APT	Agar EM
Concentración (UFC/g)	$27 \times 10^6 \pm 25 \times 10^5$	$22 \times 10^5 \pm 97 \times 10^4$

8.1 Aislamiento de bacterias ácido-lácticas.

8.1.1 Separación de consorcio bacterias-levaduras.

La separación de levaduras y bacterias lácticas presentó dificultades debido a que los gránulos de kéfir consisten en un consorcio estable entre estos microorganismos. Por este motivo se pusieron en práctica diversas metodologías para lograr el aislamiento de las BAL presentes, de las cuales se rescató, como mencionó Assumpcaot (2017), que la microbiota del kéfir al estar envuelta en una matriz de polisacárido presenta alta resistencia al estrés físico y químico, permitiendo el uso de vortex, perlas de vidrio y stomacher para la disgregación de los gránulos y con ello favorecer la separación del consorcio.

Otro de los puntos es que las levaduras presentes en el consorcio fueron capaces de crecer en caldo/agar APT suplementado con cicloheximida al 1.4% v/v, (para favorecer la inhibición de levaduras) en donde a pesar del descenso de pH en el medio por acción de las BAL, no se vió afectado su crecimiento debido a que están adaptadas a pH ácido ya que en la fermentación realizada en el kéfir esta es una de las características, debido a lo antes mencionado para su separación se cambió a un medio más selectivo como el agar MRS que al suplementarse con cicloheximida (1.4% v/v), incubar a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias mesofílica (37°C) como se mencionó en la metodología fue posible suprimir el crecimiento de la micobiota. En cuanto al uso de cicloheximida, Leite *et al.*, (2015), reportó la adición de esta en una concentración de 200 µg/mL al medio MRS a 30°C, siendo esta suficiente para suprimir el crecimiento de levaduras, sin embargo, en este caso fue necesaria duplicar la concentración sugerida por el proveedor del 0.7% al 1.4% v/v debido a la alta concentración de levaduras. Aunque este antibiótico está descrito para inhibición de hongos, se ha reportado resistencia de ciertas especies de levaduras patógenas como algunas especies de *Candida* mientras que *C. neoformans*, *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *G. candidum*, son sensibles. Otras especies de *Candida* y *Rhodotorula* pueden ser

variables en su sensibilidad (Mendoza, 2005), esta característica puede estar presente en las levaduras de los gránulos de kéfir, por ello su crecimiento en estos medios, ya que como se menciona en Ferrari (2020), en la literatura, más de 23 especies de levaduras han sido identificadas formando parte de la microbiota del gránulo o leche fermentada; siendo *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefir* y *Kluyveromyces marxianus* las especies predominantes.

8.1.2 Características macroscópicas y microscópicas de los consorcios (bacterias- levaduras) obtenidos.

Durante el estudio de los consorcios fue posible observar su desarrollo morfológico, es importante destacar que fue modificándose conforme la concentración de microorganismos cambió de acuerdo con la etapa del proyecto como se describe más adelante.

El desarrollo de los consorcios en el medio APT (figura 6) presentó 3 tipos de crecimiento (descritos en la tabla 5): el tipo 1 (figura 6.a.) en donde el consorcio de bacterias y levaduras se observó de manera más uniforme, el tipo 2 (figura 6.b.) creciendo sobre las del tipo 1 con forma convexa y el tipo 3 (figura 6.c.) de manera circundante a los otros dos ambas con predominio bacteriano.

En cuanto al desarrollo microscópico se refiere, fue posible observar a los cocos y bacilos de diferentes longitudes agrupados en diplococos y diplobacilos mezclados entre sí, con levaduras en pequeñas aglomeraciones circundantes como se observa en la figura 6.a.

A partir del tipo de colonia 2 y 3 del medio APT (tabla 5), se prosiguió a la separación de bacterias y levaduras en el agar MRS suplementado con cicloheximida 1.4% v/v en donde se obtuvieron 3 tipos de crecimiento descritos en la tabla 6. De manera escasa las colonias del tipo 4 con predominio de levaduras se desarrollaron a las 24h al igual que las del tipo 5 formadas principalmente por cocos con diferentes tamaños, agrupados como diplococos y estreptococos en su mayoría (Figura 7.b.)

y finalmente los bacilos hasta las 48 h de incubación con diferentes longitudes; cortos, largos, ligeramente curvos y algunos más delgados que otros agrupados como diplo y estreptobacilos (figura 7.c.). Lo cual concuerda con lo descrito en Vázquez (2015), para las bacterias con forma bacilar.

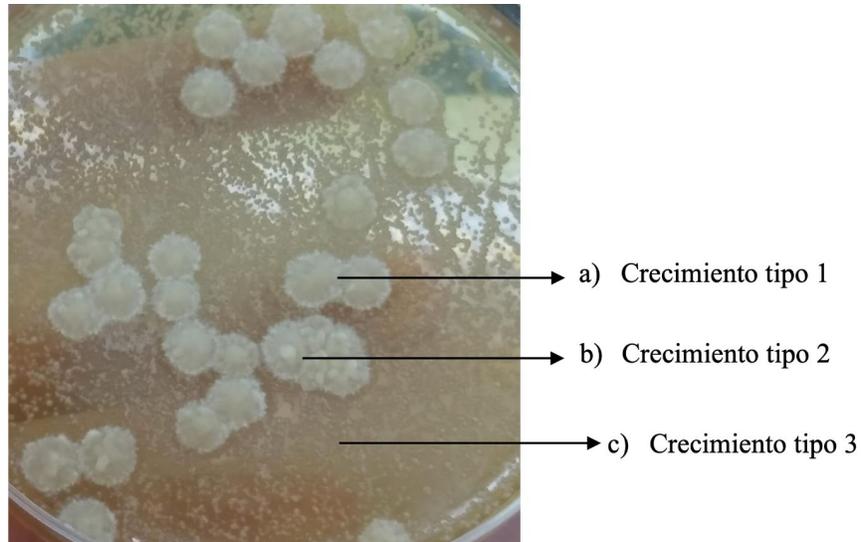


Figura 6. Crecimiento del consorcio microbiano en agar APT.

- a) Consorcio de BAL-LEV. b) Consorcio con predominio de bacterias. c) Consorcio con predominio de bacterias.

Tabla 5. Características morfológicas de consorcios microbianos en agar APT.

	AGAR APT		
Característica	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Microorganismo predominante	Indefinido (Bacterias, levaduras)	Bacterias	Bacterias
Forma	Irregular	Circular	Puntiforme
Elevación	Umbonada	Convexas	Plana
Borde	Crenado	Entero	Entero
Color	Blanco	Blanco	Transparente
Textura	Seca	Seca	Seca

Para lograr la separación final del consorcio se eligieron colonias del tipo 5 desarrolladas en este medio por presentar crecimiento en proporciones similares de cocos y bacilos.

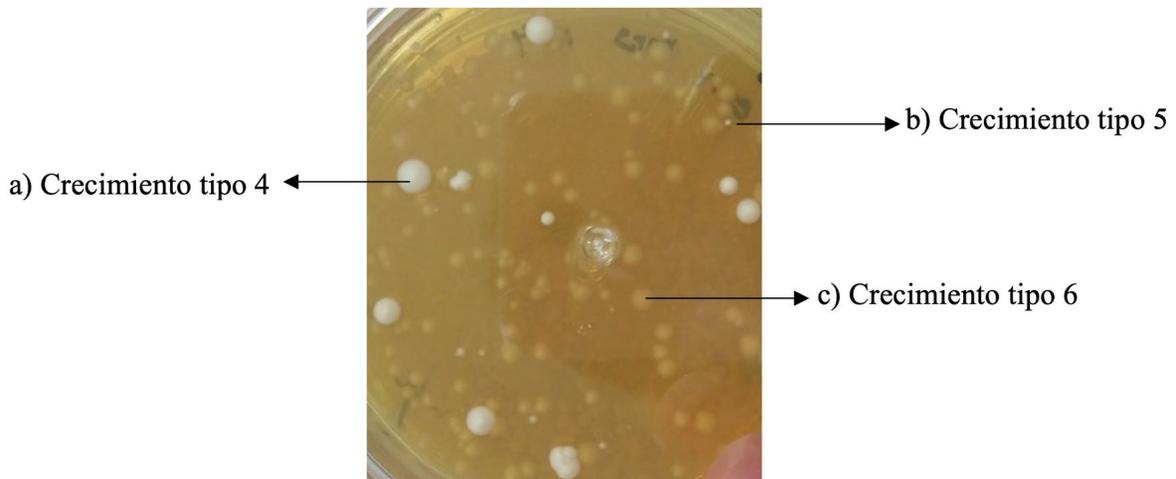


Figura 7. Crecimiento en agar MRS con cicloheximida 1.4% V/V.

Tabla 6. Características morfológicas de colonias de aislamientos en agar MRS.

	AGAR MRS CON CICLOHEXIMIDA		
Característica	Tipo 4	Tipo 5	Tipo 6
Microorganismo predominante	Levaduras	Bacterias con morfología de cocos	Bacterias con morfología bacilar y cocos
Forma	Circular	Circular	Puntiforme
Elevación	Convexas	Convexa	Plana
Borde	Entero	Entero	Entero
Color	Blanco	Blanca	Transparente
Textura	Cremosa	Seca	Seca

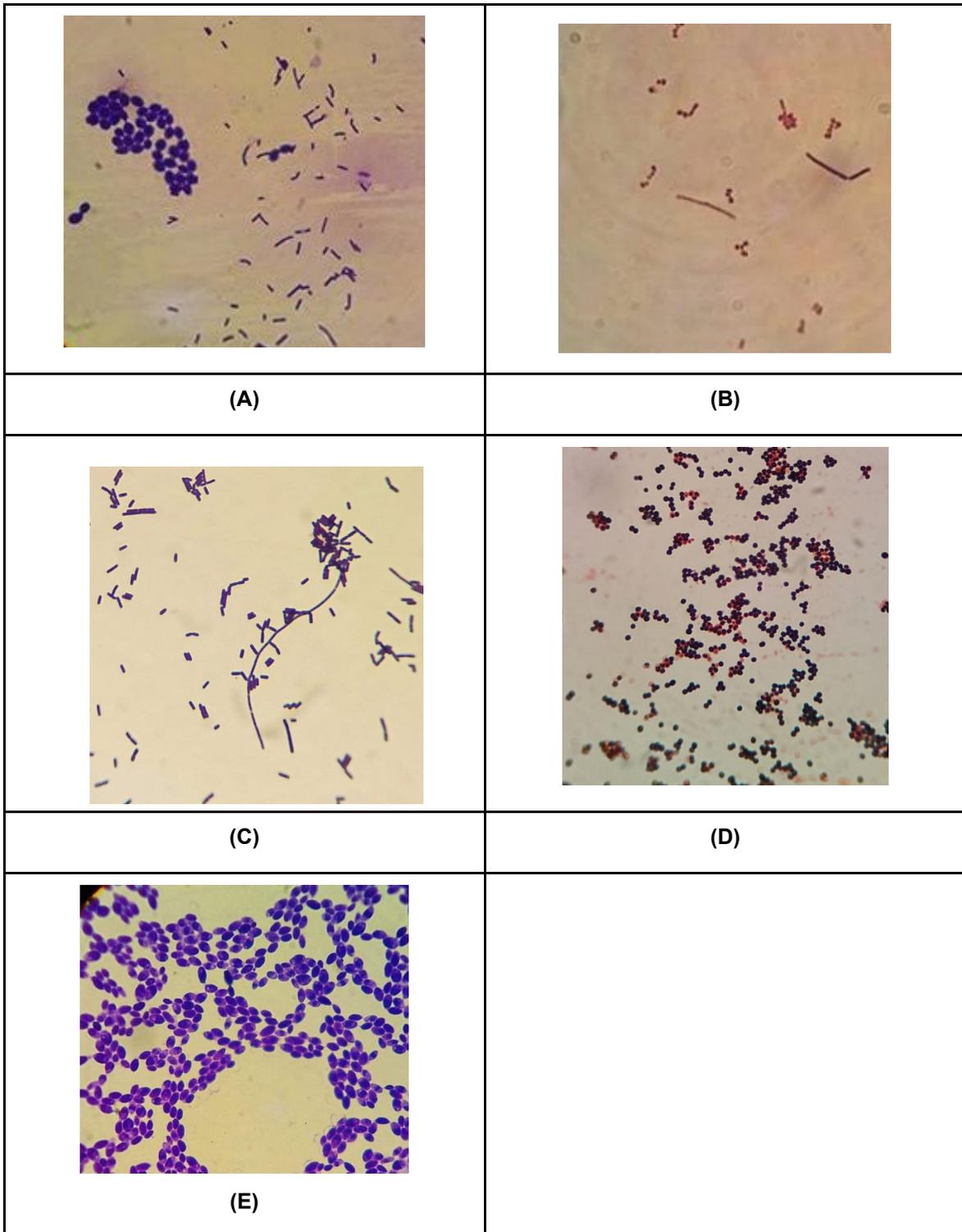


Figura 8. Tinción simple con cristal violeta 1000x de microorganismos presentes en los gránulos del kéfir.

A) Consorcio de levaduras, bacilos y cocos. B) Consorcio de cocos y bacilos. C) Bacilos con diferentes tamaños. D) Cocos de diferentes tamaños. E) Levaduras.

8.1.3 Selección de colonias y aislamiento de bacilos y cocos.

A partir de los cultivos realizados en agar MRS con cicloheximida 1.4% v/v, fueron aisladas 60 colonias de bacilos puros, entre éstas no se observaron diferencias morfocoloniales por lo que para seleccionar las colonias a evaluar se consideraron únicamente las características microscópicas uniformes a partir del desarrollo morfocolonial en agar APT; aquellas colonias que presentaron solo 1 tipo de bacilo, que fueran Gram-positivas y catalasa-negativas obteniendo finalmente 12 colonias de bacilos. Durante todo el trabajo realizado se conservaron en ultracongelación a -70°C. El tipo de bacilos que predominaron fueron los largos curvos de los extremos, que se desarrollaban en mayor proporción que los curvos cortos, lo cual dificulta el aislamiento de este último tipo de bacteria descrito, influyendo esto en no se obtuviera gran diversidad de especies para la identificación como se mencionará más adelante.

Para la selección de cocos se tomaron 7 colonias distintas que fueron aquellas que lograron desarrollarse en el agar MRS después de la serie de inoculaciones para aislar bacilos, es decir, los cocos más difíciles de separar del otro tipo de bacterias y por tanto las más adaptadas y/o resistentes a las condiciones generadas por estas. Es debido a la característica anteriormente mencionada que se realizó su aislamiento e identificación. Adicional a esto se hizo una tinción de Gram, obteniéndose en todos los casos Gram-positivo y prueba de catalasa positivo, con lo cual se descartó que estas fueran pertenecientes a los géneros de BAL *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, entre otros, los cuales son catalasa-negativos (Wagner, 1993; Collado, 2004; Cervantes-García *et al.*, 2014).

Tabla 7. Resultados de la tinción de Gram y prueba catalasa colonias de cocos.

Colonia	Resultado Gram/ Catalasa	Colonia	Resultado Gram/ Catalasa
8.1c	+,+	37.1c	+,+
8.3c	+,+	40	+,+
22c	+,+	43	+,+
34.c	+,+		

Negativo (-), Positivo (+)

8.2 Evaluación del potencial probiótico.

Como fue descrito en la metodología se realizaron dos ensayos, el primero fue realizado al consorcio de bacterias con morfología de cocos y bacilos y el segundo únicamente para bacilos puros, esto con el fin de poder observar el efecto que se genera al separar el consorcio de bacterias.

En la tabla 8 se encuentran los datos obtenidos para la concentración del cultivo de una colonia mixta (colonia 22) desarrollado en caldo APT; con una D.O._{600nm} de 1.645 se obtuvo una concentración de colonias viables de 33×10^7 UFC/mL. A partir de estos datos se realizó la relación entre densidad óptica y concentración de UFC/mL de los consorcios de bacterias (tabla 9) para posteriormente calcular los porcentajes de sobrevivencia (tabla 10).

Tabla 8. Concentración de microorganismos desarrollados a partir de la colonia mixta 22 en caldo APT.

Incubación a 37°C/48h empleada como referencia a partir de una *D. O.*_{600 nm} inicial: 1.645

Dilución	Serie 1 (UFC)	Serie 2 (UFC)	UFC/mL
10 ⁻⁵	372	280	33x10 ⁷ v.e.*

*Valor estimado (v.e.)

La condición de pH 3.5 fue en la que se observó menor tolerancia, reflejándose en un porcentaje menor de sobrevivencia sin perder viabilidad, esta capacidad está dada porque poseen numerosas proteínas que las hacen capaces de sobrevivir a la exposición de acidez extrema (Song *et al.*, 2015), lo cual coincide con otros artículos en donde otras cepas de *Lactobacillus* sp., se mantienen viables después de una exposición a valores de pH de 2.5 a 4 pero exhiben pérdida de viabilidad a valores más bajos (Song *et al.*, 2015). La colonia 8 fue la única colonia mixta que presentó un S% en pH 3.5 (28%) ligeramente mayor al de sales biliares (27%), el resto de las colonias mixtas y puras presentaron la tendencia antes mencionada (menor tolerancia a pH 3.5 que a sales biliares 0.3%).

Tabla 9. Valores de UFC/mL obtenidos por D.O._{600nm} por colonias mixtas para el ensayo de pH y sales biliares.

Colonia	UFC/mL (Caldo APT)	UFC/mL pH 3.5	UFC/mL 0.3% sales biliares a partir de pH 3.5	UFC/mL (Caldo APT)	UFC/mL 0.3% sales biliares
8	2.2×10^7	6.3×10^6	1.3×10^7	1.8×10^7	4.8×10^6
22	3.6×10^7	3.8×10^6	2.6×10^7	1.1×10^7	1×10^7
26	6.2×10^6	2.7×10^6	6.8×10^6	1.3×10^7	4.8×10^6
35	1.7×10^7	6.3×10^6	3.4×10^7	-	2.9×10^7
37	5.7×10^7	6×10^6	3.6×10^7	-	3×10^7
40	9.2×10^6	5.4×10^5	1.8×10^6	-	1.5×10^6
42	1.2×10^6	9.4×10^6	7.7×10^7	-	4.8×10^7
43	8.8×10^6	3.6×10^4	6.2×10^6	-	2.5×10^7
51	6.1×10^7	6.9×10^6	1.6×10^6	-	2.6×10^7
52	9.2×10^6	2.6×10^6	3.1×10^7	-	3.1×10^7

*(-) No hay datos de crecimiento porque no se realizó ese cultivo.

En el caso de las colonias puras, los resultados de concentración (células/mL) obtenidos a partir de la cuenta microscópica se encuentran en la tabla 11 y como porcentaje de sobrevivencia (S%) en la tabla 12; en ambos ensayos se observó la misma tendencia; en los tres retos a los cuales fueron sometidos conservaron viabilidad, sin embargo, se presentaron diferencias en el S% de un reto a otro.

Tabla 10. Porcentajes de sobrevivencia obtenidos para el ensayo de resistencia a pH 3.5 y sales biliars al 0.3%. Colonias mixtas.

Colonia	S% pH	S% sales	S% pH y sales	Viabilidad en cada ensayo
8	28	27	205	viable
22	26	36	690	viable
26	10.5	520	228	viable
35	37	170	542	viable
37	10.6	53	594	viable
40	5.82	16	329	viable
42	7.8	39	817	viable
43	4.14	28	169	viable
51	11.6	45	23	viable
52	28	334	1202	viable

En la exposici3n de sales biliars 0.3% se observ3 mayor S% con respecto a pH 3.5 en 9 de las 10 colonias mixtas evaluadas y en las colonias puras en todas las evaluadas. En este caso se report3 que algunas cepas de *Lactobacillus* no crecen en presencia de sales conjugadas de la bilis pero s3 en presencia de sales deconjugadas (Mej3a, 2007). La inhibici3n de las bacterias dada por las sales biliars es debida a que estas disuelven fosfol3pidos y perturban la estructura de la bicapa lip3dica causando p3rdida de la integridad de la membrana derivando en afectaci3n del potencial de membrana y muerte celular de la mayor3a de las bacterias Gram-positivas y negativas. En simult3neo con los efectos sobre la membrana plasm3tica, la bilis afecta otras funciones celulares que incluyen, entre otros, disturbios en la

estabilidad de macromoléculas pero la respuesta a este efecto depende tanto de la cepa en estudio como del tipo y la concentración de los ácidos biliares utilizados (Bustos *et al.*, 2017).

Tabla 11. Concentración de células a partir de cuenta microscópica obtenida para el ensayo de resistencia a pH 3.5 y sales biliares al 0.3% para colonias puras.

Colonia	Concentración inicial (células/ mL)	pH 3.5 células/ mL	Sales 0.3% a partir de pH 3.5	Sales 0.3% células/ mL	Viabilidad
8	1.97×10^7	2.72×10^6	3.15×10^6	4.8×10^6	Viable
8.1	5.8×10^4	1.53×10^3	8.22×10^2	2.11×10^3	Viable
22	1.1×10^8	5.12×10^6	3.84×10^6	2.25×10^7	Viable
26	1.78×10^7	1.17×10^6	5.33×10^6	1.27×10^7	Viable
26.1	3.06×10^7	2.03×10^6	7.15×10^6	1.24×10^7	Viable
26.2	6.99×10^6	3.20×10^5	7.63×10^6	4.37×10^6	Viable
26.3	1.4×10^5	5.87×10^3	1.36×10^4	5.70×10^4	Viable
26.4	4.2×10^5	7.64×10^3	5.76×10^3	1.88×10^5	Viable
35	1.71×10^7	2.72×10^6	1.81×10^6	4.43×10^6	Viable
35.2	3.47×10^7	3.79×10^6	8.0×10^6	1.64×10^7	Viable
*40	5.49×10^7	5.92×10^6	8.16×10^6	3.38×10^7	Viable
42	3.79×10^7	3.25×10^6	2.93×10^6	7.63×10^6	Viable
*43	1.66×10^7	1.12×10^6	7.09×10^6	2.06×10^7	Viable
51	1.58×10^7	1.81×10^6	3.36×10^6	6.51×10^6	Viable
52	2.65×10^7	2.61×10^6	3.73×10^6	1.87×10^7	Viable

*Colonias de cocos.

Tabla 12. Resultados en porcentaje de sobrevivencia obtenidos para el ensayo de resistencia a pH 3.5 y sales biliaras al 0.3%. Colonias puras.

Colonia	pH	Sales 0.3%	sales 0.3% a partir de pH 3.5	Viabilidad en cada ensayo
8	13.8	24.3	116	Viable
8.1	2.63	3.65	53.8	Viable
22	4.8	21.2	75	Viable
26	6.6	71.3	454.5	Viable
26.1	6.6	40.6	352.6	Viable
26.2	4.6	62.6	2383	Viable
26.3	4.20	40.7	232	Viable
26.4	1.82	44.9	75.4	Viable
35	15.9	25.9	66.7	Viable
35.2	10.9	47.2	211.3	Viable
40*	10.8	61.5	137.8	Viable
42	8.6	20.1	90.2	Viable
43*	6.7	123.7	633.3	Viable
51	11.5	41.2	185.3	Viable
52	9.9	70.4	142.9	Viable

***Colonias de cocos**

En algunos casos en donde se utilizan ambos tipos de sales (Mejía *et al.*, 2007), las cepas logran desarrollarse. Lo anterior es asociado a que poseen actividad de una

enzima hidrolasa de sales biliares (HSB) la cual genera una la hidrolisis del enlace amida de los AB, esta actividad se asocia con las bacterias intestinales y algunos autores sugieren una posible relación entre la actividad HSB y la resistencia a bilis en ciertas cepas lácticas (Bustos *et al.*, 2017). Sin embargo, aún no se conocen con precisión los complejos mecanismos de adaptación desarrollados por los microorganismos para tolerar la presencia de bilis. En particular, es escasa la información disponible respecto de la respuesta desarrollada por bacterias potencialmente probióticas frente al desafío producido por los AB (Bustos *et al.*, 2017) por lo que no es posible describir exactamente el mecanismo con el cual logran incluso desarrollarse y por lo cual se obtuvieron S% en algunos casos mayores al 100%, destacando particularmente las colonias 22 y 52 mixtas con 690% de desarrollo y 1202% respectivamente. En el caso de las colonias puras destacan 3 casos: colonia 26 (71.3%), colonia 43 (123.7%) y colonia 52 (70.4%).

Comparando los 3 ensayos, en donde se obtuvo mayor S% fue en el reto de pH 3.5 seguido de sales biliares 0.3% el cual representa mejor cómo será su exposición a estas condiciones en el paso por el sistema digestivo; en 9 (8, 22, 26, 35, 37, 40, 42, 43 y 52) de las 10 colonias mixtas evaluadas y para las colonias puras en todos los casos. Este comportamiento se ha descrito para algunas BAL, por ejemplo, para *Lactobacillus sakei* MA9 en Song *et al.*, (2015), la cual presenta disminución de UFC/mL viables en la exposición de a pH 2.5 pero tiene un aumento UFC/mL viables en sales 0,3% incubadas por 24 h, es decir, algunas BAL no son solo capaces de mantenerse viables, sino incluso de desarrollarse bajo estas condiciones característica importante para ser consideradas como probióticos. Además, cabe destacar que el tiempo de exposición a pH 3.5 fue solo de 3 horas en este ensayo antes de colocarse en las sales biliares y no de 24 h como en el otro ensayo, por lo que los daños por exposición al ácido fueron menores, lo cual se reflejó en los resultados.

Aunque el mecanismo de adaptación al estrés varía para cada microorganismo, uno de los mecanismos señalados por ejemplo en *L. kefiranofaciens* es el aumento de

la síntesis de diversas proteínas de estrés que le confieren un papel protector crítico en la defensa celular (Chen *et al.*, 2017) y que al sintetizarse en el consorcio esta protección sea extendida a las células que en este están.

En el caso de los dos cocos evaluados (colonia 40 y 43 tabla 12) es importante destacar que en el tratamiento conjunto su porcentaje de sobrevivencia es mayor al 100%, (137.8% y 633.3%) lo cual evidencia su gran adaptación a condiciones de estrés razón por la cual persistió su presencia incluso en los últimos pasos al momento de aislar a los bacilos.

Comparando los resultados de los consorcios con el de las bacterias puras de manera general se observó que los microorganismos evaluados son capaces de resistir pH 3.5 24h en menor medida que las sales biliares 0.3% y ambas condiciones en conjunto. No es posible establecer un valor para la diferencia de sobrevivencia entre consorcios y puros, debido al cambio de metodología para determinar el S%; en el primero fue por *D.O.*_{600nm} en la cual se cuantifican células totales y los metabolitos que los microorganismos pudieran generar y en el recuento microscópico que se pueden contabilizar células como viables aunque no lo estén, por lo tanto en ambos casos únicamente se consideran los valores de manera cualitativa para visualizar la resistencia a estas condiciones.

8.3 Evaluación de potencial antagónico contra patógenos.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las bacterias presentes en el kéfir frente a patógenos se utilizaron una bacteria Gram-positiva; *Listeria monocytogenes* y Gram-negativa; *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Al igual que en los retos en condiciones similares a las gastrointestinales, para el ensayo de antibiosis fueron evaluados los consorcios de bacterias y de bacilos puros.

En los consorcios de las 10 colonias evaluadas únicamente 6 presentaron capacidad de antibiosis tanto para *S. Typhimurium* como para *L. monocytogenes*

(tabla 13), las colonias 35, 37, 42 y 43 no poseen capacidad de inhibición, destacando que a pesar de provenir todas de un mismo consorcio, es decir de los gránulos de kéfir, la composición de cada una de ellas es diferente.

Tabla 13. Resultados positivos del ensayo de antibiosis colonias mixtas.

COLONIA	<i>S. Typhimurium ATCC 14028</i> halo (mm)	<i>L. monocytogenes</i> halo (mm)
8	10	11
22	10	11
26	8	12
40	10	12
51	12	13
52	13	17

En el caso de los bacilos puros, de las 12 bacterias evaluadas únicamente 5 presentaron capacidad inhibitoria frente a los patógenos seleccionados (tabla 14 y 15), sin embargo, es posible que, aunque no hayan inhibido a estos microorganismos, puedan presentar capacidad inhibitoria frente a otros patógenos. En particular, muchas especies de bacterias ácido lácticas (BAL) han sido reconocidas como microorganismos productores de metabolitos bioactivos que actúan contra un amplio espectro de microorganismos patógenos como bacterias y hongos (Yépez, 2016). Esta actividad antagónica se debe a la producción de metabolitos con acción antimicrobiana tales como: ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Juzdado, 2018). Las bacteriocinas son péptidos, las cuales son secretadas por las bacterias y están relacionadas estrechamente con la inhibición de bacterias Gram-positivas y algunas bacterias Gram-negativas utilizando varios mecanismos de acción (Abrar *et al.*, 2020).

Tabla 14. Resultados positivos ensayo de antibiosis bacilos puros ajustados a *D. O._{600 nm}0.2* contra patógenos *D. O._{600 nm}0.2*.

Colonia	S. Typhimurium ATCC 14028 halo (mm)	L. monocytogenes halo (mm)
8.1	6	11
26.3	8	9
26.4	11	0

Al realizar una comparación entre los resultados obtenidos con los consorcios (tabla 13) y las bacterias puras 8.1, 26.3 y 26.4 (tabla 14), en donde la concentración de la colonia a prueba frente al patógeno mantuvo una relación 1:1, se observa que los halos de inhibición generados por los consorcios son de mayor tamaño que los de las bacterias puras, destacando los valores de la colonia 52 de 13 mm frente a *S. Typhimurium* y 17 mm en *L. monocytogenes* (tabla 13).

Para el resto de los bacilos puros no se generó halo de inhibición siguiendo la relación 1:1 cepa de prueba/patógeno, por lo que fue necesario aumentar la concentración de la cepa prueba a una *D.O._{600 nm}* de 0.7 frente a una de *D.O._{600 nm}0.2* del patógeno. Con esta modificación dos colonias más generaron un halo de inhibición (tabla 15) destacando la colonia 26.1 en donde se generan halos de 16 mm y 13 mm frente a los patógenos de prueba. Es decir, la capacidad inhibitoria contra patógenos es mayor en los consorcios que en las bacterias de manera individual en todos los casos.

Tabla 15. Resultados positivos ensayo de antibiosis bacilos puros ajustados

*D. O.*_{600 nm}0.7 contra patógenos *D. O.*_{600 nm}0.2.

Colonia	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 halo (mm)	<i>L. monocytogenes</i> halo (mm)
8	10	10
26.1	16	13

Las colonias que presentan mayor poder de inhibición frente a *L. monocytogenes* fueron las colonias mixtas 26, 40, 51 y 52 y en las puras la colonia 26.1 con 13 mm de inhibición y destacando la 26.4 por no inhibir. En la figura 9 se muestra la comparación entre la inhibición que genera una colonia mixta y una pura.

En la literatura se reporta que además de los metabolitos anteriormente mencionados, microorganismos como *Enterococcus faecium* CRL 183 y *Lactobacillus reuteri* CRL 1098, ambos con actividad hidrolítica sobre las sales biliares, ejercen inhibición contra esta bacteria gracias a las sales deconjugadas por ellas producidas (Mejía *et al.*, 2007), siendo este un posible mecanismo para la inhibición de patógenos. Además de lo antes señalado como menciona Abrar *et al.*, (2020), el kéfir contiene BAL que son conocidas por producir bacteriocinas, por ejemplo, *Lactococcus lactis* DPC3147 aislado de gránulos de kéfir provenientes Brasil inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, y *Salmonella enteritidis*. Por tanto los resultados obtenidos permiten dilucidar que las bacterias aisladas podrían ser capaces de producir alguno de los metabolitos señalados con anterioridad y con ello destacarse como potencialmente probióticos. En cuanto a las bacterias que no lograron inhibir estos patógenos en investigaciones posteriores sería adecuado probar su potencial inhibitorio frente a otras cepas, Carasai *et al.*, (2014) reporta que en la evaluación de 6 tipos de *L. kefir* aislados del kéfir tres de ellas generan inhibición frente a *L. monocytogenes* y las otras 3 no, sin embargo, las 3 que no presentan actividad para este patógeno, si lo presentan para *Bacillus cereus*, otro patógeno Gram-positivo, por lo que los

resultados obtenidos para cada cepa de bacilo a prueba son independientes para cada patógeno.

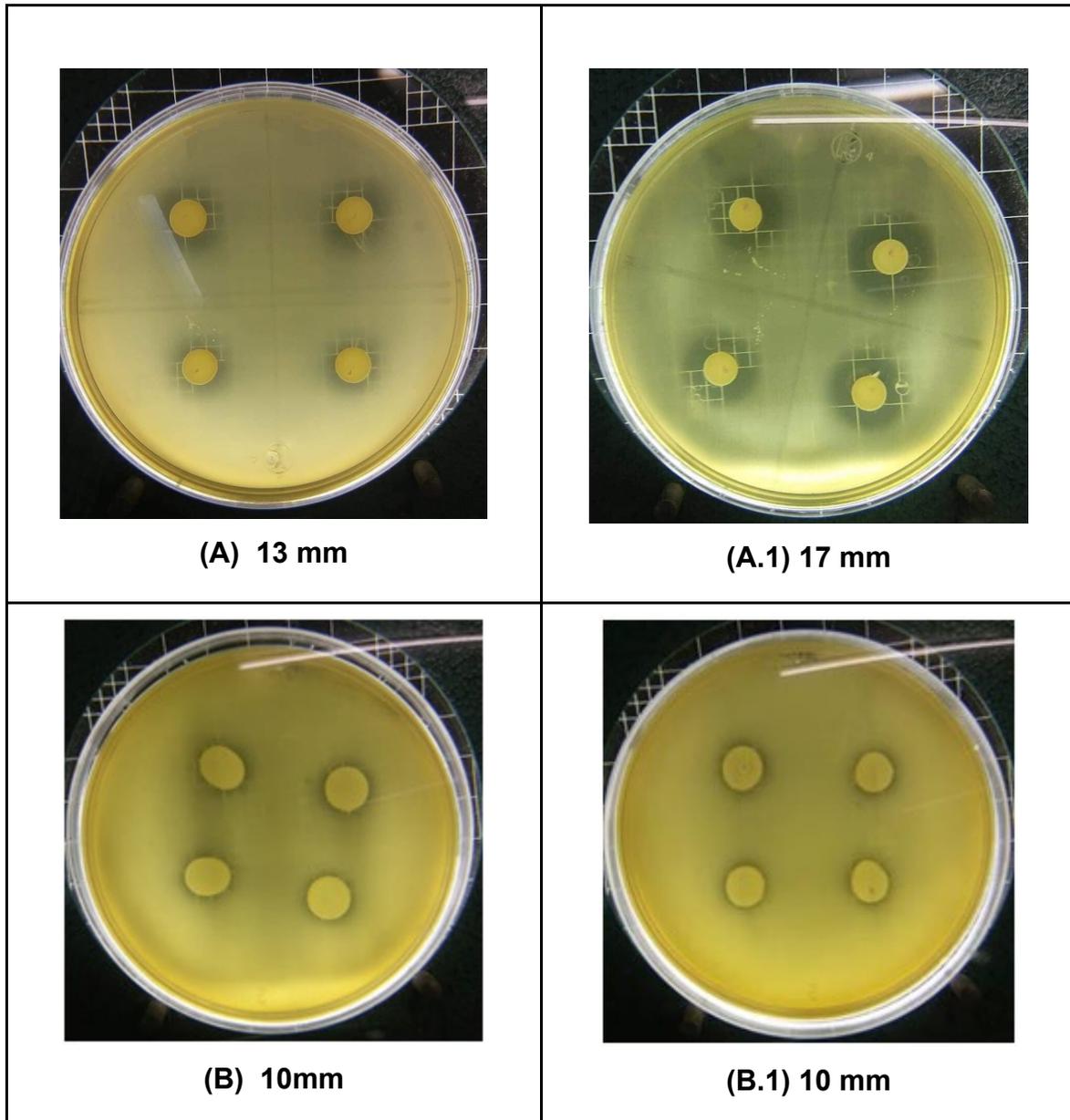


Figura 9. Resultados obtenidos del ensayo de antibiosis, colonia mixta y pura.

A) Antibiosis consorcio microbiano cocos y bacilos colonia 52 contra *Salmonella* Typhimurium. A.1) Antibiosis consorcio microbiano cocos y bacilos colonia 52 contra *Listeria monocytogenes*. B) Antibiosis colonia 8 bacilos puros contra *Salmonella* Typhimurium. B.1) Antibiosis colonia 8 bacilos puros contra *Listeria monocytogenes*.

8.4 Ensayo con lisozima.

Como prueba adicional a la resistencia de condiciones gastrointestinales, se realizó un ensayo de exposición a lisozima, enzima presente en la saliva de la boca, es decir, es la primera barrera a la que se enfrentarán los microorganismos al ser ingeridos.

Tabla 16. Ensayo de lisozima bacilos puros.

Colonia	UFC/mL inicial	UFC/mL (30 min con lisozima)	Viabilidad (60 min con lisozima)	%S
8	21 x10 ⁶	42 x10 ⁵	Viable*	20%
26.1	11 x 10 ⁵	44 x 10 ⁴	Viable*	40%

*Presentan crecimiento al incubarse en agar APT.

En el tratamiento se expuso a las bacterias en estudio a 30 y 60 min, los resultados se encuentran en la tabla 16 y de manera visual en la figura 10. El ensayo fue realizado para las cepas 8 y 26.1, las cuales presentaron capacidad inhibitoria de patógenos. En el caso de la colonia 8, se observa un 20% de sobrevivencia tras la exposición por 30 min a la lisozima y conservación de viabilidad a los 60 min. En el caso de la colonia 26.1 se obtuvo 40% de sobrevivencia y conservación de viabilidad tras 60 min. Aunque el tiempo de exposición a esta enzima en la boca es menor, bajo estas condiciones se permite realizar una selección más rigurosa de las bacterias con resistencia a la enzima. Algunos mecanismos de resistencia bacteriana a la lisozima son los siguientes: las bacterias patógenas han desarrollado resistencia a la actividad bacteriolítica del hospedante que secreta la lisozima durante la infección; el mecanismo primario es la modificación de la cadena de su peptidoglucano glucano (Gálvez-Irqui *et al.*, 2020). Recientemente, se ha reportado la síntesis de los monosacáridos y disacáridos del ácido acetil- murámico (AAM), así como la posibilidad de que estos compuestos puedan unirse al sitio activo de la lisozima, para producir su hidrólisis (Gálvez-Irqui *et al.*, 2020). La disposición en el espacio de los grupos funcionales de estos compuestos puede impedir o promover

la unión al sitio activo de la enzima, en este caso, los grupos metoxilo (-OCH₃), acetilo (-COCH₃) y metilo (-CH₃). Este estudio sugiere que los sustratos relacionados con el peptidoglucano, que puedan adoptar la conformación necesaria para interactuar con el sitio activo, serán hidrolizados en los enlaces *o*-glicosídicos por la lisozima. Aunque actualmente no está dilucidado el mecanismo por el cual las bacterias lácticas puedan generar resistencia a esta enzima, los mecanismos antes mencionados podrían ser una explicación a ello.

Además de lo antes mencionado, si tomamos en cuenta las características óptimas de actividad de esta enzima, como menciona Gálvez Iriqui *et al.*, (2020) la mayoría de los estudios indican que las escalas óptimas de pH van desde ligeramente ácido (5.5-6.7) hasta alcalino (7.4-8). La temperatura óptima de las lisozimas varía según la fuente, pero la mayoría de los estudios indican que es de aproximadamente 40°C para insectos y animales. Por tanto, una forma de inhibición en este caso pudo provocar el descenso de pH en el medio generando inactivación parcial de la enzima.

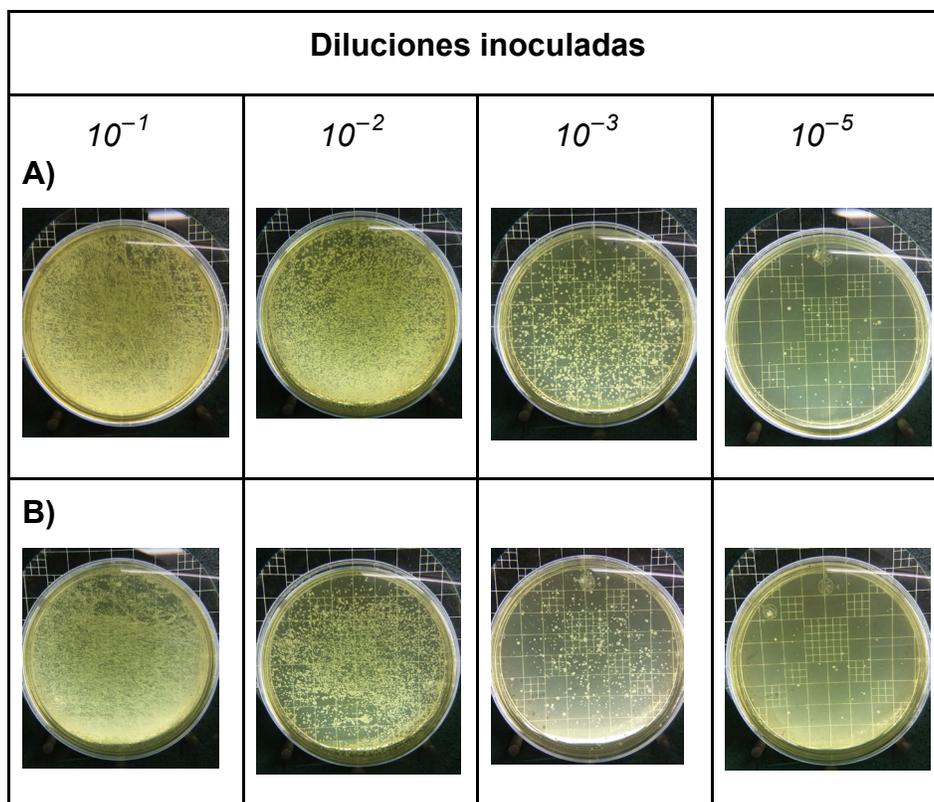


Figura 10. Ensayo de lizozima colonia 8.

a) Inicio del tratamiento. b) 30 min de incubación. Se observa disminución de viabilidad al pasar 30 min en contacto de lizozima desde la dilución 10^{-2} .

8.5 Identificación microbiana mediante el gen ribosomal 16S.

8.5.1 Extracción de ADN cromosomal y electroforesis.

Se realizó la extracción del ADN cromosomal de acuerdo con lo indicado en el punto 7.14 con el fin de amplificar el gen ribosomal 16S, secuenciar y posteriormente realizar la identificación de las bacterias que se lograron aislar en el presente trabajo. Es posible observar en las figuras 11 y 14 (anexo 3), se logró extraer correctamente el ADN cromosomal de las bacterias a analizar tanto de cocos como de bacilos, mostrando una sola banda de ADN por arriba de 10 kbp, en algunos casos una banda más tenue que en otras por la concentración obtenida, sin embargo, fue suficiente para realizar la amplificación de los ARNr 16S correspondientes.

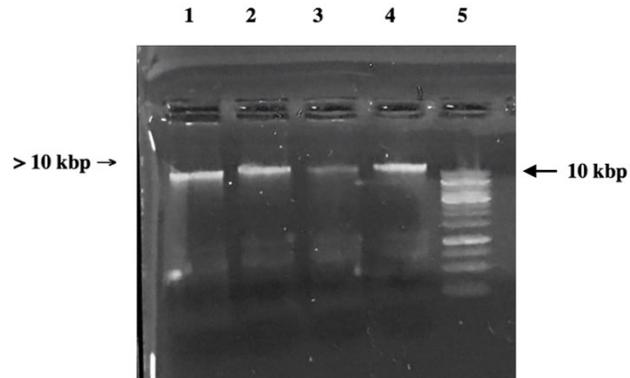


Figura 11. ADN cromosomal cocos.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v. 100 V, 80 A y 4 μ L de bromuro de etidio 0.04%. Carril 1. 37.1. Carril 2. Cepa 34. Carril 3. Cepa 22 Carril 4. Cepa 8.3. Carril 5. Marcador de peso molecular O'Gen Ruler^R 1 kbp de Thermo ScientificTM.

8.5.2 Amplificación del gen que codifica para la región ARNr 16S por PCR.

Con el uso de la técnica de PCR se llevó a cabo la amplificación del ADNr 16S. En figura 14 (anexo) se observa el gel de electroforesis realizado después de la amplificación de cada uno de los bacilos en estudio, en todos los casos se obtuvo únicamente una banda a la altura correspondiente a 1.5 kpb lo cual coincide con el tamaño del gen ARNr que presenta 1,500 nucleótidos (Rodicio *et al.*, 2004) obteniéndose por lo tanto los amplicones del tamaño esperado.

Se determinó la concentración de ADN obtenida para cada secuencia y su pureza mediante la relación de absorbancia a 260nm/280nm para detectar componentes proteicos asociados a la preparación de ADN si se obtiene un valor menor a 1.6 (tabla 17). Un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0 de relación de absorbancia a 260nm/280nm (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN), en este caso todas las secuencias presentaron un valor mayor a 1.8, por lo tanto tuvieron una pureza aceptable. En el caso de la relación de absorbancia a 260nm/230nm se indica la presencia de contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos, se considera que el ADN es puro cuando la relación se encuentra en torno de 1.8-2, aunque esta relación en todos los casos

para las secuencias obtenidas, es importante mencionar que esta relación se ve afectada dependiendo de la composición del tampón de resuspensión de la muestra. Debido a que fue posible la secuenciación de todas las muestras, se confirma que el ADN se encontraba en óptimas condiciones.

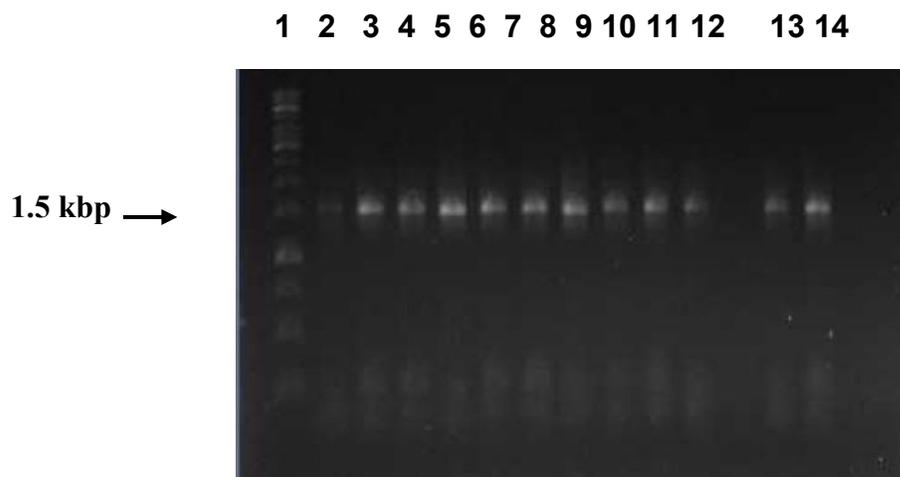


Figura 12. Amplificación del gen que codifica para la región ARNr 16S mediante PCR.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/V, 100 V, 8 A y 4 μ l de bromuro de etidio 0.04%. Carril 1. Marcador de peso molecular *O'Gen Ruler^R* 1 kbp de Thermo *ScientificTM*. Carril 2. Cepa 37. Carril 3. Cepa 35. Carril 4. Cepa 35.2 Carril 5. Cepa 43. Carril 6. Cepa 52. Carril 7. Cepa 22 Carril 8. Cepa 40. Carril 9. Cepa 8. Carril 10. Cepa 42. Carril 11. Cepa. 26.2 Carril 12. Carril 13. Cepa 51. Carril 14. Cepa 26.1.

Tabla 17. Concentración de ADN en productos de PCR por nanodrop (Thermo).

Número de colonia	Concentración (ng/ μ L)	Relación de absorbancia 260nm/280nm	Relación de absorbancia 260 nm/230nm
8	22.7	1.87	0.99
22	22.0	1.93	1.14
26	17.6	1.93	1.0
26.1	20.6	1.91	1.18
35	19.8	2.05	0.2
35.2	21	1.90	1.34
37	8	1.94	0.70
40	26.2	1.89	1.10
42	20.5	1.95	0.84
43	27.3	1.93	1.14
51	23.2	1.87	0.94
52	20.6	1.92	1.67

8.5.3 Análisis de secuencias del gen que codifica para la región ARNr 16S e identificación.

Después de realizar la extracción y amplificar el gen por el método de PCR de las cepas seleccionadas, estas fueron secuenciadas (Unidad de Servicio de secuenciación y síntesis, Instituto de Biotecnología, UNAM); en todos los casos el análisis de las secuencias mostró una buena calidad de secuenciación de por lo menos 600 bases por lo que fue posible su comparación con las depositadas en GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante la aplicación Blastn. Dicha comparación se realizó con el fin de establecer su relación evolutiva y construir un árbol filogenético, que permita observar de manera gráfica cómo se relacionan las secuencias obtenidas en comparación con las depositadas en la

plataforma y con ello asignarles un género y especie. La identificación de una bacteria a nivel de especie no requiere necesariamente la secuenciación completa del gen que codifica para el ARNr 16S completo debido a que la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases correspondientes al extremo 5' (Rodicio *et al.*, 2004).

Los parámetros de selección para las secuencias con las que se realizó el árbol filogenético fueron un e-value de 0.0%, es decir, que no fueran secuencias seleccionadas al azar y un (QC) mayor a 97%. Cuando hay una semejanza en el ARNr 16S del 95% se habla de género, y cuando la semejanza es del 97%, se habla de especie (Icaza-Chávez, 2013), en la mayoría de los casos el valor obtenido fue de 99.9%. Las secuencias de grupo externo empleadas en la construcción del árbol fueron *Zymomonas mobilis* sp. AY350737 y *Sulfolobus acidocaldarius* D14053.

Como se puede observar dentro del árbol filogenético generado (figura 13), se tienen dos grupos de bacterias, el primero ubicado en la parte superior para lactobacilos, en la parte inferior para cocos y al final del árbol como se esperaba las secuencias usadas como grupo externo, es decir, el agrupamiento obtenido fue el esperado.

El género al que pertenecen los cocos identificados es el de *Staphylococcus*. Este género está formado por cocos Gram-positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 micrómetros, agrupados como células únicas, pares, tétradas, racimos de uva y cadenas cortas (Cervantes-García *et al.*, 2014), como fueron observadas en las tinciones realizadas (figura 8). De acuerdo a lo que se reporta en la literatura el género *Staphylococcus* contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos formando parte de la microbiota de piel y mucosas (Cervantes-García *et al.*, 2014). Las especies identificadas de *Staphylococcus* son; *S. warneri* cuyo crecimiento se ha reportado en productos donde se combinan como ingredientes huevo y queso siendo capaz de desarrollarse a la par de BAL (Mateos, 2018) y en quesos duros en diferentes puntos de venta (Lemus *et al.*, 2008).

S. epidermidis de la cual se ha reportado su presencia en otros productos lácteos como el helado (Concha, 2011) y quesos blandos (Lemus *et al.*, 2008). *S. pasteurii* y *S. edaphicus*, de los cuales no se encontraron referencias de su crecimiento en alimentos. En todos los casos de *Staphylococcus*, las especies reportadas en alimentos no los señalan como microbiota presente de manera natural en los alimentos o que presenten una función benéfica en este, por el contrario se hace referencia que son indicadores de contaminación de la materia prima con la que fueron elaborados o bien por la manipulación de las personas que lo elaboran y/o manipulan al momento de la venta. En el caso particular de los gránulos de kéfir, su presencia puede estar relacionada con su origen casero, en donde para su empleo el contacto con las manos haya estado presente y por sus características fueron capaces de sobrevivir a las condiciones creadas por las BAL como lo es el pH ácido, pero no solo sobrevivir, también se pueden ver beneficiados de los metabolitos generados por las BAL como se reporta en Holz *et al.*, (2016) en donde se puso a prueba el efecto de un extracto conformado por un metabolito generado por *Lactobacillus brevis*, presumiblemente péptidos, que estimulan la actividad metabólica de *S. epidermidis* y *S. warneri* y por tanto su desarrollo en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

En cuanto a los lactobacilos, como se menciona en la discusión del aislamiento de los microorganismos, las características morfológicas que se obtuvieron fueron muy similares, siendo predominante el tipo de bacilo largo y curvo en lugar de corto como es posible observar en las tinciones realizadas de ahí que solo se hayan obtenido dos especies diferentes (tabla 20); *L. kefirifaciens* correspondientes a 2 de los aislados y 9 aislados a *L. kefirii*, siendo estas especies las reportadas con mayor frecuencia, en los gránulos de Taiwán, Rusia, Bulgaria, China, Brasil, etc. (Simova *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2009; Gao y Li, 2016).

Lactobacillus kefirii se reporta es altamente resistente a sales biliares 0.4% (v/v) y moderadamente resistente a condiciones ácidas, además de lograr la inactivación de *L. monocytogenes* al ser puestos en un medio suplementado con

galactooligosacáridos (Likotrafiti *et al.*, 2015) y de presentar la habilidad de modular la composición de la microbiota en pacientes a los que fue suministrados vía oral (Toscano *et al.*, 2017), es decir, cuenta con propiedades probióticas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con lo antes mencionado, las bacterias que se encuentran más cercanas a los bacilos estudiados que pertenecen a esta especie presentan estas características; son más resistentes al efecto de las sales biliares y moderadamente a pH ácido. Entre los lactobacilos pertenecientes a esta especie son el 8 y 26.1 que presentaron actividad antagónica a *L. monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium. Debido a que no hubo coincidencia al 100% con ninguna de las secuencias analizadas y su agrupación no fue en la misma rama, será necesario para la identificación de las cepas correspondientes la secuenciación completa del ADN 16S. Los otros lactobacilos que no presentaron actividad confirman que la capacidad probiótica no solo está relacionada con el género y la especie si no determinada por la cepa como se menciona en Carasai *et al.*, (2014).

Por su parte *L. kefirifaciens* también ha sido reportado como microorganismo probiótico e incluso se han estudiado los mecanismos mediante los cuales son capaces de adaptarse a condiciones de estrés como lo es la exposición a sales biliares, acidez, calor y frío (Chen *et al.*, 2017). Como se observó en los resultados obtenidos para estas bacterias a las condiciones de estrés se cumple lo antes mencionado, resistencia a estas condiciones. Esta bacteria por ser la responsable de la producción del polisacárido que da integridad a la estructura de los gránulos de kéfir está presente en todos ellos sin importar el origen. El lactobacilo identificado como 26.3 se agrupó con *L. kefirifaciens* IMAU98295, con número GENBANK MT473650.1 (tabla 18), por lo que se puede decir que el microorganismo aislado corresponde a esta identidad de cepa. Los otros bacilos al no agruparse con un bacilo determinado no se pueden asociar a una cepa específica por lo que sería necesario evaluar todo su genoma para asegurar la identificación.

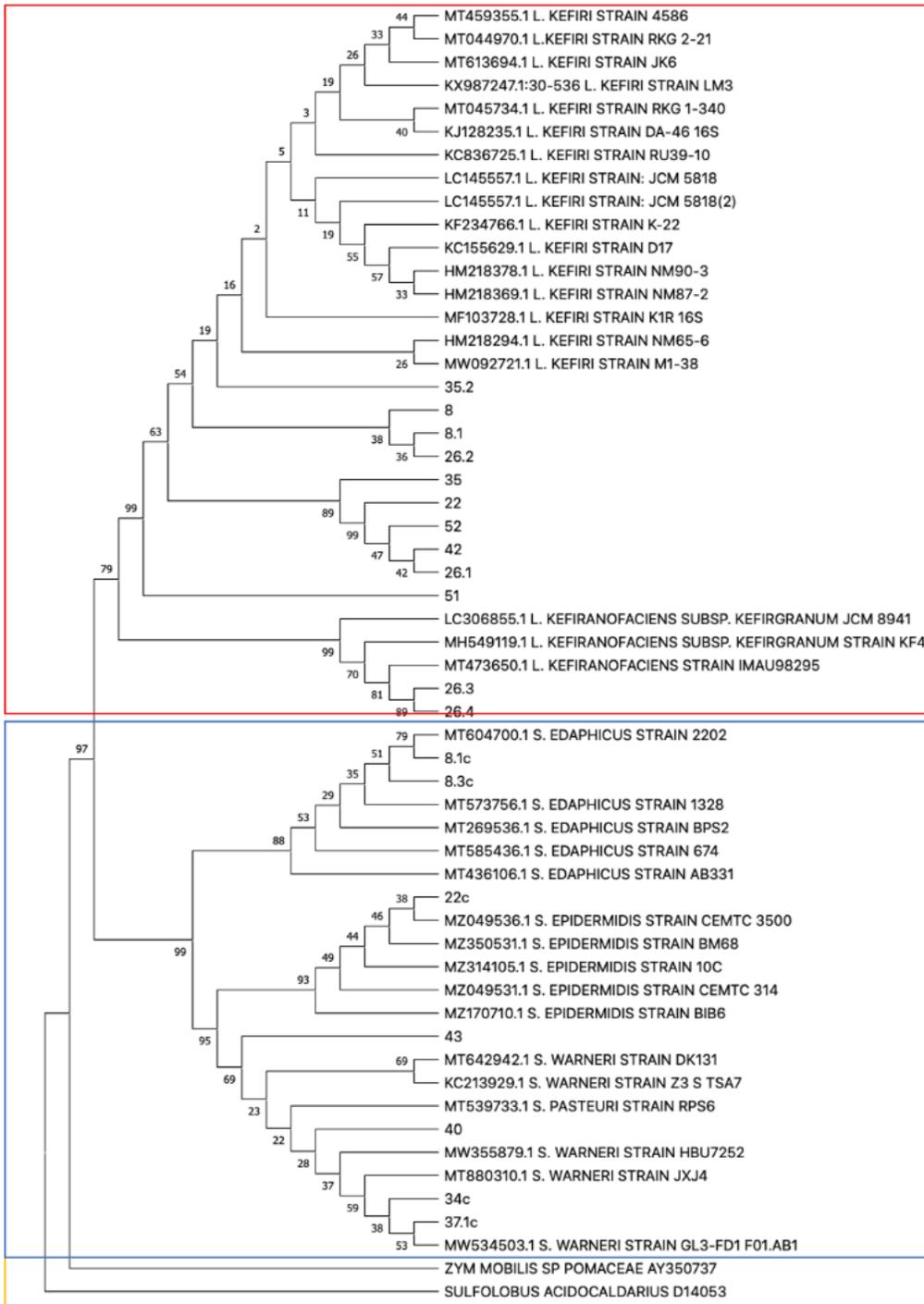


Figura 13. Árbol filogenético para los microorganismos en estudio.

Elaboración con el programa MEGA mediante el análisis NJ. Recuadro de color azul enmarcadas las secuencias para cocos, en rojo para bacilos y en amarillo las cepas de referencia.

Tabla 18. Identificación de microorganismos a partir de las secuencias del gen que codifica para la región ARNr 16S con 100% de identidad.

No. de colonia	Género y especie	Porcentaje de cobertura	Valor de expectancia	Identidad (%)	No. de acceso Genbank
22c	<i>S. epidermidis</i> strain BIB6	100%	0.0	100%	MZ170710 .1
8.3c	<i>S. edaphicus</i> strain 1328	100%	0.0	100%	MT573756 .1
26.3	<i>L. kefiranofaciens</i> strain IMAU98295	100%	0.0	100%	MT473650 .1

Tabla 19. Identificación de microorganismos por género y especie a partir del gen que codifica para la región ARNr 16S.

No. de microorganismo	Género y especie	Identidad (%)	No. de acceso Genbank
43	<i>Staphylococcus warneri</i>	99%	MT642942.1
37.1		99%	KC213929.1
		99%	MW355879.1
		99%	MT880310.1
34c		99%	MW534503.1
40	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	99%	MT539733.1

Tabla 19. Identificación de microorganismos por género y especie a partir del gen que codifica para la región ARNr 16S (continuación).

8.1c	<i>Staphylococcus edhapticus</i>	99%	MT269536.1
		99%	MT585436.1
		99%	MT436106.1
		99%	MT604700.1
26.4	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	99%	LC306855.1
8.1		99%	MH549119.1
51	<i>Lactobacillus kefiri</i>	99%	MT459355.1
52		99%	MT044970.1
26.2		99%	MT613694.1
			MW092721.1
22		99%	KX987247.1
			MF218294.1
42		99%	MT045734.1
			MF103728.1
35		99%	KJ128235.1
			HM218369.1
8		99%	KC836725.1
			HM218378.1
26.1		99%	LC145557.1
			KC155629.1
35.2		99%	KF234766.1
			KC155629.1

9. Conclusiones.

-De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que los gránulos de kéfir contienen una gran diversidad de bacterias Gram-positivas ácido lácticas y levaduras que crecen a temperatura de 37°C y 28°C en condiciones aerobias y anaerobias y que se encuentran íntimamente relacionadas, lo cual lo convierte en un consorcio difícil de separar y que presenta mejor capacidad antagónica frente a los patógenos de prueba que las BAL de manera individual.

-Se logró el aislamiento de 12 BAL las cuales presentan tolerancia a las condiciones gastrointestinales *in vitro* a las que fueron sometidas: pH 3.5, sales biliares al 0.3% y a lisozima 7 mg/L y capacidad antagónica contra los patógenos *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Listeria monocytogenes*, por lo cual se considera que tienen potencial probiótico.

-Los bacilos que lograron aislarse pertenecen a las especies *L. kefir* y *L. kefiranofaciens* del cual una de ellas es similar a la cepa *L. kefiranofaciens* IMAU98295.

-Dentro de las bacterias presentes en los gránulos de kéfir se encuentra microbiota acompañante capaz de resistir y utilizar las condiciones creadas por las BAL, como lo son los microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus*.

-Los consorcios que conforman los gránulos de kéfir provenientes del centro de Xochimilco presentan algunas de las características para ser considerados como probióticos.

10. Perspectivas.

-Confirmar la identidad de las bacterias que presentaron capacidad antagónica contra los patógenos de prueba mediante la secuenciación completa del ADNr 16S.

-Cuantificar viabilidad en ensayos de condiciones gastrointestinales.

-Complementar los ensayos de caracterización de estas bacterias sometiéndose a ensayos de antibiosis con un número más amplio de microorganismos patógenos.

-Realizar la caracterización bioquímica y el perfil de resistencia a antibióticos de las bacterias que presenten mejor poder antagónico contra patógenos.

-Realizar análisis de los metabolitos generados por los microorganismos.

-Comprobar potencial probiótico mediante ensayos *in vivo*.

11. Referencias.

1. Álvarez J., Fernández J., Guarner F., Gueimonde M., Rodríguez J., Saenz M., Sanz Y. (2021). Gut microbes and health. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*. (44), 519-535.
2. Abrar S., Bahadur B., Gulhan U. (2020). Bacterial populations in International Artisanal Kefirs. *Microbial safety of fermented products. Microorganisms*, 8(9), 1318.
3. Arslan, S. (2015). A review: Chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir, *CyTA - Journal of Food*. 13 (3), 340-345.
4. Assumpcao, F., Vinicius de Melo, G., Thomaz-Soccol, V., Kumar, S., Binder, M., Porto de Souza, V., Soccol, C., (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation. A review. *Food microbiology*. 66, 86-95.
5. Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., Silva, R. C. da, et al. (2020). Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy*, 1(3), 202–232.
6. Banan-Mwine, E., Lee, B., (2015). New perspectives on probiotics in health and disease. *Food Science and Human Wellness*. 4(2), 56-65.
7. Beldarraín, T., González, A., & Kala, D. (2017). Métodos de identificación de cepas productoras de ácido láctico aisladas a partir de matrices alimentarias. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 21(1).
8. Bustos A., Fadda, S; Font de Valdez, G; Raya, R; Taranto, MP. (2017) Mecanismos involucrados en la resistencia a bilis en *Lactobacillus reuteri*, una bacteria probiótica. Universidad de San Pablo. Instituto de Desarrollo e Innovación Tecnológica; IDITeC. 6 (10), 5-20.

9. Carasi, P., Díaz, M., Racedo, S. M., De Antoni, G., Urdaci, M. C., Serradell, M. (2014). Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. *BioMed Research International*. 208-974.
10. Carvajal-Jiménez O. (2018). Infección por bacterias del género: un patógeno infrecuente. *Crónicas científicas*. (11), 14-21.
11. Castañeda C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil. *Revista Cubana de Pediatría*. 90(1), 94-110.
12. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. (2014) Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 61(1), 28-40.
13. Chen M., Tang H., Chiang M. (2017). Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefiranoferiens* M1. *Food Microbiology*. (66), 20-27.
14. Chi-Chung C., Chih-Cheng L., Hui-Ling H., Yu-Ting S., Yu-Hsin C., Han-Siong T., Shyh-Ren C., Yin-Ching C., Ying-Chen L., Hung-Jeen T. (2021). Antimicrobial ability and mechanism analysis of *Lactobacillus* species against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. (54), 447-456.
15. Collado, M. (2004). Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis de doctorado. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Departamento de biotecnología.
16. Concha, S.S. (2011). Determinación de la presencia de *Staphylococcus* spp en helados provenientes de fábricas artesanales de chillán. Tesis de licenciatura. Chile: Universidad Concepción. Facultad de Medicina veterinaria.

17. Dallas D., Citerne F., Tian T., Silva V., Kalanetra K. Frese S. Barile D. (2016). Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. *Food Chemistry*. Volume (197) 273-284.
18. Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. (2020). Programa control de calidad de muestras de ADN y ARN. Universidad de Salamanca.
19. Díaz G., Wacher C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 1(2), 30-40.
20. Dimidi, E., Cox, R., Rossi, M., Whelan, K. (2019). Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients*. 11(8), 1806.
21. FAO/OMS. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London-Ontario. 2-8.
22. FAO. (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO alimentación y nutrición. Roma. 1-13.
23. Farnworth, E. R. (2005). Kefir a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. (2), 1–17.
24. Ferrari A., Vinderola G., Weill R. (2020). Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura. Primera edición. Buenos Aires. 17-408.
25. Frengova, G., Simova, E., Beshkova, D., Simov, Z. (2002). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Z. Naturforsch* 57: 805-810.

26. Gálvez-Iriqui A., Plascencia-Jatomea M. (2020). Lisozimas: características, mecanismo de acción y aplicaciones tecnológicas en el control de microorganismos patógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 38 (3).
27. Ganguly, N., Bhattacharya, S., Sesikeran, B., Nair, G., Ramakrishna, B. et al., (2011). ICMR-DBT Guidelines for evaluation of probiotics in food. *Indian Journal of Medical Research*. 134 (1). 22-25.
28. Gao, X., Li, B., (2016). Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. *Cogent Food and Agriculture*. (2) 1-10.
29. Garcao, T., (2014). Análisis fenotípico, genómico y bioinformático de los elementos genéticos asociados a resistencia a antibióticos y biocidas en enterobacterias. Tesis doctoral. Universidad Complutense. Madrid.
30. García, M., Quintero, R., López-Munguía, A., (2004). *Biotecnología Alimentaria*. Ciudad de México: editorial LIMUSA.
31. Ghoshal, U. (2017). Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Other Intestinal Disorders. *Gastroenterology Clinic of North America*. 46(1), 103-120.
32. Guarner, F., Schaafsma, G. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. (39) 237-288.
33. Guarner, F., Sanders, M., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J. (2017). Probióticos y prebióticos. *Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología*.
34. González-Martínez, B., Gómez-Treviño, M., Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 4(2);

35. Gutiérrez, E., (2015). Detección de lactobacilos aislados del pulque con capacidad probiótica. Tesis de licenciatura. Facultad de química.
36. Holz C., Benning J., Schaudt M., Heilmann A., Schultchen J., Goelling D., Lang C. (2016). Novel bioactive from *Lactobacillus brevis* DSM17250 to stimulate the growth of *Staphylococcus epidermidis*: a pilot study. *Beneficial Microbes*; 8(1): 121-131.
37. Hurtado-Romero, A., Del Toro-Barbosa, M., Gradilla-Hernández, M., García-Amezquita, L., García-Cayuela, T. (2021). Probiotic properties, prebiotic fermentability and GABA-producing capacity of microorganismos isolated from mexican milk kefir grains: a clustering evaluation for functional dairy food applications. *Foods*.10: 2275.
38. Icaza-Chávez (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*. 2013; 78 (4): 240-248.
39. Jay J., Loessner M., Golden D., (2005). *Modern Food Microbiology*. (7^a). Estados Unidos de América; Editorial Springer.
40. Juzgado R. (2018). Estudio de la comunidad microbiana del kéfir tradicional y aislamiento de microorganismos con actividad microbiana. Trabajo de fin de grado. Universidad de Jaén. Facultad de ciencias experimentales. 1-34.
41. Kesekas, H., Gürsoy, O., Özbas., H. (2017). Capítulo 14. Kefir. *Fermented foods in health and disease prevention*. Academic Press. 339-361.
42. Khaneghah A., Abhari K., Es I., Soares M., Oliveira R., Hosseini H., Rezaei M., Balthazar C., Silva R., Cruz A., Ranadheera C., SantÁna A. (2020). Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: review. *Trends in Food Science & Technology*. (95) 205-218.
43. Leite, A., Miguel, M., Peixoto, R., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V., Mayo, B., Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria

- strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*. (98)6, 3622-3632.
44. Lemus D., Maniscalchi T., Hassoun M., Vizcaya H. (2008). Estafilococos oxacilino resistentes en queso blanco fabricado en el estado Anzoátegui, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 28(1), 48-54.
45. Likotrafiti E., Valavani P., Argiriou A., Rhoades J. (2015). *In vitro* evaluation of potencial antimicrobial synbiotics using *Lactobacillus kefir* isolated from kefir grains. *International Dairy Journal*. (45) 23-30.
46. Limón V., (2018). Tipificación e identificación de bacilos lácticos aislados del pulque. Tesis de licenciatura. UNAM-Facultad de química.
47. Londero, A. (2012). Alimentos funcionales: obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kéfir. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la plata.
48. Lopitz-Otsoa F., Rementeria A., Elguezar N., Garaizar J. (2006). Kefir; A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*. (23), 67-74.
49. Lu, M., Wang, X., Sun, G., Qin, B., Xiao, J., Yan, S., Wang, Y. (2014). Fine structure of Tibetan kefir grains and their yeast distribution, diversity, and shift. *PLOS One*. (6) 9-30.
50. Mago Y., Sanabria N., Cova A., Alvarado C., Durán L. (2015). Maduración de Queso de cabra con cepa autóctona de *Leuconostoc mesenteroides* aislada de queso artesanal. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV*. 56(1),3-9.

51. Mateos P. (2018). Viabilidad y desarrollo de *Staphylococcus* en diferentes alimentos que contienen huevo. Tesis de maestría. Universidad de Oviedo. España.
52. Mejía A., Chacón Z., Guerrero B., Otoniel J., López G., (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*: caracterización *in vitro* como potenciales probióticas. Revista Científica. 16 (2), 178-185.
53. Mendoza, M., (2005). Importancia de la identificación de levaduras. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 25 (1).
54. Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., Ramírez-Cárdenas., L. (2014). Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. ACI Avances En Ciencias E Ingenierías. 6(1), 60-66.
55. Ostadrahimi A, Taghizadeh A, Mobasseri M, Farrin N, Payahoo L, Gheshlaghi ZB, et al. (2015). Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. Iranian Journal of Public Health. 44:228–37.
56. Parra R., (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. (8)1, 93-105.
57. Peluzio, M, Dias, M., Martinez, J., Milagro, F. (2021). Kefir and intestinal microbiota modulation: implications in human health. Frontiers in Nutrition. (22), 8.
58. Peñaflor, N., García, A. (2007). Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
59. Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: composition,

microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*. (6), 1177.

60. Quintero-Salazar, B., Bernáldez, A., Dublán-García O., Barrera V., Favila, H. (2012). Consumo y conocimiento actual de una bebida fermentada tradicional en Ixtapan del Oro, México: la sambumbia. *Alteridades*. 22(44), 115-129.
61. Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Armando, J., Romero, F., (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en salud. *Revista Fuentes*. 7, 1-16.
62. Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, E., Aranda-Ibáñez, F., Izquierdo-Reyes, F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y Ciencia*. 25(2) 159-171.
63. Rodicio M., Mendoza M., (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S. Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología. *Enfermedades e Infecciones en Microbiología Clínica*. 22(4) 238-245.
64. Rodríguez-Figueroa, J., Noriega-Rodríguez, J., Lucero-Acuña, A., & Tejeda-Mansir, A. (2017). Avances en el estudio de la bioactividad multifuncional del kéfir. *Interciencia*, 42(6), 347-354.
65. Rodríguez, J. M., Sobrino, O. J., Marcos, A., Collado, M. C., Pérez-Martínez, G., Martínez-Cuesta, M. C., Peláez, C., & Requena, T.(2013). ¿Existe una relación entre la microbiota intestinal, el consumo de probióticos y la modulación del peso corporal. *Nutrición Hospitalaria*. (28)1, 3-12.

66. Rosa, D., Grześkowiak, M., Ferreira, C., Fonseca, A., Reis, S., Dias M., Siqueira, N., Silva, L., Neves, C., Oliveira, L., Machado, A., Peluzio, M. (2016). Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in an animal model of metabolic syndrome. *Food and Function* .7(8): 3390-401.
67. Rout K., Jayanta K., Sushanto G., Yooheon P., Han-Seung S., Gitishree D., (2018). Benefaction of probiotics for human health: a review. *Journal of Food and Drug Analysis*. (26), 927-939.
68. Rondon L., Añez Z., Salvatierra H., Meneses R., Rodriguez M.(2015). Probióticos: generalidades. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*. 78(4), 123-128.
69. Rosetti, L., (2016). Bacterias lácteas. Identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) por biología molecular. Cuaderno tecnológico N°37. INTI. Unión Europea.
70. Salas-Sánchez, S., Valadez-Moctezuma E., (2014). Caracterización e identificación molecular de bacterias aisladas de kefir. *Agro productividad*. 12-20.
71. Salinas, D., (2012). Efecto del uso de lisozima sobre las características químicas, físicas y sensoriales de un vino carmenere sometido a guarda con uso de microoxigenación. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile. Facultad de ciencias agronómicas.
72. Sánchez M., Ruiz, M., Morales M. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Ars Pharmaceutica*. 56(1), 45-59.
73. Sarkar, S. (2008). Biotechnological innovations in kefir production: A review. *British Food Journal*. (110), 283–295.

74. Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, Ts., Frengova, G., Spasov, Z., (2002). Lactic acid bacteria and yeast in kefir grains and kefir them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. (28). 1-6.
75. Song, M., Yun, B., Moon, J. H., Park, D. J., Lim, K., & Oh, S. (2015). Characterization of Selected *Lactobacillus* Strains for Use as Probiotics. *Korean journal for food science of animal resources*, 35(4), 551–556.
76. Tellez A., (2017). Estudio del potencial probiótico de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04. Tesis de maestría. Universidad Veracruzana.
77. Tenorio-Salgado, S., Castelán-Sánchez, H.G., Dávila-Ramos, S., Huerta-Saquero, A., Rodríguez-Morales, S., Merino-Pérez, E., Roa de la Fuente, L.F., Solis-Pereira, S.E., Pérez-Rueda, E. and Lizama-Uc, G. (2021), Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. *Microbiology Open*, 10: e1183.
78. Toscano M., De Grandi R., Leonardo V., Mattina R., Drago L. (2017). Ability of *Lactobacillus Kefiri* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. *Digestive and liver disease*. 3 (49), 261-217.
79. Valdovinos, M., Montijo, E., Abreu, A., Heller, S., González-Garay, A., Bacarreza, D., Bielsa-Fernández, A., Bojórquez-Ramos, M., Bosques-Padilla, F., Burguete-García, A., Carmona-Sánchez, R., Consuelo-Sánchez, A., Coss-Adame, E., Chávez-Barrera, J., Ariño, M., Flores-Calderón, J., Gómez-Escudero, O., González-Huezo, M., Icaza-Chávez, M., Larrosa-Haro, M. Morales-Arámbula, C. Murata, J.A. Ramírez-Mayans, J.M. Remes-Troche, T. Rizo-Robles, M. Peláez-Luna, E.M. Toro-Monjaraz, A. Torre, M.E. Urquidí-Rivera, R. Vázquez, J.K. Yamamoto-Furusho, F. Guarner. (2017). Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Revista de Gastroenterología de México*. 82 (2), 156-178.

80. Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*.
81. Vázquez M., (2015). Identificación molecular y visualización del consorcio microbiano del kéfir de origen mexicano. Tesis de licenciatura. Facultad de química. Universidad Autónoma de Querétaro.
82. Vizcaíno, Ricnia, Macias-Tomei, Coromoto, Márquez S, Julio C, Morales, Anet, & Torres, Noema. (2016). Usos clínicos de los probióticos. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 79(1), 029-040.
83. Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D. y Lane D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. (173),697-703
84. Xin, G., Li, B., (2016). Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: a review. *Cogent Food & Agriculture* 2: 1-10.
85. Yépez, F., (2016). Evaluación de cinco especies de *Lactobacillus* spp., como agentes biocontrol y actividad promotora del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*).
86. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., O'Toole, P., Pot B, Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G., Gänzle, M., 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70(4), 2782-2858.
87. Zheng, Y., Lu, Y., Wang, J., Yang, L., Pan, C., & Huang, Y. (2013). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. *PLOS ONE*, 8(7).

88. Zhou J, Liu X, Jiang H, Dong M. (2009) Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 26(8): 770-5.

12. Anexos.

ANEXO 1. Instrucciones del kit Roche de extracción de ADN

1. A un microtubo de centrifuga libre de nucleasas de 1.5 mL: agregar 200 μ l de cultivo microbiano de bacterias. Centrifugar por 5 min a 3 000 x g. Resuspender el pellet celular en 200 μ l de disolución isotónica
2. Agregar e incubar 5 μ l de lisozima (10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl, pH 8) e incubar 15 minutos a 37°C)
3. Al material de muestra: Agregar 200 μ l de buffer de unión (tubo 2). Agregar 40 μ l de proteinasa K reconstituida. Mezclar inmediatamente e incubar por 10 min a +70°C
4. Agregar 100 μ l de isopropanol y mezclar bien
5. Ensamblar un tubo de filtración de alta pureza dentro de un tubo de recolección. Pipetear el líquido por las dentro del filtro del tubo. Insertar completamente el tubo de filtración de alta pureza dentro de la centrifuga y centrifugar 1 min x 8000 x g.

Lavado y elución

Lavado

1. Remover el tubo de filtración del tubo de recolección. Descartar el sobrenadante y el tubo de recolección. Ensamblar el filtro dentro de un nuevo tubo de recolección. Agregar 500 μ l de buffer de eliminación de inhibidores dentro del tubo de filtración. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
2. Remover el tubo de filtración del tubo de recolección. Descartar el sobrenadante y el tubo de recolección. Ensamblar el filtro dentro de un nuevo tubo de recolección Agregar 500 μ l de buffer de lavado dentro del tubo de filtración. Centrifugar 1 min a 8,000 x g.
3. Remover el tubo de filtración del tubo de recolección. Eliminar el sobrenadante y el tubo de recolección. Ensamblar el filtro dentro de un nuevo tubo de recolección. Agregar 500 μ l de buffer de lavado dentro del tubo de filtración. Centrifugar 1 min a 8,000 x g.

- Después de eliminar el líquido: Centrifugar todo el tubo de filtración de alta pureza por 10s a máxima velocidad. Tirar el tubo de recolección.

Para eluir el DNA

- Insertar el tubo con el filtro dentro de un microtubo esteril de 1.5 mL.
Agregar 200 μ l el buffer de elución previamente calentada a la parte superior del tubo de filtración. Centrifugar el tubo por 1 min a 8.000 x g.
- El microtubo de centrifuga ahora contiene el DNA eluido. Conservar de 2°C a 8°C.

Tabla 20. Disoluciones empleadas para la extracción de DNA.

Vial	Sustancia	Contenido/Función
1 (Blanco)	Buffer de lisis celular	20 ml 4 M urea, 200mM Tris, 20mM NaCl, 200mM EDTA, pH 7.4 (+25°C)
2 (verde)	Buffer de unión	20 ml 6 M guanidina-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% TRITON X-100 (v/v), pH 4.4 (+25°C)
3 (rosa)	Proteinasa K, PCR recombinante	Liofilizado Para la lisis de la muestra e inactivación de DNasa endógena
4a (Negro)	Buffer de eliminación de inhibidores	33 ml, agregar 20 ml de etanol puro 5M guanidina- HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (+25°C) (concentración final después de agregar el etanol)
4 (Azul)	Buffer de lavado	20 ml, agregar 80 ml de alcohol puro 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25°C) (concentración final después de agregar alcohol)
5 (Incoloro)	Buffer de elución	40 ml 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (+25°C)

ANEXO 2

Tabla 21. Características de los primers universales Fd1 y Rd1 empleados en la amplificación del gen que codifica para la región ARNr 16S.

Primer	Concentración
Fd1	291.39 μM
Rd1	331.28 μM

ANEXO 3

Tabla 22. Protocolo para purificación del gen ribosomal 16S con Thermo Scientific GeneJet PCR Purification kit. Protocolo A. Purificación de ADN utilizando una centrifuga.

Paso	Procedimiento
1	Agregar Buffer de unión 1:1 para completar la mezcla de PCR (Ejemplo para cada 100 μL de mezcla de reacción, agregar 100 μL de buffer de unión). Mezcla minuciosamente. Revisa el color de la disolución. Un color amarillo indica un pH óptimo para la unión del DNA. Si el color de la disolución es anaranjado o violeta agrega 10 μL de acetato de sodio 3 M, disolución pH 5.2 y mezcla. El color de la mezcla se volverá amarilla.
2 Para DNA $\leq 500bp$	Opcional: si los fragmentos de ADN son, agregar en una proporción 1:2 del volumen de isopropanol 100% (Ejemplo 100 μL de isopropanol se deberán agregar a 100 μL de mezcla de PCR combinada con 100 μL de buffer de unión. Mezcla minuciosamente. Nota: si la mezcla de PCR contiene dímeros de primers, se recomienda una purificación sin isopropanol. Sin embargo, el rendimiento del fragmento de ADN de interés será más bajo.

3	<p>Transfiere 800 μL de la disolución del paso 1 (U opcional paso 2) a la columna de purificación GeneJET. Centrifugar de 30 a 60 s. Desecha el sobrenadante.</p> <p>Nota: si el total del volumen excede los 800 μL la disolución deberá agregarse en la columna por etapas. Después de la adición de 800 de disolución, centrifugar la columna de 30-60 s y desecha el sobrenadante. Repite hasta que el total de la disolución haya sido agregada a la columna de membrana. Cierra la bolsa con las columnas de purificación GeneJet minuciosamente después de usarse.</p>
4	<p>Agregar 700 μL del buffer de lavado (diluir con etanol como se describe en el paso 3) a la columna de purificación GeneJet. Centrifugar por 30-60 s. Desecha el sobrenadante y regresa la columna de purificación a la bolsa de la colección de tubos.</p>
5	<p>Centrifuga la columna vacía GeneJet por 1 minuto adicional para completar la remoción de cualquier residuo de buffer.</p> <p>Nota. Este paso es esencial debido a que el etanol residual en la muestra de ADN puede inhibir las reacciones subsecuentes.</p>

6	<p>Transferir la columna de purificación GeneJet a un microtubo de centrifuga de 1.5 mL limpio (No incluido).</p> <p>Agregar 50 μL del buffer de elución al centro de la membrana de la columna de purificación GeneJet y centrifugar por 1 min.</p> <p>Nota: para menor cantidad de ADN el volumen de elución puede ser reducido para incrementar la concentración de ADN. Un volumen de elución entre 20-50 no reduce significativamente el rendimiento del ADN. Sin embargo, el volumen de elución menor a 10 μL no es recomendable.</p> <p>Si los fragmentos de ADN son >10 kb, precalienta el buffer de elución a 65°C antes de aplicarlo a la columna. Si el volumen de elución es de 10 μL y la cantidad de ADN \geq5 μg, incubar la columna por 1 min a temperatura ambiente antes de centrifugar.</p>
7	<p>Desecha la columna de purificación GeneJet y guarda el DNA purificado a -20° C.</p>

ANEXO 3

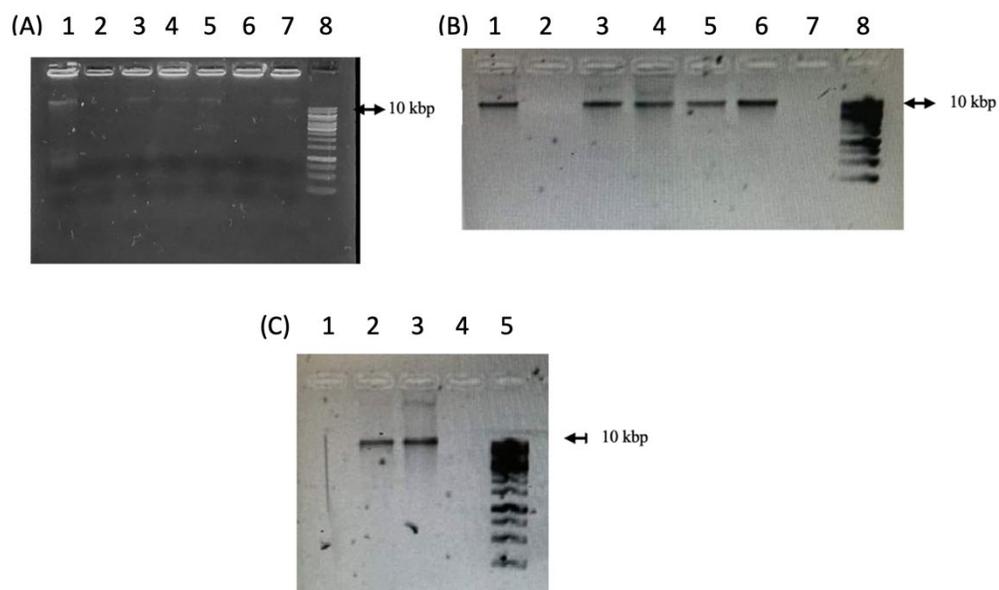


Figura 14. ADN cromosomal bacilos.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%p/v, 100V, 80^a y 4 μ L de bromuro de etidio 0.04%. Gel (A) Carril 1. Cepa 8. Carril 3. Cepa 26.1. Carril 4. Cepa 26.2. Carril 5. Cepa 42. Carril 7. Cepa 35.2. Gel (B) Carril 1. Cepa 22. Carril 3. Cepa 35. Carril 4. Cepa 37. Carril 5. Cepa 52. Carril 6. Cepa 40c. Carril 8. Cepa 43c. Gel (C) Carril 2. Cepa 42. Carril 3. Cepa 51. Gel (A) Carril 8, Gel (B). Carril 8. Gel (C). Carril 5. Marcador de peso molecular *O'Gen Ruler*^R 1 kbp de Thermo *Scientific*TM

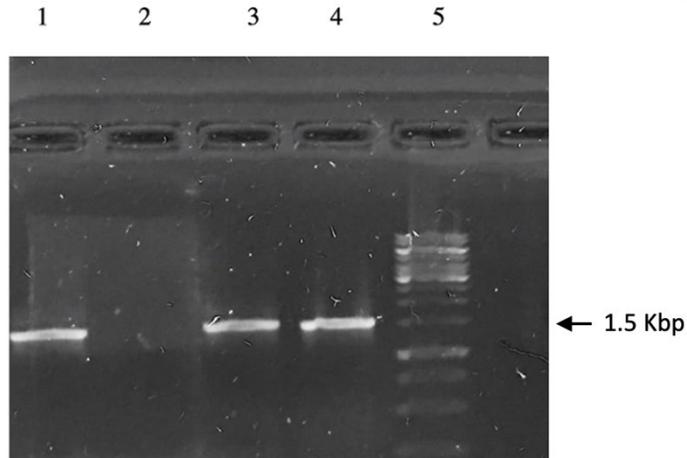


Figura 15. Amplificación del gen que codifica para la región ARNr 16S por técnica de PCR.

Electroforesis en gel de agarosa 1% p/v, 100 V, 80 A y 4 μ l de bromuro de etidio 0.04%. Carril 1.Cepa 9c. Carril 3. Cepa 8.1. Carril 4. Cepa 51. Carril 5. Marcador de peso molecular *O'Gen Ruler^R* 1 kbp de Thermo *ScientificTM*.