

Informe final de servicio social

Aislamiento de microorganismos de interés para la salud humana utilizando Ichip

Nombre: Alan Edgar González Téllez

Matrícula: 2183069910

Laboratorio de biotecnología N-104, UAM Xochimilco

Periodo de realización: del 14 de abril del 2022 al 10 de abril del 2023

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Programa correspondiente: Obtención de materias primas, principios
activos, medicamentos y productos biológicos

Asesor interno: Lino Mayorga Reyes; número económico: 8491

Asesor externo: Raquel González Vázquez; cédula profesional:

09165459

Resumen

La búsqueda y obtención de nuevos microorganismos de interés para la salud humana implica el desarrollo de nuevas tecnologías que nos permitan lograr una mayor eficiencia en el aislamiento de estos microorganismos que han demostrado importantes cualidades beneficiosas para la salud y que con las técnicas convencionales son difíciles de obtener. El objetivo de este trabajo fue aislar, identificar, y caracterizar fenotípicamente microorganismos de interés para la salud a partir de muestras de materia fecal.

La metodología de este estudio consistió en la identificación de bacterias de interés para la salud como *A. muciniphila*, esto mediante PCR de punto final, utilizando oligonucleótidos AM1. Posteriormente se implementó una novedosa tecnología llama Ichip, que consiste en un conjunto de tres placas planas que contienen múltiples orificios (estos orificios son denominados “pozos” y en cada uno de estos fue sembrada una dilución de la muestra) que coinciden entre ellos; a las cepas obtenidas se les realizaron pruebas de: identificación por secuenciación del 16s, sensibilidad a los antibióticos, hemólisis, tolerancia a pH estomacal y crecimiento de los diferentes microorganismos aislados en diferentes carbohidratos.

Utilizando oligonucleótidos para *Akkermansia muciniphila*, se amplificó un fragmento de 350 a 400 pb, por lo que podemos decir que probablemente esta bacteria estaba presente en la muestra, sin embargo, no fue posible obtenerla en este proceso. Se piensa que esto es debido a su baja proporción dentro de la muestra, en los siguientes procesos se recomienda tomar medidas para aumentar la concentración de esta y disminuir la de otras cepas de menor interés, por ejemplo, mejorar las condiciones de la toma de muestra, utilizar antibióticos que han demostrado disminuir las poblaciones de las cepas de menor interés.

Las cinco cepas aisladas de acuerdo con la secuenciación del producto amplificado por PCR punto final, utilizando oligonucleótidos universales y realizando un análisis informático fueron: *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus clausii* y *Bacillus cereus*; en su mayoría fueron resistentes a ampicilina, sensibles a gentamicina y no fueron hemolíticas. Todas las cepas son resistentes a las sales biliares, sin embargo, su tolerancia a pH de 1.5 a 3 disminuyó su sobrevivencia notablemente a medida que disminuía el pH. En cuanto a las que pudieran tener un potencial probiótico se tendría que pensar en un vehículo que les permita soportar estas condiciones mientras se encuentran sometidos al estrés estomacal. Las cinco bacterias aisladas crecieron en glucosa, xilosa, inulina, celobiosa, rafinosa y CMC durante 22 h.

Conclusión, el Ichip es una tecnología innovadora muy eficaz para el aislamiento de bacterias que son difíciles de obtener por métodos convencionales. Sin embargo, es necesario complementar esta con otros métodos, condiciones ambientales y medios de cultivo que permitan mejorar las proporciones de las poblaciones de bacterias de interés. Algunas de las

cepas obtenidas, como el *Bacillus clausii* podrían presentar una utilidad probiótica, sin embargo, se requiere de mayor investigación para mejorar sus condiciones en que llega formar parte de la microbiota.

Palabras clave: Ichip, *Akkermansia muciniphila*, Aislamiento.

Tabla de contenido

<i>Resumen</i>	2
<i>Introducción</i>	4
<i>Objetivos</i>	4
<i>Hipótesis</i>	5
<i>Marco teórico</i>	5
Microbiota intestinal	5
Técnica de aislamiento bacteriano (Ichip)	5
<i>A. muciniphila</i>	6
Probióticos de nueva generación	7
<i>Metodología</i>	8
Identificación de microorganismos de interés para la salud en muestras de materia fecal	8
Aislamiento de los microorganismos de interés	8
Caracterización de los microorganismos aislados	10
<i>Resultados</i>	11
Identificación de microorganismos de interés para la salud en muestras de materia fecal	11
Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados	16
<i>Discusión de resultados</i>	27
<i>Conclusiones</i>	31
<i>Referencias</i>	32

Introducción

Desde finales del siglo XX y lo que va del XXI, la conformación de la microbiota intestinal humana ha sufrido modificaciones principalmente relacionadas al estilo de vida o al medio ambiente (Castañeda Guillot, 2018). Estos cambios cualitativos y cuantitativos en la microbiota intestinal desencadenan, no solo problemas gastrointestinales, sino también extragastrointestinales, como lo pueden ser enfermedades alérgicas, inflamatorias, neurodegenerativas, metabólicas y autoinmunes (Harris, 2019).

A la luz de las evidencias proporcionadas en estas últimas décadas sobre la relación bidireccional en la microbiota intestinal-salud humana, cada vez más investigaciones se centran en la clasificación de las poblaciones microbianas y de su posible aplicación terapéutica (Fan & Pedersen, 2021). Con este fin se han impulsado nuevas tecnologías de aislamiento y cultivo de microorganismos, en la presente investigación se abordará la tecnología del chip para aislamiento y cultivo de bacterias. Esta tecnología nos permitirá romper con las restricciones de las cajas de Petri y con ello acceder a bacterias menos abundantes o difíciles de cultivar; de esta manera, se abre paso al aislamiento de microorganismos con necesidades nutricionales exigentes para su caracterización bioquímica, molecular y de su posible efecto benéfico sobre la salud y así considerarlos para incluir en el desarrollo de productos biotecnológicos y así ofrecer un paradigma distinto en cuanto a la manera de modular la salud humana.

Hoy en día se cuenta con suficiente evidencia científica que demuestran los beneficios de los probióticos para la salud de los animales (Wilkins & Sequoia, 2017). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud en 2002, los probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio para la salud cuando se consumen en cantidades adecuadas (Kim et al., 2019). Ayudado de los avances tecnológicos se pueden desarrollar múltiples de estos productos biotecnológicos que puedan funcionar como una efectiva terapia ante las múltiples patologías que siguen afectando al ser humano y que hasta el momento no se tiene un control efectivo.

Objetivos

Objetivo general: Aislar, identificar y caracterizar fenotípicamente microorganismos de interés para la salud, utilizando Ichip.

Objetivos particulares:

- Identificar por métodos moleculares la presencia de microorganismos de interés para la salud en muestras de materia fecal.
- Aislar microorganismos utilizando Ichip.
- Identificación taxonómica de los microorganismos aislados.

Hipótesis

La técnica de Ichip permitirá aislar, identificar y caracterizar fenotípicamente microorganismos con interés para la salud a partir de materia fecal.

Marco teórico

Microbiota intestinal

La microbiota intestinal trata de un ecosistema compacto y diverso que contiene entre mil y cinco mil especies diferentes, de las cuales aproximadamente el 99% pertenecen a los filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacterias, Actinobacteria y Verrucomicrobia (Generoso et al., 2020). Este complejo sistema comprende más de 100 billones de microorganismos que habitan el intestino delgado y grueso (Long-Smith et al., 2020). Existen, metabolitos derivados de este sistema como ácidos grasos de cadena corta (acetato, el propionato y el butirato) y triptófano, que incluyen el ácido indol-3-propiónico, el ácido indol-3-acetaldehído, el ácido indol acrílico y el indol-3-aldehído (Makki et al., 2018). Los ácidos grasos de cadena corta controlan la producción de, anticuerpos, citocinas y contribuyen al mantenimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal, además, se ha demostrado que existen niveles bajos de ácidos grasos de cadena corta en pacientes con enfermedades que disminuyen la población de la microbiota intestinal (Agudelo-Ochoa et al., 2016).

Técnica de aislamiento bacteriano (Ichip)

Con el tiempo y el progreso de la tecnología se han modificado las técnicas de cultivo y aislamiento bacteriano, con la finalidad de acceder a aquellos microorganismos que son menos abundantes, que tienen exigencias nutricionales muy apegadas al ambiente en el que existen y cuya relevancia resulta prometedora para obtener beneficios por ejemplo en la salud de los seres humanos. Por este motivo se ha desarrollado el chip de aislamiento (Ichip), el cual puede utilizarse para el crecimiento y aislamiento de bacterias difíciles de cultivar en el laboratorio (Lodhi et al., 2018). El ichip simula un entorno natural por medio de pequeños poros (Figura 1a y 1b), funciona como un medio selectivo sólido o caldo especialmente anaerobias estrictas (Arias & Murray, 2015).

En esta técnica las bacterias son inoculadas, y estas después crecen según su tiempo de generación utilizando los nutrientes, así como otros factores ambientales que se les proporcionan en el laboratorio (Bein et al., 2018), de esta manera se puede controlar aún de una manera más selectiva los microorganismos que podrán proliferar en el medio.

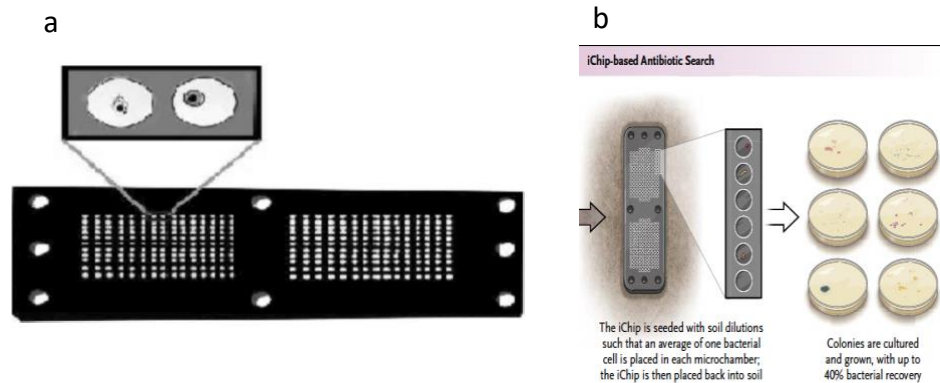


Figura 1. a) El chip de aislamiento contiene muchos orificios pasantes que se cubren con una membrana en ambos lados. Esta es la placa central que contiene las bacterias y que está cubierta por una placa superior y otra inferior sujetas con tornillos (Lodhi et al., 2018). b) Después de la incubación los pocillos son depositados en un agar de crecimiento.

A. muciniphila

Se trata de una bacteria simbiote del intestino humano, es una bacteria de forma ovalada, anaerobia estricta (aunque en algunas investigaciones se notó que puede tolerar niveles ligeros de oxígeno (Ouwerkerk et al., 2016), Gram negativa, no móvil (Figura 2) (Cheng & Xie, 2021). Es el único miembro representante del filo Verrucomicrobia en el intestino humano y posee una alta diversidad genética. Aunque *A. muciniphila* es abundante en la capa de la mucosa intestinal del huésped, se encuentra con mayor abundancia en el ciego (Zhang et al., 2019). Su población está indiscriminadamente en adultos y bebés sanos, en una proporción entre el 1 y el 4 %; sin embargo, se encuentra gradualmente disminuida en adultos mayores (Depommier et al., 2019) Una de las razones por las que se busca el aislamiento de esta bacteria es que revierte la obesidad y la resistencia a la insulina (Amaral Montesino et al., 2021)

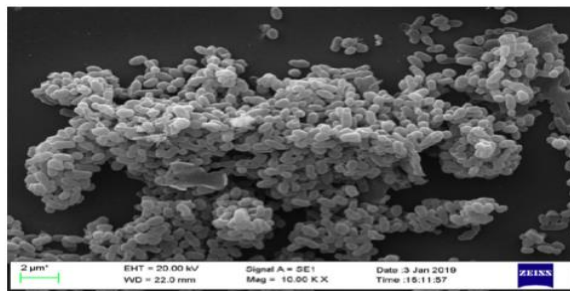


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de *A. muciniphila*.
(Zhang et al., 2019).

Varias líneas de evidencia indican el impacto benéfico de *A. muciniphila* en la prevención y mejora de los trastornos metabólicos, la obesidad y sus comorbilidades. Recientemente, en un estudio exploratorio, se ha encontrado que, en comparación con el placebo, *A. muciniphila* mejora significativamente la sensibilidad a la insulina y genera una reducción de la insulinemia y el colesterol total plasmático en voluntarios humanos con sobrepeso y obesidad. También en modelos animales, previene el aumento de peso corporal, disminuye la ingesta calórica y reduce el tejido adiposo (Yang et al., 2020).

Probióticos de nueva generación

Los probióticos son una estrategia para modular la estructura de la microbiota intestinal, en este mismo sentido los probióticos de próxima generación se consideran herramientas preventivas y terapéuticas (Suez et al., 2020). Nuevas investigaciones revelan potenciales nuevas generaciones de probióticos, entre ellos se encuentran *Prevotella copri* y *Christensenella minuta*, que controlan la resistencia a la insulina, *Parabacteroides goldsteinii*, *Faecalibacterium prausnitzii*, que protege a los ratones contra las enfermedades intestinales, y *Bacteroides fragilis*, que reduce la inflamación y muestra un efecto anticancerígeno (Chang et al., 2019).

Metodología

Identificación de microorganismos de interés para la salud en muestras de materia fecal

Obtención de muestras

Las muestras de materia fecal fueron obtenidas mediante una colecta séptica y transportadas en condiciones de refrigeración al laboratorio de biotecnología de la UAM-X para ser procesadas.

Extracción del ADN genómico

A partir de una muestra de 0.2 mg de materia fecal se realizó la extracción de ADN genómico utilizando el kit Ministool de Qiagen, siguiendo las instrucciones del proveedor. La integridad del material genético fue determinada en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X, utilizando un buffer de carga de la marca Novel Juice. Además, la concentración y pureza de este se determinó por utilizando el equipo Nanodrop (Thermo Scientific, USA).

Identificación de *A. muciniphila* por PCR punto final

La presencia de *A. muciniphila* en las muestras de materia fecal fue determinada a través de la amplificación del ADN genómico utilizando los oligonucleótidos AM1 (forward): CAG CAC GTG AAC GTG GGC AC y AM (reverse): CCT TGC GGT TGG CTT CAG AT (Collado et al., 2007) por PCR punto final. Utilizando las siguientes concentraciones: agua libre de DNAasas 21 μ L, oligonucleótido forward 1 μ L, oligonucleótido reverse 1 μ L, 25 μ L de One PCR ultra super mix y 2 μ L de ADN previamente extraído. Como blanco se utilizó la misma cantidad de los reactivos mencionados sin muestra de ADN y 23 μ L de agua libre de DNAasas. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo a 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 59 °C por 40 s y 72 °C por 30 s; un ciclo de 72 °C por 5min y un clico a 4 °C por 5 min.

Aislamiento de los microorganismos de interés

Tecnología Ichip

Una vez identificada la presencia del microorganismo de interés en la muestra de materia fecal, se procedió al aislamiento mediante la tecnología del Ichip. Este dispositivo está constituido por un conjunto de tres placas planas que contienen múltiples orificios que coinciden entre ellos. A las placas se les adicionó la quinta dilución de materia fecal, por lo que cada pozo quedó inoculado con una sola célula proveniente de la fuente de aislamiento. La placa central, de policarbonato, tiene en los extremos múltiples horadaciones (≤ 1 mm). Cada serie de múltiples orificios fueron cubiertos en ambos lados con filtros Millipore de 0.33 micras (sistema filtro-placa-filtro). Este sistema fue a su vez, cubierto en ambos lados

por placas de policarbonato que fijaron todo el sistema que consistió en cubierta externa-filtro-placa interna pozos-filtro-cubierta externa. Las cubiertas externas horadadas, permitieron la transferencia de los sustratos provenientes del medio de cultivo, en este caso heces que siguieron fermentado y los sustratos y los productos metabólicos de esta fermentación pasaron por los filtros y llegaron a cada célula atrapada en cada pozo, que, sin competencia por el uso de sustratos, crecieron. También, se incluyó una concentración conocida de sales biliares para tener no solo un sistema para células no cultivables sino también un medio de cultivo selectivo (Sherpa et al., 2015).

La matriz de soporte del IChip fue el medio de cultivo para los microorganismos aislados que consistió en (g/L): KH_2PO_4 0.4; Na_2HPO_4 0.53; NH_4Cl 0.3; NaCl 0.3; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0.1; CaCl_2 0.11; 1mL de solución ácida y 1mL de solución básica; resarzurina 5 mg; NaHCO_3 4; $\text{Na}_2\text{S}_7 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.25; 0.7 % v/v de líquido ruminal y 0.25 % de mucina gástrica tipo 3 y 1 mL de solución de vitaminas, estos tres últimos reactivos se agregaron después de esterilizar. La solución ácida estuvo formada por los siguientes reactivos (g/10mL): FeCl_3 0.1; H_3BO_4 0.003; ZnCl_2 0.0033; CuCl_2 0.00084; MnCl_2 0.0049; CoCl_2 0.0036; NiCl_2 0.00064; HCl (37 % pureza y densidad= 1.184 kg/L) 0.076 mL. La solución básica estuvo formada por (g/10 mL): Na_2SeO_3 0.1; NaWO_4 0.1; $\text{Na}_2 \text{MoO}_4$ 0.1; NaOH 10. La solución de vitaminas estuvo formada por (g/10 mL): biotina 0.0002; niacina 0.002; piridoxina 0.005; riboflavina 0.001; cianocobalamina 0.001; tiamina 0.002; ácido p-amino benzoico 0.001 ácido pantoténico 0.001.

Una vez cargada la matriz de soporte y el inóculo, el dispositivo fue inmerso en la misma materia fecal e incubado a 37 °C en una atmósfera anaerobia por 48 h. Posteriormente, el dispositivo fue desarmado y cada pocillo fue depositado en el medio de cultivo antes descrito, cada una de las cepas fue sembrada y propagada en un medio enriquecido, para su posterior almacenamiento y conservación bajo las siguientes condiciones: -20 °C en glicerol al 20 % (Sherpa et al., 2012; González-Vázquez et al., 2015).

Identificación taxonómica

Una vez purificadas las bacterias aisladas se utilizaron para extraer su ADN genómico, mismo que fue amplificado en PCR punto final utilizando los oligonucleótidos universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') Y 1491 R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), y las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo de 94 °C por 5 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 52 °C por 20 s y 68 °C por 40 s, un ciclo de 68 °C por 40 s y un ciclo final de 68 °C por 7 min. La amplificación fue confirmada utilizando un gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en la unidad de Biología molecular de la UAM Iztapalapa. El análisis genómico se realizó con las herramientas de alineamiento del NCBI.

Caracterización de los microorganismos aislados

Resistencia a sales biliares

Diluciones seriadas de un cultivo de 12 h de crecimiento de cada una de las cepas aisladas fueron sembradas en el agar del medio de cultivo utilizado para el aislamiento adicionado con CaCl_2 (0.15 g/L) y 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 % de glicocolato de sodio (sigma), glicodeoxicolato, taurocolato, taurodeoxicolato de sodio y bilis de buey (oxgal). Para comparar el crecimiento y la formación de un halo de precipitado se utilizó el medio de cultivo sin sales biliares. Todos los experimentos se incubaron a 37 °C durante 48 h en una cámara anaeróbica. Los resultados se expresaron como presencia o ausencia de crecimiento, y fueron realizados por triplicado.

Resistencia a los antibióticos

Fue determinada utilizando multidisco para bacterias Gram negativas (ID, México) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para comparar el perfil antibiótico de las cepas aisladas se determinó el perfil de *E. coli* ATCC 160211. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (González-Vázquez et al., 2015).

Prueba de hemólisis

Las cepas fueron incubadas durante 8 h en medio para el aislamiento antes de la prueba. Una colonia de cada cepa fue extendida sobre agar sangre e incubada durante 48 h a 37 °C en una atmósfera anaeróbica. La prueba se llevó a cabo por triplicado. *E. coli* ATCC 160211 fue utilizado como control positivo y *B. longum* como negativo (González-Vázquez et al., 2015).

Tolerancia al pH gástrico

La capacidad de los microorganismos aislados para sobrevivir al pH gástrico simulado se determinó de acuerdo con Olvera-Romero et al. (2018) y González-Vázquez et al. (2015). El pH gástrico simulado consistió en MRS esterilizado ajustado con HCL (1M) (J.T. Baker, EE. UU.) a pH 1.5, 2 y 3 utilizando un medidor de pH (Orion 410A+, Thermo Scientific, EE. UU.). La tolerancia al pH se determinó comparando el recuento de células (UFC/mL) antes y después de la exposición a la condición de estrés. Cada microorganismo fue sometido a los tres pH. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Crecimiento en glucosa, inulina, celobiosa, xilosa, rafinosa y carboximetil celulosa.

Se determinó las cinéticas de crecimiento de los microorganismos aislados utilizando glucosa, inulina, celobiosa, xilosa, rafinosa y carboximetil celulosa mediante una espectrofotometría a una D. O. a 520 nm. Para el procedimiento se utilizó una gradilla estéril con 96 pozos (12 columnas numeradas del 1 a las 12 y 8 filas, identificadas con las detrás de la “A” a la “H”) en los que se introdujo caldo mínimo que contenía (g/L) NaCl (2.2);

(NH₄)₂SO₄ (10); CaCl₂ (0.4); MgSO₄ 7H₂O (0.4); K₂HPO₄(0.72); extracto de levadura (0.01 %); carbohidrato (1%); pH7. El volumen de inóculo fue el necesario para que se presentara una absorbancia de 0.02 a 520 nm en 250 µL, que fue el volumen final de cada pocillo. Cada carbohidrato fue evaluado por triplicado. Como control se utilizó caldo con cada carbohidrato sin inóculo y caldo sin carbohidrato y con inóculo.

Resultados

Identificación de microorganismos de interés para la salud en muestras de materia fecal

Obtención de muestras

La muestra de materia fecal fue obtenida de un infante de 8 años cuyos padres aceptaron participar en el estudio y que previamente fueron informados y firmaron un consentimiento informado.

Extracción de ADN genómico a partir de materia Fecal

A partir de la materia fecal se extrajo ADN, su integridad se muestra en la Figura 3.

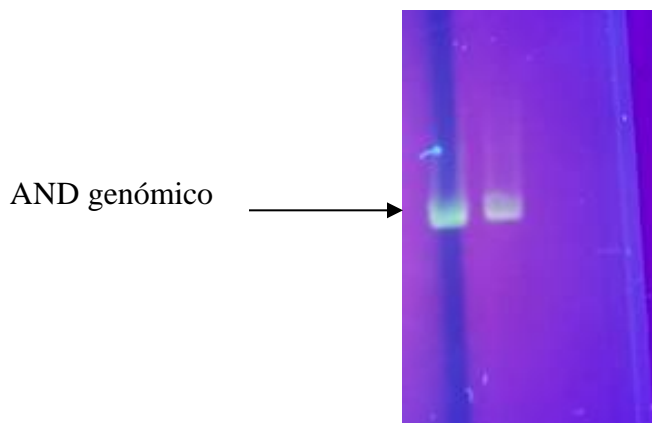


Figura 3. Extracción de ADN genómico de materia fecal.

Una vez confirmada la integridad del ADN extraído, se procedió a hacer un PCR de punto final con ADN genómico, con los oligonucleótidos AM1 y AM2, obteniendo un fragmento de 350-400 pb, lo que permitió pensar, probablemente que en dicha muestra había presencia de *Akkermansia muciniphila* (Figura 4).

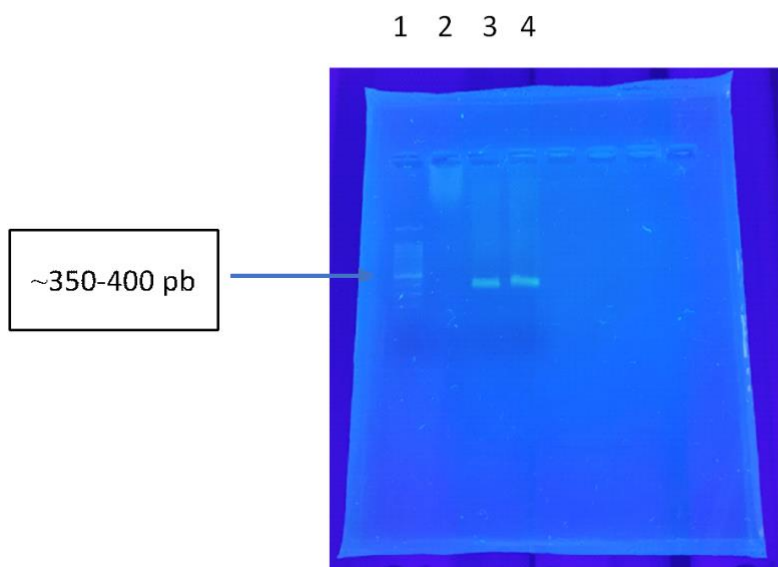


Figura 4. Fragmentos amplificados de ADNg por PCR. Carriles: 1) marcador de peso molecular de 100 pb; 2) blanco negativo; 3 y 4) productos amplificados del ADN con oligonucleótidos específicos para *A. muciniphila*

Aislamiento de microorganismos de interés utilizando Ichip

Se realizó el proceso de aislamiento de microorganismos a partir de una muestra de materia fecal, utilizando el Ichip y dejando en crecimiento en la misma materia fecal junto con medio de cultivo selectivo durante 15 días. Después del crecimiento y la purificación se obtuvieron cinco cepas principales, las cuales fueron identificadas con las letras “A”, “M”, “D”, “E” y “N”. Las cepas aisladas fueron observadas macro y microscópicamente, esta última observación se realizó después de teñirlas células mediante tinción de Gram, (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de la prueba de tinción de Gram de las cinco cepas.

CEPA	RESULTADO DEL GRAM
A	(+)
M	(-)
D	(+)
E	(+)
N	(+)

Identificación taxonómica

Tabla 2. identificación de las cepas obtenidas mediante secuenciación del 16S ARNr.

CEPA	IDENTIFICACIÓN	% DE IDENTIDAD
A	<i>Enterococcus faecium</i> strain ef332 chromosome, complete genome	99.91
M	<i>Escherichia coli</i> strain LP5-1 chromosome, complete genome	99.19
D	<i>Enterococcus faecalis</i> strain L143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
E	strain TNAUMS2 16S ribosomal RNA gene, partial <i>Bacillus clausii</i> sequence	100
N	<i>Bacillus cereus</i>	99.59

Las secuencias completas obtenidas para cada microorganismo se muestran a continuación:

Cepa A, *Enterococcus faecium*

AAGGGGGGGGTGCTATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTG
 CTCCACCGGAAAAAGAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCT
 GCCCATCAGAAGGGGATAACAACCTTGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAAT
 CAAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGG
 ACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATG
 CATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 CGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTT
 AGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAACCTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAG
 AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTAGGTGGCAAGC

GTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCTGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCTCCTGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGATACTGGGAAACTTGAA
TGCAGAAAACCATAGTGAAATTCCAAGTGAAGCATTGAAAGTGC GGACATAACC
GGGAGACCAACCCCGGTTTGGCCGCCGGCTCTTTTACACTGTATGGAACGTTTA
CCGCTCCAATAGAAAGCGCGATTAGACATTGTTGTTCTTCCACTAATATCACAC
CCATTTTTAGTCGCATAATAATGGAATTCCTTCCCTTGCCTATTTTTGCCCCCA
TTTATTCCCCTTCCCATTGAACCCTTCCC GGTTTAAGCCC GGGGGGCTTTCT
ACCTTCCAACGTTATCAAATACCGCCCCGGCGCCAGCCTGTAACCCCCCAACA
AGAACCCTGGAAAATCGGATGGCCCCCTAATTTATATTTGACGGGCCGGCT
GGGGGATTTAATTTTGACAGGGGGTGCTTTTTGGGTTAAACTCCCGACCAAAG
GGGAGGGGAAAAACGTTTTCTTTCTAATTCTTTTGT TTTGTGGTTGTTTTAAA
AAAGACAAGAGTTTTTTTTGCAAAATCGGGAAAAAACATTCTTTTTCCCCCGG
CGGGGGGGGGGTGGTGGGGGGTGGA AAC TTTACTTGTTCCTCATTGCGAGGA
AAAAAAAATCCATTTACACGTGTCGGGCGTGCGCCGCCCGCC

Cepa M, *Escherichia coli*

TGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGGCGGA
CGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAA
CGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC
TCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCT
CACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAA
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGTACTTT

Cepa D, *Enterococcus faecalis*

GGCTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGT
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGAT
CCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCG
AACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTG
TACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG

Cepa E, *Bacillus clausii*

TAGGTGGCGCAGCTATACATGCAGTCAGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCC
GGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTTAGACT
GGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCCTTTCTCCACCTG
GAGAGAGGGTCAAATATGGCTTCTGATTGCCTTATGATTTAATGGATGTTCTTC
CTATCTATAATAGATGGTCCCGTCGCGGTAATTATCTTAGTTGGGTCTGTAATG
GCTTACCAAGCACGATGATATGTAACATTAGCTGAGACACTACTCCCCCACC
CCGTAGACTCGAGATTTTTACCCATATTACGTA ACTCTCCGGCTAGTGTGCATA
ATCCTTACACGAGTGCAAGGCCAGTCTGGATTGATGAGTGCTTTTTGTGTTTGT

GTAAGTGTTCGCGGCACGTAAGATGGTTGTTTGTAGATACACTTCTGCCAGTGAT
GGGTGAGTCCCCTCCCCTTGAGGCCAGCACGTGCCAACTATACTAGTGGCTGCC
GTTTTAGTTTATGTTTATGTGGTATTTTCGTGAACATAGCGACTATGCGATGTCA
CAGTATGAGATGTCTGAATAACTGCACATGTTTAAATCAGCGAGAACTTCACTC
CATTGCATCGTCGTTTAGTATATTTTGGCTGTTGGAATGTGGAAAAATAATAGG
TAAAGTTAGAAGGTTACGTGTTGTGTTAGGTTTTATGTGGTGAACAATAAGTA
GTAGCAAGGTCGACCCTTTACCGGGAACGGGTTAACCGTTTCTGCTGGGGTTTT
GTAATAAGTACCATCGGGGATGTTGAGAAAGGGAGGATGAAGTATCAATGACG
TAGGATGTATTTGGAATCGTGTCCCTTCTGTTCTCAATGGAATATTGTTTAAAG
CTATAGTGATGTGGTATTAGATGGTAAGAATGCGTCATGATGATTTTATTGCGT
GCAGGACATTTGTGTTTGTGCGCATGATGATATACGTTTTAAATGAGCGTGGTT
TGCAGCGTCTCCTGTCTTAACCTTTATGATATAGATTTGTTATTGTTATTACTCA
TTTAGAGATTGTTTCGTTTATTGTAACGAATGACATATGGGTTCGTCGGCAAATT
CATTTAGAGAAAATGTTGAAATTATTTAAAATTTTTGGTGTAAAGGCTTACAGT
TTCAGGCTTCTTATAACGAAATCTTTCCCGGAGATCGCTATTGTTGTTGGAGA
AAATTGTTTCACATCTACCTAGAAGATAACGATGTTTAACTCCTGTCGGATTG
TGTCGTGGGGGATCGTGGTTATGTGAATCTCTCCCGCATCTCGTGGATCTCCTT
GTGATTCCTGCATCTGTCACATCTCGAACTTTTTTTCGTCTGGAAGTATCACGAA
CCGTGAGACGTGTCAGACAGCGATTACAAGCTCACGTCCGTCTCGTTCGACTTTT
GTCCCGTGTGTTGAGAATTTTATTGTAATCTTCCCTGGATAACACTGATGAACGA
CTATTTTTGTTGCCGGGCTTGTGGTGGTTGGGTAGTGCCGATAATTTCAAGA
AAACGCATTTTTGTTTCTGGTGAAACAACCTCCGACACGGCTCACACATCGAAG
TGTCATGGTGGGGGGCGGTTCGCGAAATCGCACATCCATCGCTCTTATCTACTG
GGGAGCT

Cepa N, *Bacillus cereus*

CCATGCGATGCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATG
AAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGG
GATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGT
TCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
GCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCAC
GGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG
AAAGTGGAATTCCATGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACAC
CAGTTGGCGAAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGC
GTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA

GTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGC
 ACTCCGCCCGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCACAGGAATTGACGGGC
 GCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAACAACCT
 TACAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGA

Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados

Resistencia a Sales biliares

Una vez identificadas las cinco cepas obtenidas mediante la técnica de Ichip, se inició la caracterización de dichas cepas. La de resistencia a diferentes sales biliares (Figura 5) se muestra una caja de agar MRS con sales biliares y los cinco círculos correspondientes a cada una de las cepas y en la Tabla 3 se muestran los resultados de la prueba. Los resultados muestran que las cinco cepas fueron capaces de crecer en las diferentes sales biliares

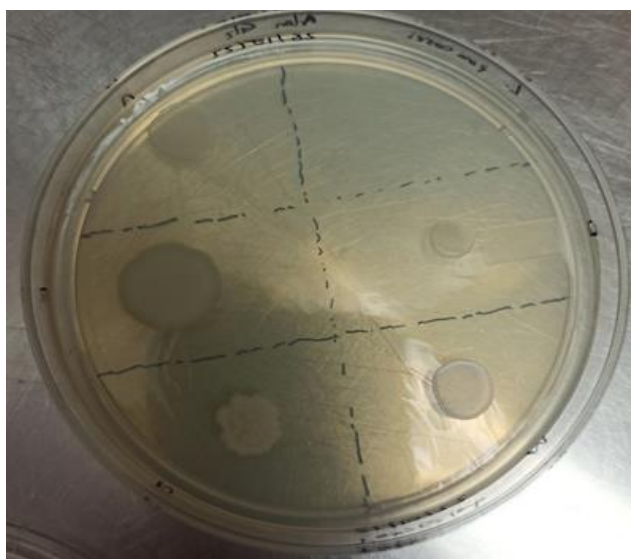


Figura 5. Crecimiento en diferentes sales.

Tabla 3. Resultados de la prueba de resistencia a sales biliares

Sales biliares						
Cepa	Control (sin sales)	Taurocolato	Taurodeoxic olato	Glicolato	Glocodeoxico lato	Oxgal

<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. clausii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	+

Resistencia a los antibióticos

La resistencia a antibiótico se realizó por medio de un antibiograma, para lo cual se utilizaron discos (Figura 6) para comprobar la sensibilidad de las cinco bacterias aisladas previamente a los antibióticos Tabla 4. Los resultados se obtenidos se resumen de igual manera en la tabla 4.

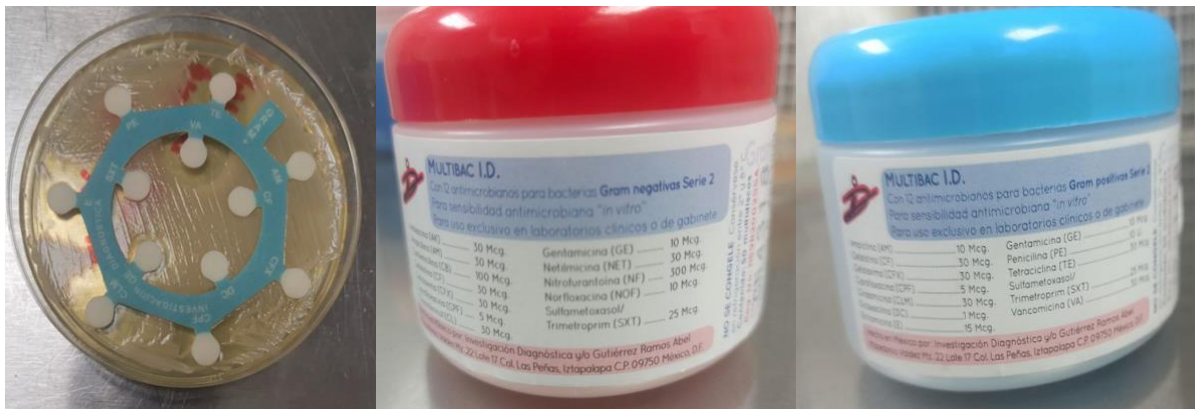


Figura 6. Discos para prueba de resistencia a antibióticos.

Tabla 4. Resistencia y sensibilidad a antibióticos de las cepas aisladas.

	Cepas Gram (+)				Cepa Gram (-)	
Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. clausii</i>	Antibiótico	<i>E. faecium</i>

<i>Ampicilina</i>	R	R	R	R	<i>Cefalotina</i>	R
<i>Cefotaxima</i>	S	R	R	R	<i>Cefotaxima</i>	R
<i>Cefepime</i>	S	S	S	S	<i>Ceftarolina</i>	R
<i>Cefuroxima</i>	R	R	S	R	<i>Cephalexina</i>	S
<i>Eritromicina</i>	R	R	S	R	<i>Nafcillina</i>	S
<i>Penicilina</i>	R	S	R	R	<i>Ampicilina</i>	R
<i>Tetraciclina</i>	R	S	S	S	<i>Carbenicillina</i>	R
<i>Cefolotina</i>	R	R	R	S	<i>Gentamicina</i>	S
<i>Diclixacilina</i>	R	R	R	S	<i>Netilmicina</i>	S
<i>Gentamicina</i>	S	S	S	S	<i>Norfloxacina</i>	R
<i>Trimetropin-sulfametoxazol</i>	S	R	R	S	<i>Trimetropin-sulfametoxazol</i>	R
<i>Vamcomicina</i>	R	R	S	S	<i>Amikacina</i>	S

R: Resistente; S: Sensible

Prueba de hemólisis

Para continuar con la caracterización de las cepas obtenidas, se realizó la prueba de hemólisis, para lo cual se utilizaron cajas con agar sangre donde se sembraron las cinco cepas, (Figura 7) y (Tabla 5). Los resultados obtenidos muestran que las cinco cepas no fueron hemolíticas.



Figura 7. Prueba de hemólisis. En el experimento por duplicado se obtuvo que las cinco cepas no son hemolíticas

Tabla 5. Resultado de la prueba de hemólisis

CEPA	HEMÓLISIS
<i>E. faecium</i>	Negativa
<i>E. coli</i>	Negativa
<i>E. faecalis</i>	Negativa
<i>B. clausii</i>	Negativa
<i>B. cereus</i>	Negativa

Igual que en la tabla 3 y 4 (nombres de las bacterias si no para que se secuenciaron

Tolerancia al pH gástrico

Como penúltima etapa de caracterización se realizó la prueba de tolerancia al pH gástrico, utilizando medio de cultivo en cajas de Petri a tres pH (1.5, 2 y 3) (Figura 8). También, se determinó el porcentaje y la tasa de supervivencia de las cinco bacterias aisladas a diferentes pH (Tabla 6 y Figura 9, 10 y 11) , durante tiempo inicial, 10, 20, 60 y 90 min)

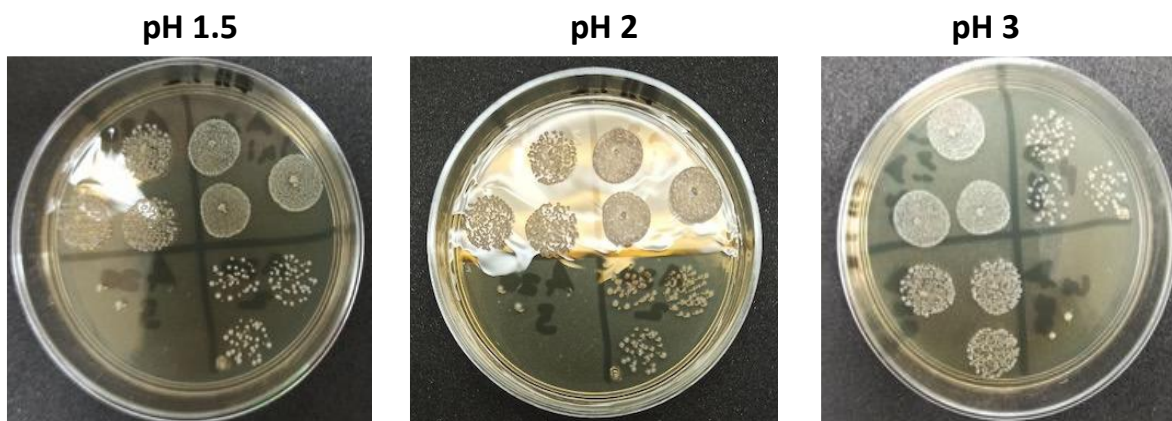


Figura 8. Resistencia a pH. Se tomo una cuenta inicial y cuatro diluciones. La dilución más apta para la cuenta en placa resultó la tercera. Las cinco cepas disminuyen más del 90 % de su concentración en el pH 1.5 desde los primeros 10 minutos.

Tabla 6. Resultado de las pruebas de resistencia a pH estomacal

Porcentaje de sobrevivencia de las cepas a pH 1.5					
Tiempo (min)	<i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. clausii</i>	<i>B. cereus</i>
0	100	100	100	100	100
10	7.38	1.14	8.33	2.31	0.80
20	2.87	0.63	1.82	0.32	0.04
60	0.09	0.06	0.01	0.12	0.04
90	0.02	0.01	0.00	0.03	0.02
Porcentaje de sobrevivencia de las cinco cepas a pH 2					
0	100	100	100	100	100
10	14.52	13.50	12.56	16.38	92.65
20	10.91	8.77	8.82	15.52	88.24
60	0.65	0.67	8.70	1.55	8.31
90	0.11	0.11	8.25	1.47	0.81
Porcentaje de sobrevivencia de las cinco cepas a pH 3					
0	100	100	100	100	100

10	97.74	66.67	20.41	34.21	18.3
20	87.59	54.17	13.44	18.42	2.4
60	81.20	45.83	12.28	0.05	0.0
90	10.75	38.75	10.19	0.03	0.0

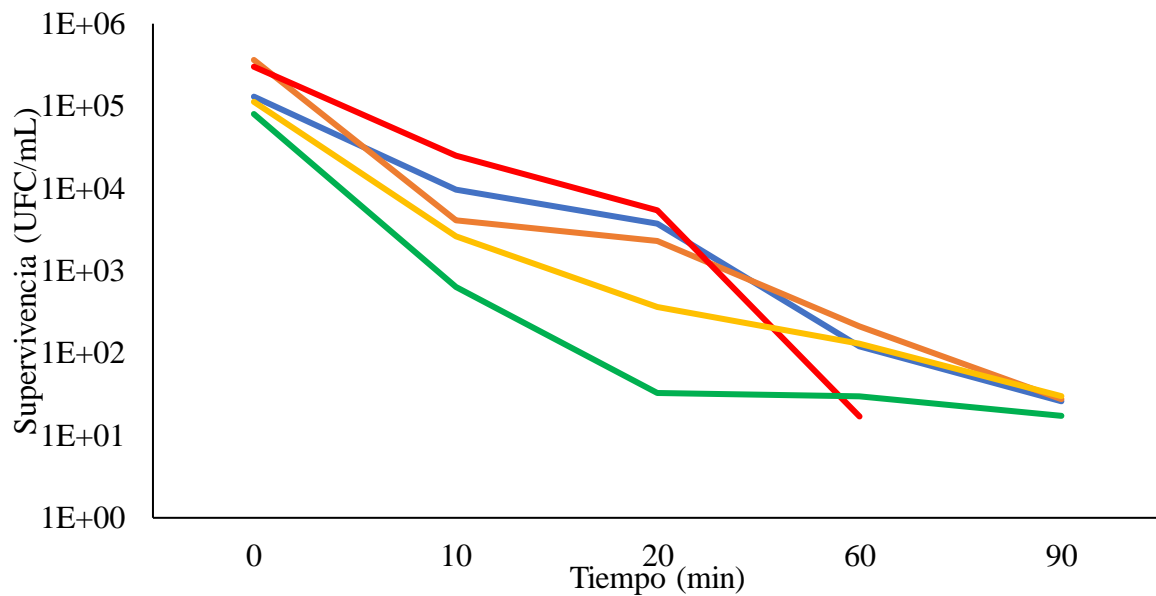


Figura 9. Tasa de supervivencia de las cinco bacterias a pH 1.5. *B. cereus* decae en su mayor porcentaje desde los 20 minutos, la bacteria que tiene la mayor tolerancia es *E. faecium*. ■ (A): *E. faecium*, color azul. ■ (M): *E. coli*, color naranja. ■ (D): *E. faecalis*, color rojo. ■ (E): *B. clausii*, color amarillo. ■ (N): *B. cereus*, color verde.

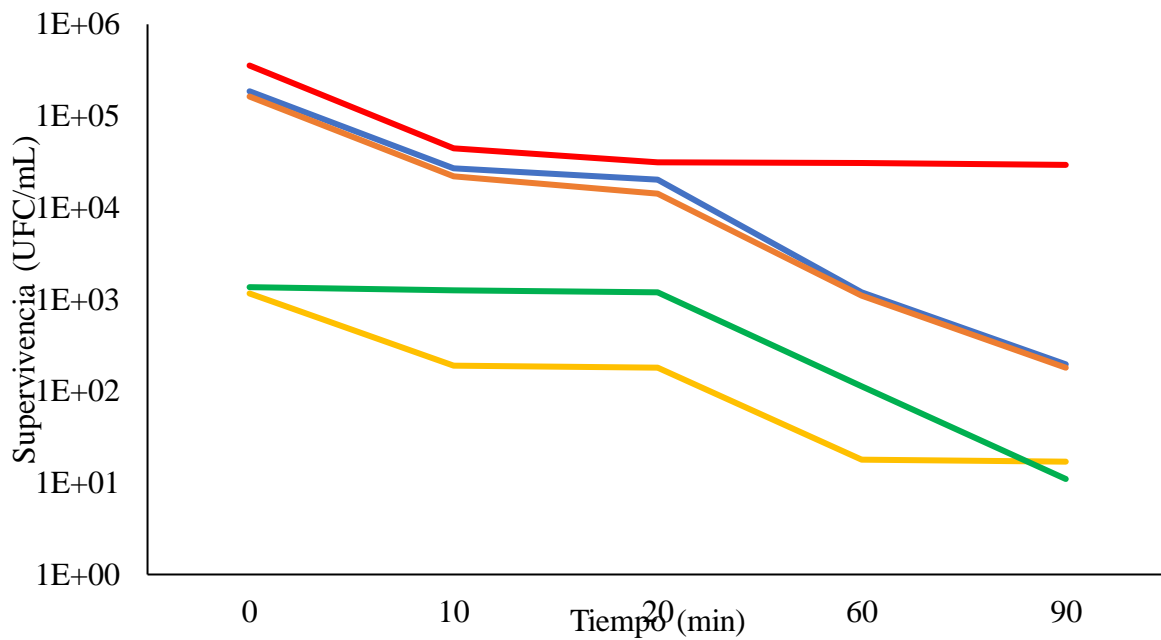


Figura 10. Tasa de supervivencia de las cinco cepas a pH 2. La mayor supervivencia a este pH la tuvo el *E. faecalis*, el cual decae en los primeros 10 minutos, pero se mantiene relativamente estable hasta los 90 minutos. En el caso de *B. cereus* mantiene su supervivencia durante los primeros 20 minutos, pero después tiene una decaída exponencial. ■ (A): *E. faecium*, color azul. ■ (M): *E. coli*, color naranja. ■ (D): *E. faecalis*, color rojo. ■ (E): *B. clausii*, color amarillo. ■ (N): *B. cereus*, color verde.

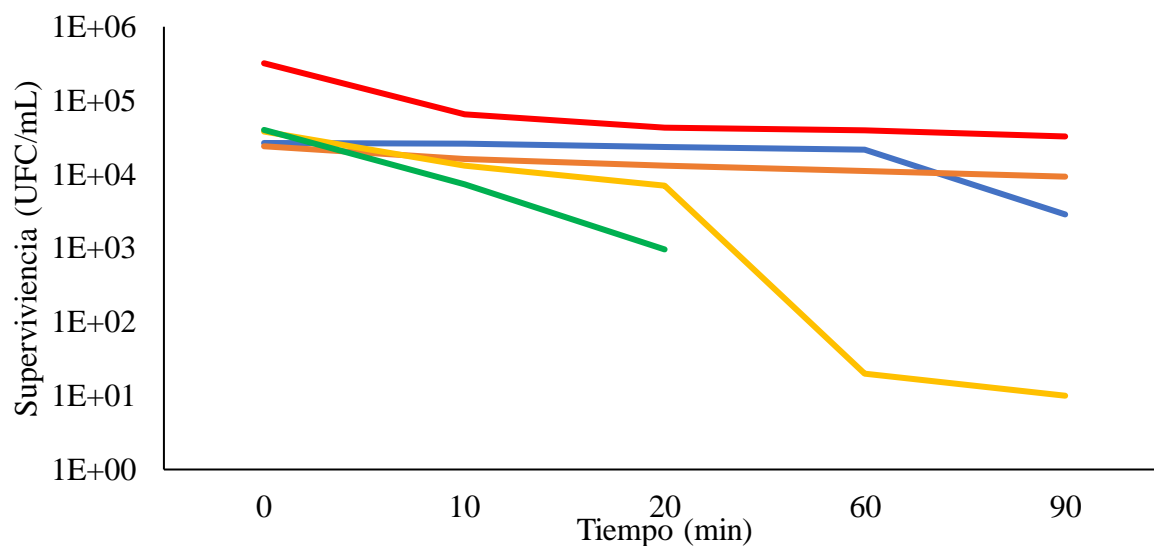


Figura 11. Tasa de supervivencia de las cinco cepas a pH 3. El *E. faecalis* resiste de mejor manera el pH 3, mientras que el *B. clausii* después de los 20 minutos decae de manera importante. Por su parte, el *E. faecium* se mantiene relativamente resistente durante los 90 minutos. ■ (A): *E. faecium*, color azul. ■ (M): *E. coli*, color naranja. ■ (D): *E. faecalis*, color rojo. ■ (E): *B. clausii*, color amarillo. ■ (N): *B. cereus*, color verde.

Crecimiento en glucosa, inulina, celobiosa, xilosa, rafinosa y CMC.

Por último, se evaluó la capacidad de los cinco microorganismos por crecer en medio con siete diferentes carbohidratos, a través de una prueba ELISA durante veinte 22 h (Figuras 12, 13, 14 15, 16 y 17).

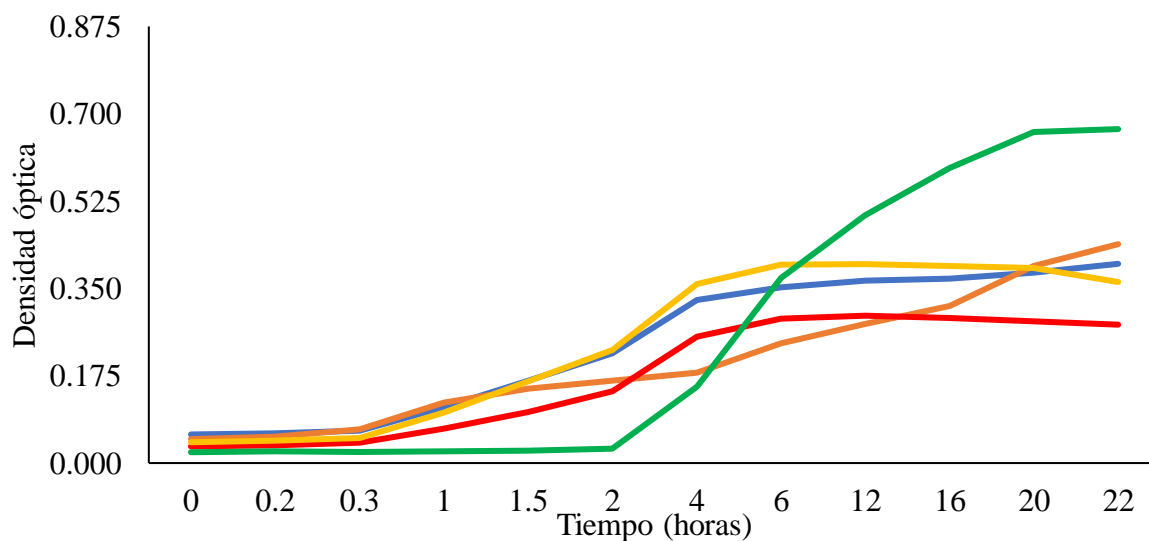


Figura 12. Crecimiento de las cinco cepas en glucosa durante 22 horas. *B. cereus* es la bacteria con mayor crecimiento, seguido por *B. clausii*. A excepción de *B. Cereus*, las demás bacterias comienzan su fase exponencial aproximadamente a las 0.3 h y entran a fase estacionaria aproximadamente a las 3 h. ■ (A): *E. faecium*, color azul. ■ (M): *E. coli*, color naranja. ■ (D): *E. faecalis*, color rojo. ■ (E): *B. clausii*, color amarillo. ■ (N): *B. cereus*, color verde.

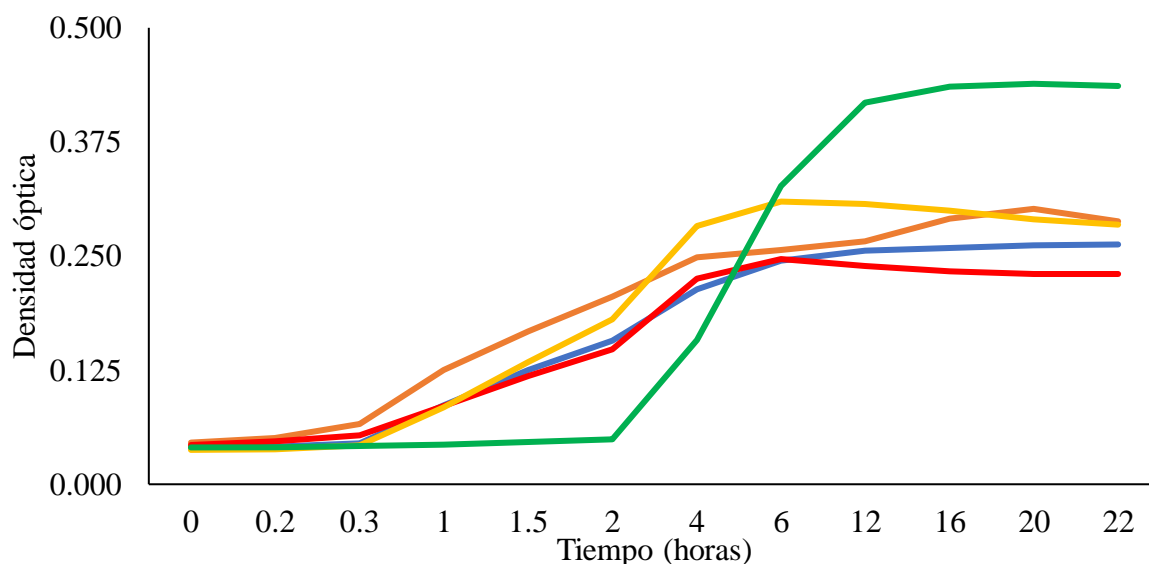


Figura 13. Crecimiento de las cinco cepas en inulina durante 22 horas. En la gráfica se puede observar que todas las bacterias a excepción de *B. Cereus* comenzaron su crecimiento exponencial a partir de las 0.3 horas, entrando a fase de latencia aproximadamente a las 4 horas. ■ (A): *E. faecium*, color azul. ■ (M): *E. coli*, color naranja. ■ (D): *E. faecalis*, color rojo. ■ (E): *B. clausii*, color amarillo. ■ (N): *B. cereus*, color verde.

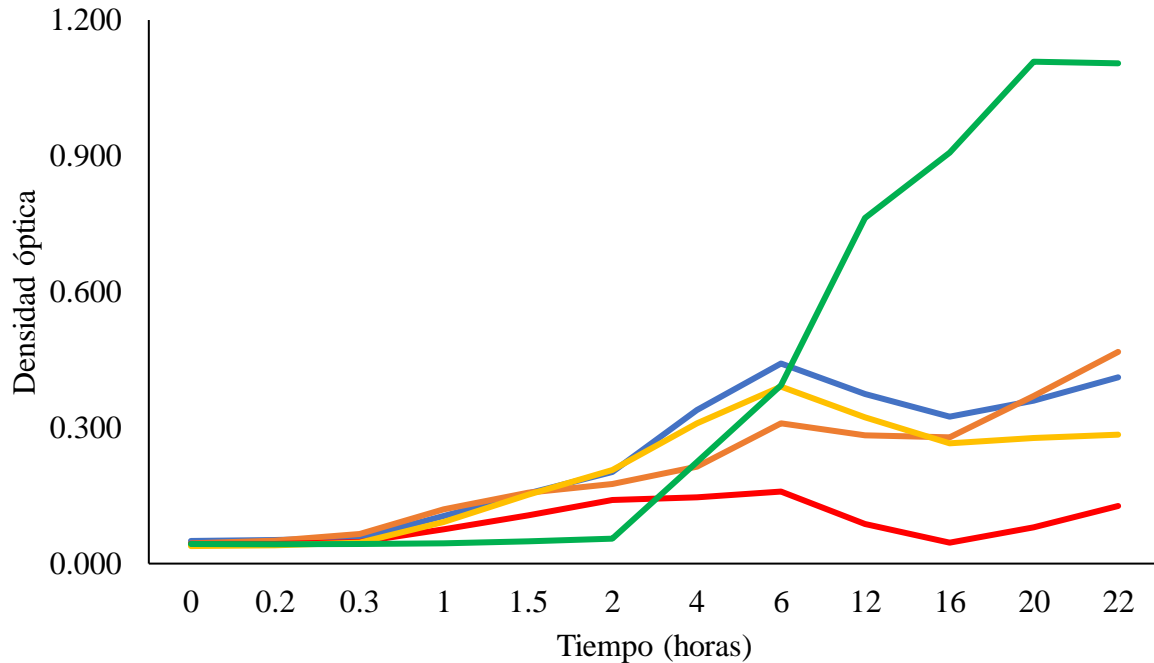


Figura 14. Crecimiento de las cinco cepas en celobiosa durante 22 horas. En este carbohidrato el crecimiento resulta menor que en glucosa e inulina. *B. cereus* es la bacteria que mejor se adapta y tiene un crecimiento por encima de 1.0 de densidad óptica. ■ (A): *E. faecium*, color azul. ■ (M): *E. coli*, color naranja. ■ (D): *E. faecalis*, color rojo. ■ (E): *B. clausii*, color amarillo. ■ (N): *B. cereus*, color verde.

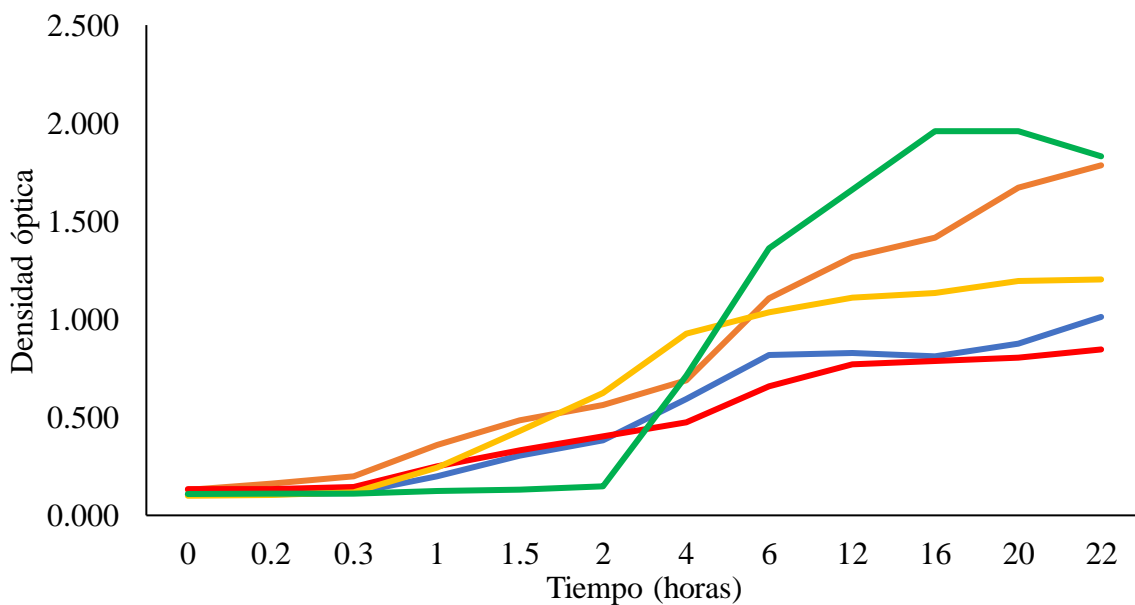


Figura 15. Crecimiento de las cinco cepas en xilosa durante 22 horas. *E. coli* destaca por tener crecimiento por encima de 1.5 de densidad óptica. *B. cereus* tiene el mayor crecimiento, superando los 2.0 de densidad óptica (A): *E. faecium*, color azul. (M): *E. coli*, color naranja. (D): *E. faecalis*, color rojo. (E): *B. clausii*, color amarillo. (N): *B. cereus*, color verde.

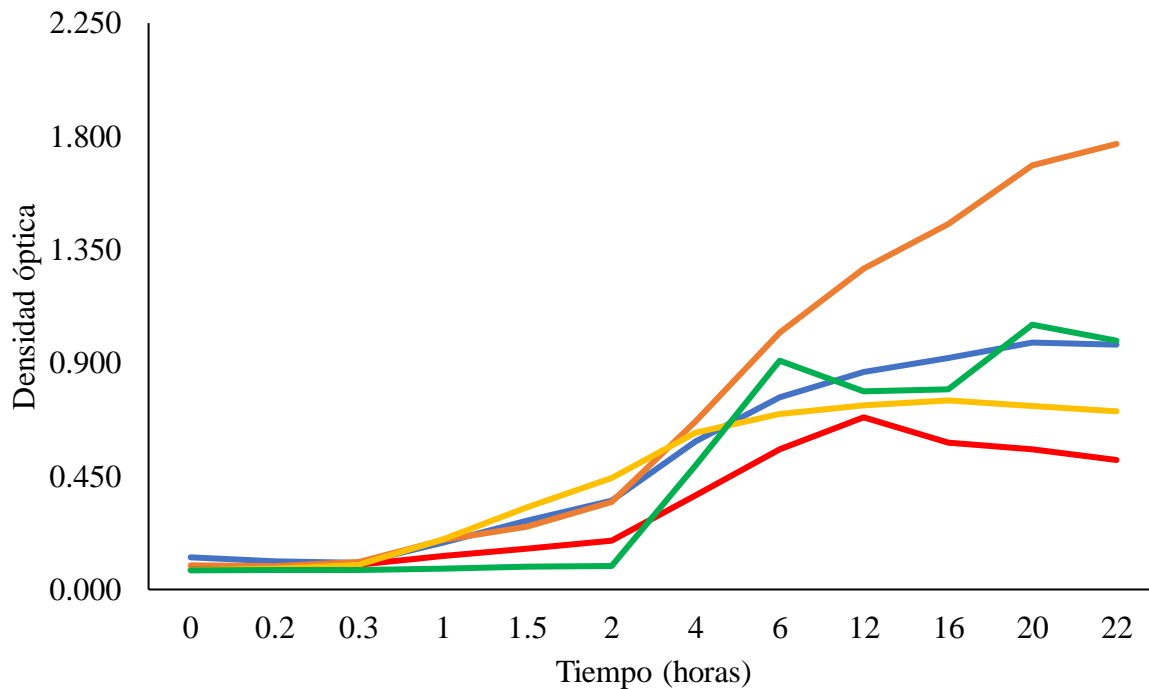


Figura 16. Crecimiento de las cinco cepas en rafinosa durante 22 horas. *E. coli* crece cerca de 1.8 de densidad óptica, la fase exponencial se comporta aproximadamente de la misma manera que en los casos anteriores, pero se detiene aproximadamente a las 2 h. (A): *E. faecium*, color azul. (M): *E. coli*, color naranja. (D): *E. faecalis*, color rojo. (E): *B. clausii*, color amarillo. (N): *B. cereus*, color verde.

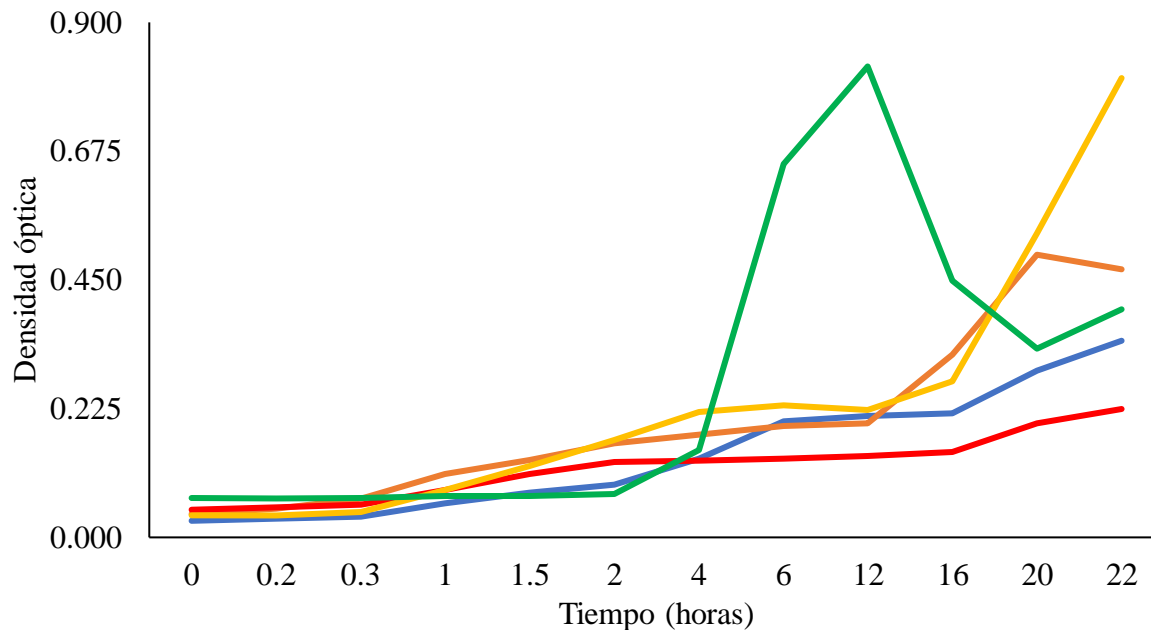


Figura 17. Crecimiento de las cinco cepas en CMC durante 22 horas. En el CMC, a excepción del *B. cereus* y *B. clausii*, las demás bacterias crecen menos que en los casos anteriores. ■ (A): *E. faecium*, color azul. ■ (M): *E. coli*, color naranja. ■ (D): *E. faecalis*, color rojo. ■ (E): *B. clausii*, color amarillo. ■ (N): *B. cereus*, color verde.

Discusión de resultados

La tecnología del Ichip ya ha sido distinguida anteriormente por ser una herramienta para la obtención de cepas puras conocidas como “incultivables”, entre las cuales se encuentran microorganismos que pueden resultar prospecto como novedades bioquímicas y biotecnológicas (Nichols et al., 2010). El Ichip se ha utilizado para aislar cepas bacterianas difícilmente cultivables, a partir de sedimentos de agua poco profundas de la Antártida (Esposito et al., 2018). Este trabajo implementó la técnica de Ichip para obtener microorganismos provenientes de la materia fecal de un humano, los cuales también resultan difíciles de aislar de una manera pura. Gracias a sus múltiples pozos y a la membrana semipermeable, el Ichip resultó eficaz para el aislamiento de cepas, obteniendo “cepas puras” en cada uno de sus pozos.

Como un paso previo esencial a la ejecución del aislamiento con el Ichip, se realizó una extracción de ADN genómico a las muestras de materia fecal, con la intención de garantizar la existencia de microorganismos de gran interés biotecnológico como *A. muciniphila*, esto

gracias a la utilización de una serie de oligonucleótidos específicos de esta bacteria, lo que nos permitió identificar, la presencia de esta bacteria en la materia fecal, esto fue debido a la amplificación un fragmento de ADN_g de 350-400 pb por PCR, lo cual nos permite indicar que probablemente éste producto de PCR corresponda a *A. muciniphila*, sería conveniente que este producto se mandara a secuenciar para confirmar que efectivamente corresponde a esta bacteria. La metodología de Ichip no nos permitió aislar *A. muciniphila*, esto probablemente porque influyeron varios factores, uno de ellos es su baja concentración que presenta en la materia fecal. **Geerlings et al., 2018** mencionaron que el filo de *Verrucomicrobia*, se encuentra en una proporción dentro de la microbiota intestinal entre el 0.5 y el 3 %. Así mismo, **Jeong et al., 2020** sugieren la ingesta prolongada de té verde para elevar la proporción de esta bacteria en la microbiota intestinal, para disminuir la proporción de otros filos de bacterias con el uso de algunos antibióticos. también, probablemente pudo influir el modo de recolección de la muestra (ya que esta es anaerobia estricta y se requiere un ambiente libre de oxígeno) o al medio de cultivo utilizado, por lo cual se sugiere optimizar el proceso de aislamiento de esta bacteria utilizando Ichip.

Analizando los resultados de la identificación taxonómica por secuenciación de la región de 16s, se obtuvieron 5 cepas (ver tabla 2) que fueron posible aislar y caracterizar bioquímicamente, ya que su proporción es mucho más elevada. Con los datos anteriores podemos sugerir, para futuros experimentos, con la finalidad de elevar las probabilidades de aislar *A. muciniphila*, utilizar métodos, por ejemplo, la ingesta prolongada de té verde (**Jeong et al., 2020**), para elevar la proporción de esta en la microbiota intestinal; así como, disminuir la proporción de otros filos de bacterias con el uso de algunos antibióticos.

Entre las bacterias aisladas, destaca la presencia de *E. faecium* y de *B. clausii*, los cuales han sido identificados en por diversos autores como bacterias con posible potencial probiótico y para la salud (**Bs et al., 2021** y **Ianiro et al., 2018**), este último ha demostrado una gran aplicación para el tratamiento de la diarrea aguda en niños. Sobre las otras bacterias aisladas, si bien no resultan tan inusuales, en algunas variantes se han reportado su posible utilización beneficiosa para la salud, como en el caso de *E. coli* y *E. faecalis* que son utilizados como probióticos (**Zhao et al., 2022** y **Schaefer & Enck, 2019**) y gracias a la técnica de aislamiento por Ichip nos permitió aislarlas de una manera rápida y eficaz. Cabe señalar que es necesario realizar un análisis genómico completo para realizar una mejor caracterización genotípica.

La resistencia a sales biliares, tras someter a las 5 bacterias aisladas al crecimiento en Agar MRS con cinco diferentes sales (ver tabla 3) se pudo observar que todas tiene un crecimiento, esto pudo deberse a una la concentración de las sales biliares o a la alta resistencia de estas bacterias. Por lo anterior podrían resultar viables para su posible uso como probióticos en caso de comprobarse que no ejercen ningún efecto patógeno y que pueden proveer de un beneficio para la salud del hospedero. Esto resulta consistente con lo reportado por **Paitán y**

col, 2017 donde sus experimentos encontraron que géneros de bacterias *E. coli* y *Enterococcus* resultaron resistentes a medios con sales biliares.

Una vez realizadas las pruebas de resistencia a sales biliares se procedió a realizar el antibiograma a las cinco bacterias. Analizando los resultados del antibiograma de la cepa *E. coli*, resultó resistente a antibióticos como ampicilina, cefuroxima, tetraciclina y eritromicina; y a su vez es susceptible a antibióticos como cefotaxima y gentamicina, lo que resulta congruente con lo reportado por otros autores (**Fesseha et al., 2022**). Con respecto al *E. faecalis* al igual que la *E. coli* es resistente a ampicilina, cefuroxima y eritromicina, sin embargo, es susceptible la penicilina, tetraciclina y gentamicina. Por su parte, la otra cepa de *Enterococcus* analizada comparte la resistencia a la cefotaxima, cefalotina y a la ampicilina, y resulta susceptible a antibióticos como netilmicina, gentamicina y nephalexina. Estos datos también pueden corroborarse en trabajos publicados, donde se observan las mismas resistencias y susceptibilidades a estos antibióticos (**Porte y Col, 2007** y **Cruz Pio, 2011**). Por último, analizamos las dos cepas restantes de *Bacillus*. El *B. cereus* es resistente a ampicilina, cefotaxima, penicilina, y cefalotina, pero al igual que todas las cepas anteriores resulta susceptible a la gentamicina, además de cefuroxima y eritromicina; estas resistencias observadas son consistentes con lo reportado por **Aroca-Ferri y colaboradores, en 2019**. Al contrario del anterior, el *B. clausii* es resistente a la cefuroxima y eritromicina. Sin embargo, es susceptible a la tetraciclina, cefalotina y gentamicina. Es importante remarcar, que para descartar que estos microorganismos puedan transferir esta resistencia a otros, se requiere de la secuenciación del genoma completo de cada microorganismo y así poder determinar si esta resistencia es intra o extra cromosomal.

Hablando del siguiente experimento realizado a las cepas obtenidas, la prueba de hemólisis se llevó a cabo utilizando Agar sangre como medio de cultivo, analizando los resultados obtenidos, se puede decir que todos los microorganismos analizados no son hemolíticos, por lo cual puede resultar segura su manipulación o experimentación posterior, sin embargo es importante descartar la presencia de genes de virulencia a través de la secuenciación y anotación de su genoma en posteriores proyectos respecto a estos microorganismos.

El penúltimo de los experimentos realizados fue la prueba de tolerancia al pH estomacal, sometiendo las cepas a estrés de tres diferentes pH (1.5, 2 y 3). De acuerdo con los resultados que se pueden observar en la tabla número 6, el porcentaje de supervivencia de las cinco cepas a un pH de 1.5 después de 10 minutos ya es un porcentaje muy afectado, estando todos por debajo del 10 % de supervivencia y, para los 90 minutos ya el porcentaje de supervivencia es casi insignificante, con todos los casos por debajo del 0.1 %. Con estos resultados podemos decir que ninguna de las bacterias obtenidas puede sobrevivir a más de 10 minutos a un pH entre 1.5 y 3, tomando en cuenta que el tiempo de aproximado en que los alimentos son sometidos a este pH en el estómago es de dos horas, se tendría que considerar algún medio de protección si se quisieran usar como probióticos.

En los datos obtenidos de las pruebas en pH 2 de las cinco cepas se puede observar que existe un incremento en la resistencia a los 10 minutos, todas las cepas presentan un porcentaje de supervivencia mayor al 10 %, el cual se mantiene considerable incluso después de 30 minutos de estrés. Sin embargo, pasando la hora y hasta los 90 minutos, la tasa de supervivencia disminuye considerablemente. Cabe señalar que se obtuvieron resultados atípicos en la prueba del *B. cereus*, esto puede deberse a su baja capacidad de tolerar este pH. Al final esto podría resultar benéfico ya que esta bacteria está identificada en diferentes publicaciones por causar bacteriemia, ha sido implicada en la enfermedad, incluidas las toxinas formadoras de poros hemolisina BL y enterotoxina no hemolítica (Tuipulotu et al., 2021).

Por último, al ser sometidas las cinco cepas al estrés del pH 3, durante los primeros 10 minutos el porcentaje de supervivencia es considerablemente alto, sobre todo de la cepa *E. faecium* y *E. coli*. Estas dos cepas, junto con el *B. cereus* incluso mantienen supervivencia aceptable después de 90 minutos. En cuanto a las cepas *B. clausii* y *B. cereus*, disminuye su supervivencia después de los primeros 20 minutos de estar sometidos al pH 3. De acuerdo con estos resultados se puede decir que estas cinco cepas no toleran por sí mismas pH inferiores a 3.

El último de los experimentos realizados fue la prueba de crecimiento de las cinco cepas en seis diferentes carbohidratos (ver figuras de la 12 a la 17), esto por el método de ELISA durante 22 h. Cada una de las gráficas muestra el crecimiento de las cinco cepas en un respectivo carbohidrato. En el eje de las x se puede observar el tiempo y en el eje de las y la observancia obtenida. En la primera gráfica (figura 12) observamos el crecimiento de las cepas en glucosa, en ella podemos notar que el microorganismo con el mayor crecimiento fue el *B. cereus*, mientras que el que presenta menor crecimiento es el *E. faecalis*. Las otras tres bacterias tienen un crecimiento similar.

La siguiente prueba se realizó en inulina (ver figura 13). Al igual que en el caso anterior el microorganismo que mejor se adaptó fue *B. cereus* y el que menos se adaptó fue *E. faecalis*. Sin embargo, en este caso las absorbancias registradas son inferiores, siendo la más grande de 0.450, en contraste con la de glucosa que fue de 0.700. En todas las cepas, excepto *Bacillus cereus*, el crecimiento comenzó a los 20 minutos de incubación y se mantiene relativamente estable hasta las 8 horas, después de estas podemos ver una fase estacionaria donde ya no hay mayor crecimiento. En el caso del que fue diferente, su crecimiento comenzó a las 2 horas y tuvo una fase de crecimiento exponencial hasta las 12 horas.

En la figura 14 podemos observar el crecimiento de las cinco cepas en celobiosa donde la bacteria con mayor crecimiento se mantiene con respecto de los carbohidratos anteriores, alcanzando absorbancia cercana a 1; al igual que los casos anteriores, el crecimiento de esta bacteria comienza tardíamente, cercano a las 8 horas, pero tomando una pronunciada fase

exponencial. En este caso *E. faecium* alcanza crecimientos considerables, casi por los 0.5 de absorbancia. De igual manera que en los casos anteriores la bacteria con el menor crecimiento fue *E. faecali*.

En el caso de la xilosa (ver figura 15), en la gráfica es observable que, aunque se repite el crecimiento máximo para *B. cereus*, esta vez al final de las 22 horas se observó que *E. coli* presenta un crecimiento casi igual que el del anterior, esta comenzó su crecimiento desde los primeros 20 minutos de incubación y se mantiene en fase de crecimiento constante hasta la hora 22.

A continuación, el análisis de crecimiento en rafinosa (ver figura 16) ofrece resultados diferentes al de los anteriores. Por principio de cuentas la cepa que obtuvo un mejor crecimiento en este carbohidrato fue la *Escherichia coli*. Otra diferencia con las anteriores es que el crecimiento de *B. cereus* comenzó desde las 2 horas, a diferencia de los anteriores que había sido desde las 8 horas de incubación. En este caso el crecimiento de este último es equiparable al de *E. faecium*.

Por final de cuentas analizamos el crecimiento de las cepas en CMC, mostrado en la gráfica de la figura 17, en ella podemos observar un crecimiento exponencial de *B. cereus* entre las 4 y las 12 horas, sin embargo, este presenta un decrecimiento importante entre las 12 y las 21 horas. Al contrario de este, las demás cepas presentan un crecimiento lento y constante, desde los 20 minutos y hasta las 22 horas del ensayo. En este caso, *B. clausii*, evidenció un gran crecimiento entre las 16 y las 22 horas de la prueba, siendo el que mejor se adaptó a este medio.

Conclusiones

La implementación de la tecnología del Ichip para el aislamiento de microorganismos de la microbiota humana demostró ser sumamente eficaz, utilizando el medio de cultivo y condiciones adecuadas favorece el crecimiento de una sola cepa bacteriana en cada uno de sus pozos, con ello permite el aislamiento, purificación y crecimiento con mayor índice de éxito. Gracias a la secuenciación de la región de 16s, fue posible la identificación de las cepas obtenidas y, así mismo, su caracterización demostró que estas poseen ciertas resistencias a las sales biliares y las condiciones estomacales de pH, que no son hemolíticas y que pueden ser cultivadas en diferentes carbohidratos con un gran éxito de crecimiento. Aunque con los resultados obtenidos se puede pensar que algunos de estos microorganismos tienen cualidades de ser implementados como probióticos, aun se requiere un mayor número de experimentos con diferentes condiciones. De igual manera, se requieren mayores procesos de aislamiento implementando la tecnología del Ichip, combinando variantes de medios de cultivo y condiciones con la finalidad de obtener un mayor número de bacterias de interés para la salud,

las cuales no fue posible obtener en este proceso debido a sus bajas concentraciones en la microbiota intestinal, tal es el caso de *Akkermansia muciniphila*.

Referencias

- Castañeda, G. C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(1), 94-110.
- Harris, P. R. (2019). ¿ Qué sabemos de la importancia de la microbiota intestinal a lo largo de la vida?. *Gastroenterol. latinoam*, S13-S17.
- Wilkins, T., & Sequoia J. (2017). Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am Fam Physician*. Aug, 1;96(3):170-178. PMID: 28762696.
- Kim, S. K., Guevarra, R. B., Kim, Y. T., Kwon, J., Kim, H., Cho, J. H., ... & Lee, J. H. (2019). Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases.
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 55-71.
- Generoso, J. S., Giridharan, V. V., Lee, J., Macedo, D., & Barichello, T. (2020). The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 43, 293-305.
- Long-Smith, C., O'Riordan, K. J., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2020). Microbiota-gut-brain axis: new therapeutic opportunities. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 60, 477-502.
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell host & microbe*, 23(6), 705-715.
- Agudelo-Ochoa, G. M., Giraldo-Giraldo, N. A., Barrera-Causil, C. J., & Valdés-Duque, B. E. (2016). Microbiota intestinal y ácidos grasos de cadena corta en pacientes críticos. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 18(2), 205-222.
- Lodhi, A. F., Zhang, Y., Adil, M., & Deng, Y. (2018). Antibiotic discovery: combining isolation chip (iChip) technology and co-culture technique. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(17), 7333-7341.
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2015). A new antibiotic and the evolution of resistance. *New England Journal of Medicine*, 372(12), 1168-1170.
- Bein, A., Shin, W., Jalili-Firoozinezhad, S., Park, M. H., Sontheimer-Phelps, A., Tovaglieri, A., ... & Ingber, D. E. (2018). Microfluidic organ-on-a-chip models of human intestine. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 5(4), 659-668.
- Cheng, D., & Xie, M. Z. (2021). A review of a potential and promising probiotic candidate— *Akkermansia muciniphila*. *Journal of Applied Microbiology*, 130(6), 1813-1822.
- Zhang, T., Li, Q., Cheng, L., Buch, H., & Zhang, F. (2019). *Akkermansia muciniphila* is a promising probiotic. *Microbial biotechnology*, 12(6), 1109-1125.
- Depommier, C., Everard, A., Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Vieira-Silva, S., ... & Cani, P. D. (2019). Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature medicine*, 25(7), 1096-1103.

- Amaral Montesino, C., Abrego Sánchez, A., Díaz Granados, M. A., González Ponce, R., Salinas Flores, A., & Rojas García, O. C. (2021). *Akkermansia muciniphila*, una ventana de investigación para la regulación del metabolismo y enfermedades relacionadas. *Nutrición Hospitalaria*, 38(3), 675-676.
- Yang, M., Bose, S., Lim, S., Seo, J., Shin, J., Lee, D., Chung, W. H., Song, E. J., Nam, Y. D., Kim H. (2020). Beneficial Effects of Newly Isolated *Akkermansia muciniphila* Strains from the Human Gut on Obesity and Metabolic Dysregulation. *Microorganisms*, 14;8(9),1413.
- Ouwerkerk, J. P., van der Ark, K. C., Davids, M., Claassens, N. J., Finestra, T. R., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2016). Adaptation of *Akkermansia muciniphila* to the oxic-anoxic interface of the mucus layer. *Applied and environmental microbiology*, 82(23), 6983-6993.
- Suez, J., Zmora, N., & Elinav, E. (2020). Probiotics in the next-generation sequencing era. *Gut Microbes*, 11(1), 77-93.
- Chang, C. J., Lin, T. L., Tsai, Y. L., Wu, T. R., Lai, W. F., Lu, C. C., & Lai, H. C. (2019). Next generation probiotics in disease amelioration. *Journal of food and drug analysis*, 27(3), 615-622.
- Collado, M.C., Derrien, M., Isolauri, E., de Vos, W.M., Salminen, S. (2007). Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Applied and Environ Microbiology*. 73(23), 7767-70.
- Sherpa, R.T., Reese, C.J., Aliabadi, H.M. (2015). Application of iChip to Grow “Uncultivable” Microorganisms and its Impact on Antibiotic Discovery. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 18(3), 303 - 315. <https://doi.org/10.18433/j30894>
- González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L., Reyes-Nava, L. A., Shah, N. P., Rivera-Espinoza, Y. (2015). Isolation, identification, and partial characterization of a *Lactobacillus casei* strain with bile salt hydrolase activity from pulque. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7, 242-248. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9202-x>
- Olivarez-Romero, R., Faustino-Vega, A., Miranda-Calderon J. E., González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa A. (2018). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 increases relative survival under simulated gastrointestinal tract stress. *Revista Mexicana de Ingeniería Bioquímica*, 17(2), 641-650 .
- Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., ... & Epstein, S. (2010). Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Applied and environmental microbiology*, 76(8), 2445-2450.
- Esposito, F. P., Ingham, C. J., Hurtado-Ortiz, R., Bizet, C., Tasdemir, D., & de Pascale, D. (2018). Isolation by miniaturized culture chip of an Antarctic bacterium *Aequorivita* sp. with antimicrobial and anthelmintic activity. *Biotechnology Reports*, 20, e00281.
- Bs, S., Thankappan, B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Femil Selta, D. R., & Angayarkanni, J. (2021). Evaluation of GABA Production and Probiotic Activities of *Enterococcus faecium* BS5. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 13(4), 993–1004.
- Ianiro, G., Rizzatti, G., Plomer, M., Lopetuso, L., Scaldaferrri, F., Franceschi, F., Cammarota, G., & Gasbarrini, A. (2018). *Bacillus clausii* for the Treatment of Acute Diarrhea in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 10(8), 1074.

- Zhao, Z., Xu, S., Zhang, W., & Wu, D. (2022). Probiotic Escherichia coli NISSLE 1917 for inflammatory bowel disease applications. Food & Function.
- Schaefer, M., & Enck, P. (2019). Effects of a probiotic treatment (Enterococcus faecalis) and open-label placebo on symptoms of allergic rhinitis: study protocol for a randomised controlled trial. BMJ open, 9(10), e031339.
- Paitán, E., Santos, R., Sotelo, A., Zúñiga, D., & Vílchez, C. (2019). Caracterización molecular de bacterias con potencial probiótico aisladas de heces de neonatos humanos. Revista peruana de biología, 26(1), 119-130.
- Fesseha, H., Mathewos, M., Aliye, S., & Mekonnen, E. (2022). Isolation and antibiogram of Escherichia coli O157: H7 from diarrhoeic calves in urban and peri-urban dairy farms of Hawassa town. Veterinary Medicine and Science, 8(2), 864-876.
- Porte, L., Hervé, B., Prat, S., & Chanqueo, L. (2007). Enterococcus sp Parte I. Revista chilena de infectología, 24(3), 231-231.
- Cruz Pio, L. E. (2011). Caracterización probiótica de una cepa nativa de Enterococcus faecium QPa. 1 Aislada de queso de elaboración artesanal.
- Aroca-Ferri, M., Suárez-Hormiga, L., Bolaños-Rivero, M., & Pérez-Arellano, J. L. (2019). Absceso intrafascial por Bacillus cereus. Revista Española de Quimioterapia, 32(1), 93.
- Tuipulotu, D. E., Mathur, A., Ngo, C., & Man, S. M. (2021). Bacillus cereus: epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions. Trends in Microbiology, 29(5), 458-471.

Vo. Bo. de los asesores respecto a los contenidos académicos

Lino Mayorga Reyes

Raquel González Vázquez

Nombre y firma del asesor interno
 Cargo: jefe de investigación
 Número económico: 8491

Nombre y firma del asesor externo
 Cargo: catedrático CONACYT
 Número de cédula profesional: 09165459