

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Lic. Químico Farmacéutico Biológico

Protocolo de Servicio Social

“Tolerancia al amonio de bacterias probióticas aisladas de los productos comerciales PROBION-forte y SPOMUNE”

Modalidad: Investigación

Lugar de realización del servicio social: Laboratorio de Biotecnología y Laboratorio de Biología Molecular, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco

Asesora interna: Patricia Martínez Cruz, Departamento Sistemas Biológicos, CBS, UAM-X

Asesora externa: Aída Hamdan Partida, Departamento Atención a la Salud, CBS, UAM-X

Fecha de inicio: 30/ENE/23

Fecha de término: 01/OCT/23

Revisado y aprobado por:



M. en B. Patricia Martínez Cruz
Asesora interna.
No. Económico 18488
Laboratorio de Biotecnología
Departamento Sistemas Biológicos
CBS, UAM-X



Dra. Aída Hamdan Partida
Asesora externa
No. Económico 26343
Laboratorio de Biología Molecular
Departamento Atención a la Salud
CBS, UAM-X

RESUMEN

La acuicultura es una actividad que consiste en cultivar organismos acuáticos de agua dulce o salada. En esta práctica se suelen emplear antibióticos durante la producción, principalmente para impedir la propagación bacteriana y para tratar enfermedades causadas por las mismas, así como desinfectantes en la manipulación de pescado. Lamentablemente, el uso de estos no se ha llevado de forma responsable y representa graves consecuencias como la bioacumulación de concentraciones no mesurables de antibióticos en humanos, resistencia bacteriana a estos productos y contaminación del agua debido a los residuos de estos. Una alternativa al uso de antibióticos es el empleo de probióticos los cuales estimulan la respuesta inmune de los peces y el apetito de los mismo, fortalecen su microbiota, mejoran la salud, el crecimiento y desarrollo de los animales, así cómo se ha observado que tienen un impacto en la calidad del agua de los estanques ya que reducen la concentración de los compuestos nitrogenados. por lo tanto, en el presente trabajo se llevará a cabo el aislamiento y la identificación de las bacterias probióticas contenidas en los productos comerciales PROBION-forte y SPOMUNE.

ABSTRACT

Aquaculture is an activity that consists of cultivating freshwater or saltwater aquatic organisms. In this practice, antibiotics are usually used during production, mainly to prevent bacterial spread and to treat diseases caused by them, as well as disinfectants in fish handling. Unfortunately, their use has not been carried out responsibly and represents serious consequences such as the bioaccumulation of non-measurable concentrations of antibiotics in humans, bacterial resistance to these products and water contamination due to their residues. An alternative to the use of antibiotics is the use of probiotics which stimulate the immune response of the fish and their appetite, strengthen their microbiota, improve the health, growth and development of the animals, as well as it has been observed that they have an impact on the quality of pond water since they reduce the concentration of nitrogenous compounds. Therefore, in the present work the isolation and identification of the probiotic bacteria contained in the commercial products PROBION-forte and SPOMUNE will be carried out.

MARCO TEÓRICO

1. Acuicultura

La acuicultura es una actividad que consiste en cultivar organismos acuáticos de agua dulce o salada, es decir, es el proceso mediante el cual se crían, en condiciones controladas, organismos acuáticos como peces, moluscos, crustáceos, mariscos, anfibios y algas con el fin de incrementar su producción. Esta actividad también engloba la planificación y desarrollo para la producción, mantenimiento y comercialización de dichas especies, haciendo uso de infraestructura especializada. En 2018, la producción mundial acuícola de pescado alcanzó 82,1 millones de toneladas, 32,4 millones de toneladas de algas acuáticas y 26 000 toneladas de conchas marinas ornamentales y perlas ornamentales, lo que eleva el total a un máximo histórico de 114,5 millones de toneladas (FAO, 2021).

Esta práctica convierte lagos o presas en zonas de aprovechamiento de recursos naturales marinos mediante tres sistemas: el extensivo, el cual se lleva a cabo en estanques de cinco o más toneladas y los semi-intensivos e intensivos, que son aquellos que se realizan en estanques de aproximadamente una hectárea. Al mismo tiempo, contribuye al crecimiento y estabilidad del sistema alimentario, conservación de especies acuáticas, incremento de niveles de nutrición, manufactura de materias primas de uso industrial y farmacéutico y fomento del autoempleo y erradicación de la pobreza (SADER, 2019).

Sin embargo, también se han registrado efectos ambientales no deseados que incluyen conflictos sociales y daños a diferentes ecosistemas tales como (FAO, 2021). De la misma manera, el crecimiento acelerado de la acuicultura y su intensificación expone a los peces de cultivo a condiciones estresantes, como lesiones o la muerte de organismos acuáticos resultado de la temperatura adversa del agua, la baja concentración de oxígeno disuelto, la sobresaturación de los gases, la salinidad y toxicidad del agua, las cuales conllevan al desarrollo de enfermedades y pérdidas económicas (Global Seafood Alliance, 2019). OJO: hoy en día, muchas de estas situaciones se resuelven con el empleo de sistemas acuícolas de recirculación (SAR o RAS en inglés), sin embargo, el tema del uso de antibióticos sigue siendo el problema

Los principales problemas a los que se enfrenta la cría intensiva de organismos acuáticos son el control de enfermedades infecciosas y la toxicidad a metabolitos producidos. La primera se debe al poco control de antibióticos para combatir las enfermedades de origen bacteriano, lo cual, ha generado la aparición de resistencias en numerosas bacterias patógenas y la última se refiere a los efectos

nocivos de concentraciones elevadas de metabolitos como dióxido de carbono, amoníaco, nitrito y sulfuro de hidrógeno, así como metales pesados y productos químicos agrícolas e industriales (Global Seafood Alliance, 2019). Entre las posibles estrategias alternativas, la utilización de probióticos parece ser una de las más sostenibles, por ser organismos vivos que modulan el microbiota intestinal, y son seguros para los animales, consumidores y medio ambiente (Martínez P., *et al.* 2012) (Gómez M., 2020).

El uso de probióticos en acuicultura va en aumento debido a que las enfermedades infecciosas representan la mayor limitación de esta actividad y constituyen un enorme desafío para el crecimiento poblacional.

2. Probióticos en acuicultura

En 1974, se estableció la primera definición de probiótica propuesta por Parker, quien los describió como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal”. De manera general, se considera probiótico a los suplementos alimenticios que contienen microorganismos vivos, muertos o ambos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, proporcionan un beneficio a la salud del huésped. La definición de probiótico desde el punto de vista de la acuicultura se refiere a los aditivos acuosos en forma de múltiples cepas o individuales, las cuales se emplean para mejorar la calidad del agua, reforzar la respuesta inmune y fisiológica de los animales acuáticos y de la misma manera reducir el uso de compuestos sintéticos como los antibióticos. (Pérez M., *et al.* 2020). Gracias al uso de estos microorganismos, se obtienen beneficios para la salud de los animales, su desempeño productivo y su crecimiento (BIOMIN, 2022).

Los probióticos pueden ser aislados a partir de varias fuentes, las principales son el microbiota del tracto digestivo (TD) y el mucus de los organismos acuáticos. El microbiota de los animales influye de manera directa sobre la nutrición y salud de estos, por lo que su alteración afecta su estatus fisiológico incluyendo la inmunidad, crecimiento, desarrollo general y la calidad final del producto. Ésta presenta funciones metabólicas, tróficas y protectoras. El propósito de la función metabólica es participar en procesos de digestión y absorción de nutrientes para proporcionar energía al organismo. La función trófica tiene como objetivo el crecimiento y diferenciación celular, además de estimular el sistema inmune del organismo; mientras que la función protectora existe desde el nacimiento del animal, ya que actúa como primera línea de defensa contra agentes externos patógenos (Mosquera, *et al.* 2019).

En animales acuáticos, el microbiota va a estar influenciada por la constante interacción entre el ambiente y el animal, de tal manera que los peces y los microorganismos comparten el mismo ecosistema. Por lo tanto, la colonización bacteriana está determinada por su contacto con el ambiente circundante y es influenciada por la ingesta de alimento, la secreción hormonal, la absorción de nutrientes, la presencia de proteínas y de enzimas digestivas (Mosquera, *et al.* 2019).

Para que un microorganismo pueda ser considerado un probiótico debe cumplir con ciertas características como: no dañar al huésped, ser aceptado por éste a través de la ingestión, colonización y posterior reproducción dentro del mismo; deben tener capacidad de llegar a los órganos principales donde van a ejercer su beneficio y no deben tener resistencia a los virus o genes de resistencia antibacteriana. Una de las características más importantes de las bacterias probióticas usadas en acuicultura es la actividad antimicrobiana, para así poder inhibir de forma competitiva a las bacterias patógenas presentes en diferentes especies acuáticas, como lo son: *Lactococcus garvieae*, *Listonella anguilla-rum*, *Aeromona hydro-phila*, *Photobacterium damsela*, *Vibrio vulnificus*, entre otras (Watts, *et al.* 2017).

Los probióticos comúnmente usados en acuicultura, pertenecen a diferentes grupos de bacterias Gram-positivas, como las bacterias ácido lácticas y los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Roseobacter*. Igualmente, aunque de menor interés los géneros *Aeromonas*, *Alteromonas* y *Flavobacterium*, entre otros. No solamente se consideran a las bacterias como probióticos, se ha descubierto que los bacteriófagos, las microalgas y las levaduras también se pueden emplear como probióticos en esta área. Otra alternativa para el cuidado de la salud de los animales acuáticos es el uso de fagos, ya que se ha observado que los fagos lisogénicos tienen la capacidad de transformar las cepas bacterianas no virulentas en virulentas (Pérez M., *et al.* 2020).

3. Toxicidad de compuestos nitrogenados

La calidad del agua es un factor fundamental en la acuicultura, puesto que de ella dependerá que el desarrollo de los organismos cultivados sea óptimo, así como los rendimientos que se esperan lograr, debido a que el agua tiene influencia en los tres niveles del desarrollo de estos: la reproducción, el crecimiento y la supervivencia. La calidad del agua representa uno de los principales problemas que afectan diariamente a los cultivos de cualquier especie en acuicultura, esto comprende todas las características físicas, químicas y biológicas que afectan la producción acuícola (Claro, 2019).

Dentro de los principales factores limitantes y que afectan la calidad del agua de la acuicultura se encuentra la eliminación de metabolitos nitrogenados tóxicos, como el amoníaco y nitrito (NO_2^-). El amoníaco es un subproducto proveniente del catabolismo de aminoácidos, el cual es excretado por los peces a través de sus branquias y la orina, también es producido por la descomposición microbiana del alimento no consumido y de las excreciones de las bacterias (Gómez, *et al.* 2020). Se puede encontrar de forma ionizada (NH_4^+), que no representa alta toxicidad para los peces o no ionizada (NH_3), el cual es tóxico para los peces. Cuando los niveles de NH_3 son elevados en el agua, se altera la difusión que se produce de forma natural desde el plasma hacia el agua a través de las branquias, acumulándose este compuesto en el torrente sanguíneo y tejidos, alcanzando niveles letales y subletales y dificultando el crecimiento, daño tisular o incluso la muerte de los animales. (Zuffo, *et al.* 2021).

La acumulación de amoníaco puede provocar una disminución del crecimiento, una mayor vulnerabilidad a las enfermedades, cambios patológicos en la estructura de las branquias, respuestas fisiológicas y de comportamiento y mortalidad. La toxicidad del amoníaco depende de la temperatura, el pH, la salinidad, la edad y la especie de los organismos (Galarza, *et al.* 2022).

Respecto a la acumulación de nitritos (NO_2^-), ocurre algo similar al amoníaco, ya que en concentraciones de 0.25 mg/L, puede generar problemas de salud en los animales, mientras que, a concentraciones mayores, lleva a los animales a un incremento en el estrés, enfermedades y hasta la muerte. Niveles tóxicos de nitritos evitan el transporte de oxígeno dentro del torrente sanguíneo de los peces, lo que hace que la sangre adopte un color marrón.

Por otro lado, los nitratos (NO_3^-) son mucho menos tóxicos que los otros compuestos nitrogenados. Los peces pueden tolerar niveles por encima de los 300 mg/L. Estos pueden llegar a ser nocivos para los peces solo en concentraciones mayores a 300-500 ppm. Por su parte, las bacterias nitrificantes son absolutamente reguladoras del equilibrio en el sistema, ya que metabolizan al amoníaco oxidándolo a nitrito y éste a nitrato (Mesa, 2021).

4. Aislamiento de bacterias

El aislamiento de microorganismos implica un conjunto de técnicas empleadas para extraer y separar a las especies de microbios de interés desde su hábitat natural hasta uno *in vitro*. La mayoría de los microorganismos identificados y conocidos en la actualidad, son aquellos que han logrado ser aislados y contenidos en medios

que simulan, en parte, las condiciones intrínsecas de los lugares donde habitan. En la actualidad, se han desarrollado técnicas precisas para el aislamiento y el crecimiento de muchos microorganismos diferentes obtenidos desde casi cualquier medio ambiente sobre la biósfera (González, 2020).

Este proceso comienza con la recolección de una muestra dónde se encuentran los microorganismos de interés. La toma de la muestra se lleva a cabo mediante ayuda de un contenedor sanitizado, para posteriormente sembrarlo en un medio con los requerimientos de necesarios para el crecimiento del microorganismo. Este proceso se conoce como “cultivo del microorganismo”. Generalmente, en la toma de muestra no solo se encuentra el microorganismo de interés, se encuentra una población de varios microorganismos juntos por eso este cultivo se denomina “cultivo mixto”. Sin embargo, la mayoría de las especies de microorganismos pueden ser aisladas en medios específicos, para obtener cultivos donde solo crezca la especie de interés, es decir, obtención de “cultivos puros”. (González, 2020).

Existen diferentes técnicas y elementos que intervienen en el aislamiento de microorganismos, uno de los más importantes es el medio de cultivo. Un medio de cultivo es un sustrato o solución de nutrientes en los que crecen y se multiplican los microorganismos en un laboratorio, con el fin de aislarlos y/o identificarlos, y realizar estudios complementarios (EduLabC, 2019). Es importante destacar que las técnicas de aislamiento, identificación y cultivo bacteriano son en general procesos sencillos, se puede obtener la producción exclusiva de algún metabolito de interés, se puede controlar el pH del medio, así como adicionar nutrientes cuando se requiera. Sin embargo, los bioprocesos son lentos a comparación de los procesos químicos además de que se necesita de una zona estéril o de lo contrario habrá contaminación cruzada (Instituto Tecnológico de Conkal, 2021).

Los medios de cultivo se pueden clasificar de acuerdo con su:

- Consistencia: líquidos, los cuales contienen nutrientes y sustancias capaces de mantener un pH estable. Los sólidos que se obtienen agregando agar y los semisólidos con la capacidad de conservar cepas bacterianas y registrar bacterias móviles.
- Origen: se dividen en sintéticos y medios naturales. Los sintéticos o químicamente definidos, son medios compuestos por productos químicos definidos y son útiles para realizar estudios metabólicos. Por otro lado, los medios naturales o químicamente no definidos son aquellos que se preparan a partir de sustancias naturales animales o vegetales.
- Composición y utilización: existe una subclasificación en este rubro. Podemos encontrar medios simples, enriquecidos, selectivos, diferenciales y

de enriquecimiento. Los medios simples son aquellos que poseen los nutrientes necesarios para permitir el desarrollo bacteriano en general, por ejemplo: agar y caldo nutritivo. Los enriquecidos son medios simples a los que se le añaden elementos como sangre, suero, glucosa, vitaminas, entre otros; estos medios no contienen inhibidores por lo que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, incluyendo cepas exigentes desde un punto de vista nutricional, algunos ejemplos son: agar sangre y agar chocolate. Por otro lado, los medios selectivos se consiguen añadiendo al agar nutritivo compuestos químicos nocivos para algunas bacterias que no son de interés, por ejemplo: agar Mac Conkey y agar Lowenstein-Jensen. A los medios diferenciales se les adiciona sustancias para que únicamente crezcan ciertas bacterias y cuando estas reaccionan a una sustancia adicionada permiten observarlas macroscópicamente, ejemplo: agar eosina azul de metileno (EMB) y agar Salmonella-Shigella. Por último, los de enriquecimiento son medios líquidos que permiten el crecimiento bacteriano cuando la muestra es muy pequeña, por ejemplo: caldo tioglicolate y caldo tetrionato (La Cruz, 2022).

Existen una gran variedad de microorganismos y medios de cultivo, no existiendo por lo tanto un medio universal. Es por ello que para elegir el adecuado hay que tomar en cuenta la fisiología del microorganismo que desea aislar, ya que sus requerimientos nutricionales son fundamentales.

5. Técnicas de identificación bacteriana

Existen diferentes métodos para la identificación bacteriana, entre ellos encontramos: métodos basados en criterios morfológicos, en tinción diferencial, en pruebas bioquímicas, en tipificación con fagos, en pruebas serológicas y métodos basados en detección molecular (Madigan, *et al.* 2015).

5.1 Métodos basados en criterios morfológicos

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas (Bou, *et al.* 2011).

5.2 Métodos basados en tinción diferencial

Uno de los métodos de tinción diferencial es la tinción Gram, esta diferencia casi todas las especies bacterianas en dos grupos: Gram positivas (púrpura) y Gram negativas (rosas), según las características de su pared celular. La pared celular es

esencial, ya que protege y da forma a la bacteria, y participa en la inducción de enfermedades en el huésped infectado. Las bacterias que tienen una capa gruesa de peptidoglicano retienen la tinción primaria, por eso se tiñen de morado y esto nos indica que la bacteria pertenece al grupo de las Gram positivas; al contrario de las Gram negativas que se tiñen de rosa debido a que su pared celular tiene una capa fina de peptidoglicano y una membrana externa que no retiene la tinción (Labster, 2021).

Esta técnica se basa en una serie de pasos donde se emplean 4 reactivos diferentes. El primer paso es la fijación, la cual se refiere a tomar una pequeña muestra del cultivo que contiene la cepa de interés, se deposita en un portaobjetos, se fija con fuego y posteriormente se empiezan a agregar los reactivos en el siguiente orden: 1) cristal violeta durante 1 minuto, este reactivo tiene una carga positiva, lo que permite la unión a la pared celular cargada negativamente; 2) yodo o lugol durante otro minuto, este reactivo ayuda a la fijación del cristal violeta; 3) el alcohol etílico al 95% (etanol) durante 30 segundos, este reactivo ayuda a decolorar las bacterias Gram negativas ya que el alcohol disuelve la membrana externa y rompe el peptidoglicano delgado, a diferencia de las Gram positivas que estas no se decoloran debido a que su capa gruesa de peptidoglicano no se disuelve con el alcohol y retiene la tinción del cristal violeta y 4) safranina por 1 minuto, este reactivo se usa como contratinción, tiñendo de rosa a las bacterias Gram negativas, mientras que las Gram positivas permanecen teñidas de púrpura. Cada reactivo debe ser enjuagado con agua destilada transcurrido el tiempo indicado de cada uno para realizar la tinción (Labster, 2021).

5.3 Métodos basados en pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten identificar las características metabólicas de las bacterias, las cuales también son útiles para su identificación. Las dos pruebas bioquímicas más comunes y rápidas de llevar a cabo son la prueba de catalasa y la de oxidasa. La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas, por lo tanto, cuando se observan burbujas la prueba es positiva, en ausencia de estas, la prueba es negativa, esta prueba se realiza tomando una pequeña muestra de la cepa colocándola sobre un portaobjetos y se añaden unas gotas de peróxido de hidrógeno, posteriormente se observa la presencia o ausencia de burbujas. Por otro lado, la prueba de oxidasa se emplea para determinar si hay o no presencia del complejo enzimático denominado citocromo oxidasa c, se emplean colorantes como parafenilendiamina e indofenol, estos actúan como sustratos receptores y donadores artificiales de electrones. Por lo

tanto, si la parafenilendiamina es oxidada por el sistema del citocromo oxidasa c, se va a colorear de azul-púrpura, en cambio, si la sustancia aceptora de electrones en la cadena respiratoria es diferente a oxígeno, no habrá coloración (microorganismos anaerobios), esta prueba se realiza tomando una muestra de la colonia colocándola en un papel filtro, se le adicionan unas gotas de los reactivos previamente mencionados y se interpretando los resultados después de unos 5-10 segundos (Bou, *et al.* 2011).

5.4 Métodos basados en biología molecular

5.4.1. PCR. Actualmente existen métodos basados en biología molecular que permiten detectar secuencias de ADN propias de un agente microbiano. Uno de los métodos moleculares más utilizados es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual se aplica generalmente cuando los microorganismos no pueden ser cultivados por métodos convencionales. Esta técnica consiste en un proceso de 4 etapas: primero se deben separar las cadenas de ADN aumentando la temperatura, la cual rompe los enlaces de hidrógeno que las mantiene unidas. Luego se adicionan cebadores, que son cadenas cortas de polinucleótidos los cuales se unen a cada una de las cadenas de ADN que se desea amplificar. En la tercera etapa se debe disminuir la temperatura para permitir la hibridación de los cebadores con las cadenas de ADN, por complementariedad de bases y, por último, se adiciona la ADN polimerasa, los cuatro nucleótidos (ATP, GTP, TTP, CTP) y demás cofactores, para que tenga lugar la síntesis de la cadena complementaria. Este procedimiento se realiza en un equipo denominado termociclador, que permite regular las diferentes temperaturas que se requieren para cada uno de los pasos (Madigan, *et al.* 2015).

5.4.2. Identificación filogenética. La filogenia es la evolución de un grupo de organismos genéticamente relacionados. Es un ordenamiento de relaciones anidadas y jerárquicas de determinadas especies. Estas relaciones evolutivas son ilustradas mediante un árbol filogenético, una representación gráfica de dicha historia. Esto no solo nos indica las relaciones evolutivas entre las secuencias o especies, sino también nos indica sus ancestros y la distancia entre ellas. Generalmente, este método se basa en el análisis de ARNr 16S que es el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa. Este es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosomal ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, es un componente crítico en la función celular, el ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación (Bou, *et al.* 2011).

Bacillus subtilis

Este organismo fue una de las primeras bacterias estudiadas y se denominó *Vibrio subtilis* en 1835 y *Bacillus subtilis* en 1872. Es uno de los organismos bacterianos mejor caracterizados y es un sistema modelo para la diferenciación y el desarrollo celular. Esta bacteria del suelo puede dividirse asimétricamente, produciendo una endospora que es resistente a factores ambientales como el calor, el ácido y la sal, y que puede persistir en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo. La endospora se forma en momentos de estrés nutricional, lo que permite que el organismo persista en el medio ambiente hasta que las condiciones se vuelvan favorables. Antes de la decisión de producir la espora, la bacteria puede volverse móvil, a través de la producción de flagelos, y también tomar ADN del medio ambiente a través del sistema de competencia. El proceso de esporulación es complejo e involucra la regulación coordinada de cientos de genes en el genoma. Las señales ambientales son detectadas por sistemas bacterianos de dos componentes que inician una fosforescencia que transfiere fosfato a uno de los primeros reguladores transcripcionales clave, Spo0A. Este paso inicial da como resultado la división celular asimétrica coordinada y la formación de endosporas a través de múltiples etapas que producen una sola espora a partir de la célula madre. Esta cascada de regulación génica se estudia intensamente (NCBI, 2021). El aislamiento se puede llevar a cabo por medio de la suspensión aséptica de 1 g de muestra en 5 mL de agua destilada estéril, con agitación vigorosa en vórtex por 20 s (Solución madre). A partir de esta solución, se tomó 0.1 mL que se inoculó en placas Petri con medios Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Plate Count (PCA) y Agar Nutritivo (AN) e incubadas a 35°C durante 24 h (Méndez, *et al.* 2017).

7. *Clostridium butyricum*

Este género comprende alrededor de 150 especies metabólicamente diversas de anaerobios que son ubicuos en prácticamente todos los hábitats anóxicos donde hay compuestos orgánicos, incluidos los suelos, los sedimentos acuáticos y el tracto intestinal de animales y humanos. La característica de los clostridios es la forma de sus células que se asemeja a una baqueta huso ("kloster" en griego significa "huso"). Esta forma se atribuye a la presencia de endosporas que se desarrollan en condiciones desfavorables para el crecimiento vegetativo y distienden las células individuales de manera terminal o subterminal. Las endosporas de muchas especies son extremadamente resistentes y sobreviven a la ebullición prolongada en agua y la exposición al aire. Las esporas germinan en condiciones favorables

para el crecimiento vegetativo, como la anaerobiosis y la presencia de sustratos orgánicos. Desde la perspectiva evolutiva, los clostridios se consideran las bacterias más antiguas. Se cree que las Mollicutes (*Eubacteria*) actuales han evolucionado de forma regresiva (es decir, por reducción del genoma) a partir de ancestros Gram positivos similares a clostridios con un bajo contenido de GC en el ADN. Varias especies de clostridios (p.ej., *C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. tetani*) son patógenos productores de toxinas oportunistas conocidos en animales y humanos. Algunas especies son capaces de producir disolventes orgánicos (acetona, etanol, etc.), hidrógeno molecular y otros compuestos útiles. También hay especies que pueden fijar nitrógeno molecular y, por lo tanto, son participantes importantes en el cambio biológico de los compuestos de nitrógeno en la naturaleza. *Clostridium butyricum*. *Clostridium butyricum* está estrechamente relacionado con *Clostridium botulinum* pero difiere con respecto a la producción de lipasa y la fermentación de lactosa. Cepas no toxigénicas de *Clostridium butyricum* se aíslan rutinariamente de las heces de humanos sanos. Estas cepas se han utilizado como probióticos y en la producción de butirato. Las cepas toxigénicas producen una toxina similar a la toxina tipo E producida por *C. botulinum* y se han aislado de casos de botulismo, a menudo en lactantes (NCBI, 2021).

Clostridium butyricum (*C. butyricum*) es una bacteria endofítica Gram positiva con propiedades probióticas anaerobias y alta tolerancia al medio gastrointestinal debido a su sistema enzimático digestivo independiente. Puede producir una variedad de sustancias, como enzimas, vitaminas, pequeños péptidos y otros metabolitos, de los cuales el ácido butírico, como uno de sus productos, puede proporcionar energía al huésped. El ácido butírico puede promover el desarrollo del tejido epitelial gastrointestinal y consolidar su función de barrera protectora, facilitar la digestión y absorción del alimento y promover el crecimiento. Varios estudios han informado que los ácidos grasos volátiles (AGV) juegan un papel importante en el metabolismo y la microflora intestinal. Además, otros metabolitos de *C. butyricum*, como el ácido teicoico, promueven la colonización de *C. butyricum* en el tracto intestinal debido a sus propiedades altamente adhesivas. *C. butyricum* secreta enzimas digestivas para mejorar la tasa de conversión alimenticia en el tracto gastrointestinal, y sustancias micropeptídicas (bacteriocina) se adhieren competitivamente a la superficie del epitelio intestinal e inhiben la invasión de bacterias patógenas. Estas secreciones regulan la estructura y composición de las bacterias *in vivo*, mejoran la homeostasis del medio interno y favorecen el crecimiento y desarrollo del ganado (Zhang, et al. 2022).

8. *Rhodobacter capsulatus*

Las bacterias que pertenecen al grupo *Rhodobacter* son metabólicamente versátiles, ya que pueden usar la fotosíntesis y por lo general, pueden crecer tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas. La mayoría son capaces de fijar nitrógeno.

8.1 *Rhodobacter capsulatus*. se conocía anteriormente como *Rhodopseudomonas capsulata*. Este organismo es una bacteria púrpura no sulfurosa facultativamente fototrófica y la especie tipo del grupo *Rhodobacter*. El color de la colonia depende en gran medida de la cantidad de oxígeno presente en su entorno. Si bien es capaz de producir energía celular de varias maneras diferentes, puede depender de la fotosíntesis anoxigénica en condiciones anaeróbicas en presencia de luz. La formación de complejos de pigmentos proteicos necesarios para estos procesos fotosintéticos solo se induce cuando la tensión de oxígeno cae por debajo de un valor umbral, de ahí el color variable de las colonias. Estas bacterias también son capaces de fijar nitrógeno. Algunas cepas producen el elemento de transferencia de genes (GTA), una partícula profágica capaz de transferir material genético entre cepas (NCBI, 2021).

El medio de cultivo anaeróbico óptimo para esta bacteria es a pH 6,8 y 30 °C en medio RCV modificado. El RCV medio modificado, el cual contenía Na-lactato (35 mM), Na-Glutamato (7 mM), tampón fosfato (K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 5,17 y 4,41, mM), y una solución de sales que contiene diferentes sales como oligoelementos como Mo (1,5 μ mol) y Fe (42 μ mol) (Deseure, *et al.* 2021).

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En la acuicultura, se utilizan antibióticos durante la producción, principalmente para impedir la propagación bacteriana y para tratar enfermedades causadas por las mismas, así como desinfectantes en la manipulación de pescado. Lamentablemente, el uso de antibióticos en acuicultura no se ha llevado de forma responsable y representa graves consecuencias como el consumo de antibióticos de manera no mesurable en humanos, resistencia bacteriana en el huésped y en los consumidores, contaminación del agua debido a los residuos de estos y los desechos de los peces. Es por esto por lo que la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre otras entidades gubernamentales, han planteado el uso irresponsable de antibióticos en todos los sectores de producción, con especial referencia a los riesgos potenciales para la salud pública (FAO, 2021). Por tal motivo

se han buscado alternativas al uso antibióticos en acuicultura y una de ellas es el uso de probióticos dados los beneficios que se han reportado con su uso en la producción intensiva de especies acuáticas.

JUSTIFICACIÓN

Los probióticos ofertan mayores beneficios que los antibióticos en la acuicultura, cómo, por ejemplo: estimulan la respuesta inmune de los peces y el apetito de los mismo, fortalecen su microbiota, mejoran la salud, el crecimiento y desarrollo de los peces, así cómo se ha observado que tienen un impacto en la calidad del agua de los estanques ya que reducen los compuestos nitrogenados y por lo tanto disminuye el índice de toxicidad obteniendo productos de calidad y mayores rendimientos.

En el presente trabajo se llevará a cabo el aislamiento y la identificación de las bacterias contenidas en los productos probióticos comerciales PROBION-forte y SPOMUNE, así como su tolerancia al amonio.

OBJETIVOS

General:

Aislar las bacterias probióticas de los productos comerciales PROBION-forte y SPOMUNE, y determinar su tolerancia al amonio.

Específicos:

1. Aislar las bacterias probióticas de los productos comerciales PROBION-forte y SPOMUNE
2. Generar biomasa de los microorganismos aislados, empleando un medio de cultivo a base de piloncillo al 1%.
3. Adaptar los microorganismos anteriores, a concentraciones de 0.1 mg/L de amoniaco industrial
4. Determinar la capacidad de microorganismos probióticos contenidos en suplementos acuícolas, para crecer y degradar amoniaco industrial en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.12, mg/L.
5. Identificar microbiológica y molecularmente a los microorganismos probióticos aislados.

METODOLOGÍA

1. Aislamiento de bacterias probióticas

El polvo de los probióticos SPOMUNE y PROBION-forte, se suspendió en solución isotónica estéril y se sembró en los medios de cultivo Infusión Cerebro Corazón y caldo soya tripticaseína. Se incubarán a 30°C, y una vez que se obtenga biomasa, se resembrarán en los siguientes medios de cultivo:

- Agar MRS
- Agar BHI
- Agar nutritivo
- Agar para *Clostridium*

La incubación de los tres primeros medios se llevará a cabo en condiciones de microaeración, mientras que en los últimos 2 casos se utilizará una atmósfera anaerobia estricta, todos a una temperatura de 30°C.

2. Aislamiento de bacterias asociadas al ciclo del Nitrógeno

El polvo de los probióticos SPOMUNE y PROBION-forte, se suspenderá en solución isotónica estéril y se inocularán en los siguientes medios de cultivo selectivos: para las **bacterias amonificadoras** (g/L): NH₄Cl, 3.6; NaHCO₃, 17.8; K₂HPO₄, 0.4; MgSO₄·7H₂O, 0.41 y NaCl, 1.25 a pH 7.8 (Okabe y col. 2005); para la evaluación de **bacterias nitrificantes que forman nitritos** (g/L): (NH₄)₂SO₄, 50; K₂HPO₄, 1.0; FeSO₄·7H₂O, 0.03; NaCl, 0.3; MgSO₄·7H₂O, CaCO₃, 7.5 g. Para evaluar **bacterias nitrificantes productoras de nitratos**, se empleará (g/L): KNO₂, 0.006; K₂HPO₄, 2; NaCl, 0.3; MgSO₄·7H₂O, 0.1; FeSO₄·7H₂O, 0.03; CaCO₃, 1; CaCl₂, 0.3, y para evaluar las **bacterias desnitrificantes** (g/L): KNO₃, 1; Asparagina, 1; Solución alcohólica de bromotimol; 5 ml; Citrato de sodio, 8.5 g; KH₂PO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 1; CaCl₂·6H₂O, 0.20; FeCl₃·6H₂O, 0.05. Todos los matraces se incubarán a 28°C, 150 rpm, entre 8 12 semanas de acuerdo a la generación de biomasa observada.

La incubación de los tres primeros medios se llevará a cabo en condiciones de microaeración, mientras que en los últimos 2 casos se utilizará una atmósfera anaerobia estricta, todos a una temperatura de 30°C.

3. Identificación bacteriana

a) Tinción de Gram

Se tomará una muestra representativa de cada aislado bacteriano para realizarles tinción Gram, posteriormente se observarán al microscopio con el objetivo 100X y aceite de inmersión; esto para determinar si las bacterias aisladas eran Gram positivas o Gram negativas, así como la morfología celular de las colonias, como cocos, bacilos, etc. (Méndez, 2017).

b) Pruebas bioquímicas

Para corroborar la identidad de las bacterias aisladas, se realizarán las pruebas bioquímicas de catalasa, movilidad, indol, fermentación de glucosa, fermentación de lactosa, sulfhídrico, presencia de ácidos y presencia de gas.

4. Liberación de los Probióticos

Se realizará una digestión de los productos con solución de simulado de jugo gástrico (ácido clorhídrico HCl 0.1N), de acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 11, Tomo I, con simulado de jugo gástrico. Lo anterior, con el objetivo de extraer el microbioma de los productos y aislamiento de las diferentes bacterias contenidas en las muestras (FEUM; 2011).

5. Análisis molecular

La muestra de extracción del ADN de los productos SPOMUNE y PROBION-forte, se realizará, a través del Kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep ZYMO RESEARCH de la siguiente manera (Deng, 2022) cuyo procedimiento es el siguiente:

Agregaré la muestra al tubo de lisis ZR BashingBead™ (0.1 & 0.5 mm). Se Adicionarán 750 µl de solución de lisis ZymoBIOMICSTM al tubo. Se colocará la muestra en un equipo mini Bead Beater-Plus™ a 2500 rpm durante un minuto, enfriando por 20 segundos en hielo, la homogenización se repetirá cinco veces.

Se centrifugará el tubo de lisis ZR BashingBead™ (0.1 & 0.5 mm) en una microcentrífuga (Thermo Scientific Sorvall™ ST) a 10,000 x g durante un minuto. Se transferirán 400 µl del supernadante al filtro Zymo-Spin™ III-F, colocar en un tubo de colección y centrifugar a 8,000 x g durante un minuto.

Se agregarán 1,200 µl del Buffer ZymoBIOMICSTM DNA Binding al filtrado en el tubo de colección del paso 4 y se mezclará en un vortex (Turbo mixer marca UNICO).

Se transferirán 800 µl de la mezcla del paso 5 a la columna Zymo-Spin™ IICR en un tubo de colección y se centrifugará a 10,000 x g durante un minuto. Se descartará el contenido del tubo de colección y se repetirá el paso 6.

Se adicionarán 400 µl del Buffer 1 ZymoBIOMICSTM DNA Wash a la columna Zymo-Spin™ IICR con un tubo de colección nuevo y se centrifugará a 10,000 x g durante un minuto. Se descartará el contenido del tubo.

Se agregarán 700 µl del Buffer 2 ZymoBIOMICSTM DNA Wash a la columna Zymo-Spin™ IICR en un tubo de colección y se centrifugará a 10,000 x g durante un minuto. Se descartará el contenido del tubo.

Se añadirán 200 µl del Buffer 2 ZymoBIOMICSTM DNA Wash a la columna Zymo-Spin™ IICR con un tubo de colección y se centrifugará a 10,000 x g durante un minuto.

Se transferirán la columna Zymo-Spin™ IICR a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 ml y se gargarán 100 µl de agua libre DNase/RNase ZymoBIOMICSTM, directamente a la columna matriz y se incubará durante un minuto para eluir el DNA. Se colocará el filtro Zymo-Spin™ III-HRC en un nuevo tubo de colección y se adicionarán 600 µl de la solución ZymoBIOMICSTM HRC, después se centrifugará a 8,000 x g durante tres minutos.

Se transferirá el ADN eluido (paso 11) en un filtro Zymo-Spin™ III-HRC en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugará a 8,000 x g durante tres minutos.

Una vez extraído el ADN, se determinará su concentración con un Bio-fotómetro marca Eppendorf modelo D30. La calidad de la extracción del ADN genómico se determinará en un gel de agarosa al 1% (Thakuria *et al.*, 2008).

6. Secuenciación del gen 16S rDNA.

Para realizar la secuenciación masiva del gen 16S rDNA de la región V3 y V4, las muestras y se enviarán a Integrated Microbiome Resource (IMR) en Nueva Escocia, Canadá donde se analizarán con Illumina MiSeq con la química del kit 300 + 300 v3. Los productos de amplificación por PCR de las regiones V4-V5 variables del gen 16S rDNA se obtendrán usando los primers universales 515 F (adaptadores Illumina + 5'GTGYCAGCMGCCGCGGTAA3') y 926 R (adaptadores Illumina + 5'CCGYCAATTYMTTTRAGTTT3'). La multiplexación y secuenciación de amplicones se realizarán con un diseño de doble etiqueta de indexación usando códigos de barras de 8 pb con el kit Nextera XT Index v2 (Illumina, San Diego, CA, USA).

7. Análisis Bioinformático

Los análisis bioinformáticos se realizarán utilizando MOTHUR, versión 1.45.2, siguiendo el SOP de MiSeq (Schloss *et al.*, 2009). Las lecturas seleccionadas deberán cumplir con los siguientes criterios: sin bases ambiguas, una longitud mínima de 400 pb, sin homopolímeros de 8 pb y superiores. El demultiplexado se realizará con una tolerancia de desajuste de código de barras de una base para las etiquetas de identificador molecular de 8 bases.

Las unidades taxonómicas operativas (OTU) se asignarán a lecturas calificadas con un 3% de disimilitud usando un algoritmo promedio-vecino, las lecturas quiméricas se identificaron y excluyeron usando UCHIME (Edgar *et al.*, 2011) para evitar números de OTU's altos, usando los comandos recomendados de MOTHUR. La diversidad y riqueza de especies, así como las curvas de rarefacción se calcularán al 97% de similitud, como parte de la cartera de diversidad alfa de MOTHUR, con la base de datos de alineación de referencia bacteriana Silva (Yilmaz *et al.*, 2014). Se calcularán cinco métricas para evaluar las comunidades bacterianas, incluyendo el número de OTU observadas, el índice de diversidad de Shannon y los estimadores Inv- S.

RESULTADOS

Durante la experimentación, se pudo observar el comportamiento de los probióticos en las diferentes fases, lo que llevó a la modificación de algunos pasos de la metodología inicial con el fin de obtener resultados óptimos.

CUANTIFICACIÓN BACTERIANA

Para realizar la cuantificación de las Unidades formadoras de colonias (UFC) de cada probiótico y el aislamiento bacteriano, se llevó a cabo una digestión ácida de los probióticos comerciales con el fin de liberar su contenido. Este procedimiento se basó en el siguiente principio:

Para la primera de digestión de PROBION-forte, se prepararon 500 mL de HCl 0.1 N, de los cuales se tomaron 200 mL y se transfirieron a un matraz Erlenmeyer. Posteriormente, se añadieron 500 mg de muestra de probiótico y se mantuvo en agitación constante con un agitador magnético y una parrilla de agitación a una velocidad de 150 rpm a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Durante este lapso, se tomaron muestras de 6 mL cada una en diferentes momentos de agitación: al tiempo 0, 1, 2, 3 y 4, que corresponden a 0 min, 30 min, 60 min, 90 min y 120 min respectivamente.

Las muestras se tomaron con una micropipeta y puntas estériles, después se transfirieron a tubos falcon como se observa en la **Figura 1**.

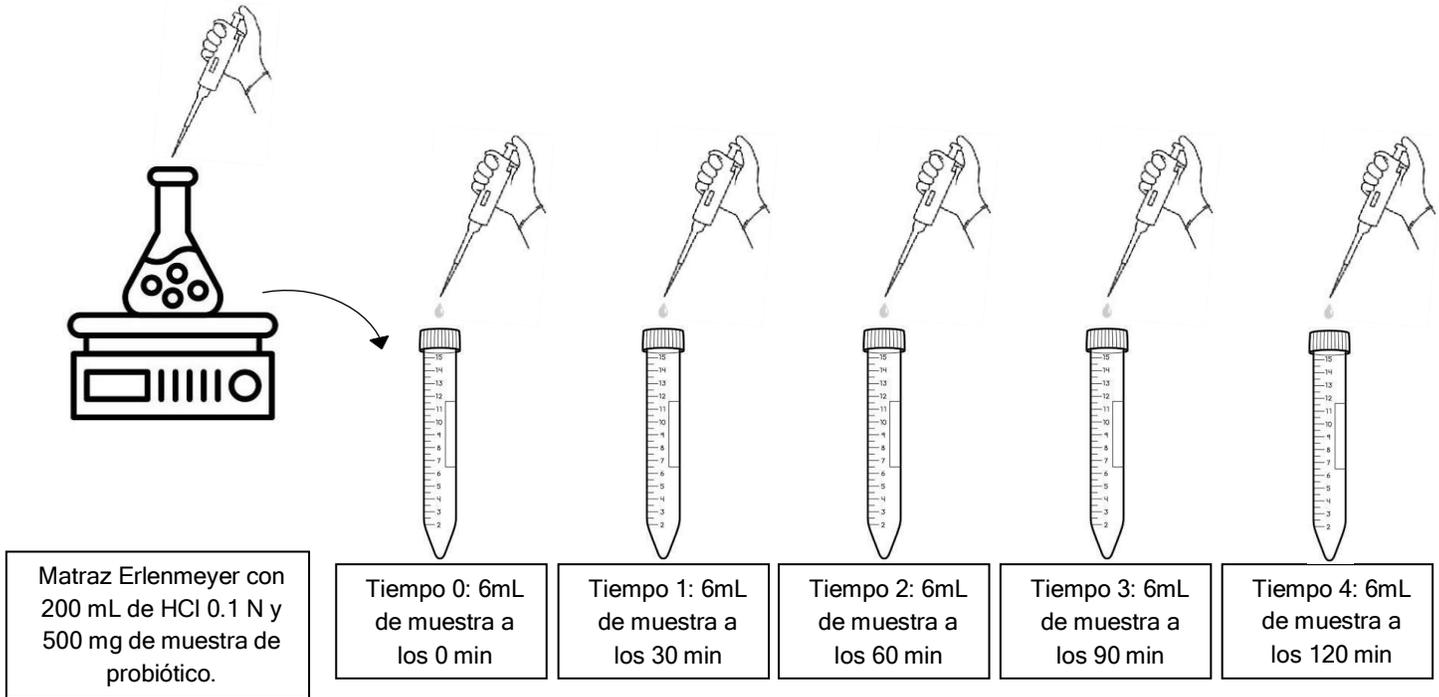


Figura 1. Digestión de probióticos y toma de muestras para conteo bacteriano.

De cada tiempo muestreado se realizaron 4 diluciones para posteriormente realizar el conteo bacteriano. Se tomó 1 mL de muestra de cada tiempo y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución isotónica, se agitó el tubo de ensayo en vórtex para mezclar bien el mL añadido de muestra, se tomó 1 mL de muestra de este tubo y se transfirió a un tubo nuevo con 9 mL de solución isotónica. Este proceso se realizó 3 veces más para obtener los siguientes factores de dilución: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} como se muestra en la **Figura 2**.

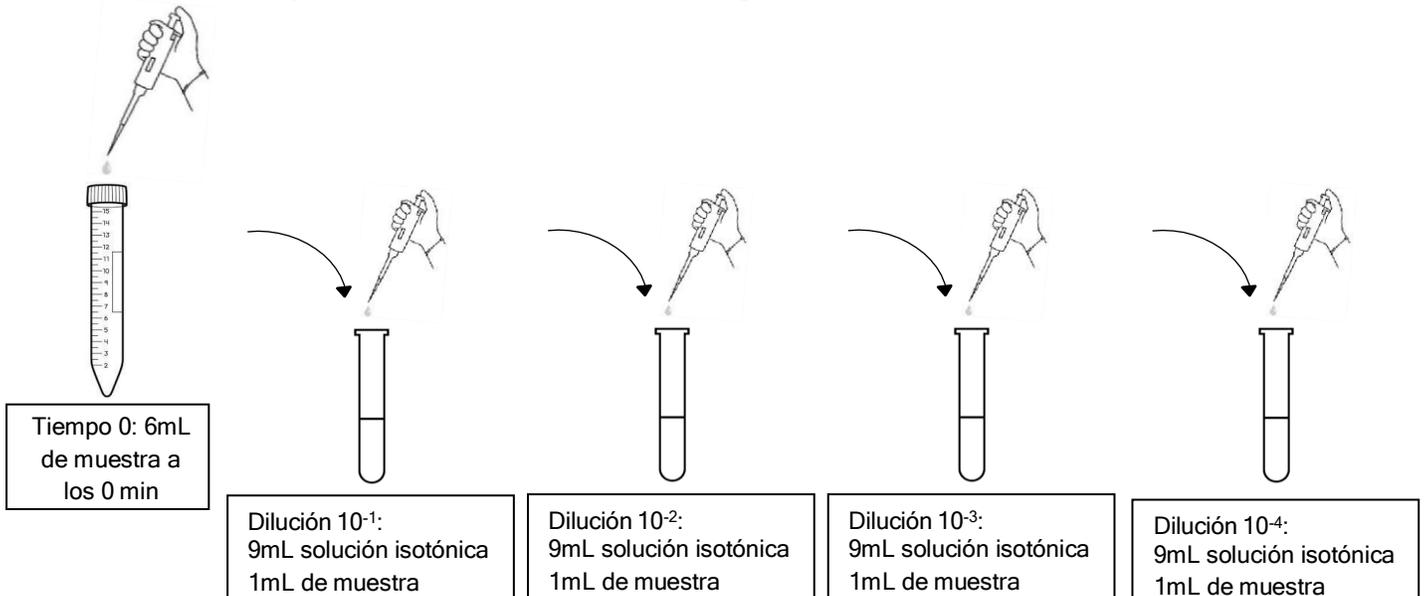


Figura 2. Diluciones para conteo bacteriano de PROBION-forte.

A final de las diluciones de los 5 tiempos muestreados se obtuvo un total de 20 tubos de ensayo, conforme a lo especificado en la **Tabla1**.

Tabla1. Total de diluciones para los tiempos muestreados de la digestión de PROBION-forte.

Tiempo de muestreo	Diluciones			
Tiempo 0: 0 min	10-1	10-2	10-3	10-4
Tiempo 1: 30 min	10-1	10-2	10-3	10-4
Tiempo 2: 60 min	10-1	10-2	10-3	10-4
Tiempo 3: 90 min	10-1	10-2	10-3	10-4
Tiempo 4: 120 min	10-1	10-2	10-3	10-4

Se usó la siguiente codificación para poder distinguir el tiempo y la dilución de cada muestra.

$$T_n^{-n}$$

Donde:

T: Tiempo

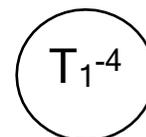
n subíndice: Tiempo de muestreo (0, 1, 2, 3 o 4)

-n superíndice: Número de dilución (-1, -2, -3 o -4)

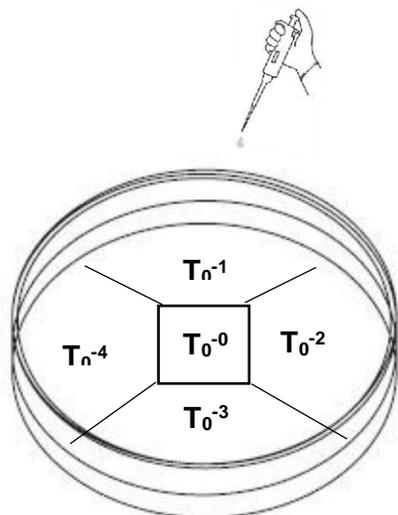
Ejemplo:

Como se muestra en el siguiente ejemplo:

Se refiere a que el Tiempo de muestreo fue el tiempo 1, es decir, a los 30 min, y la dilución fue la 10⁻⁴.



Seguidamente se tomaron 2 μ L de cada tubo de ensayo con las diluciones correspondientes y se inocularon en agar MRS, BHI, Nutritivo y *Clostridium*, como se observa en la **Figura 3**. Se dividió una caja Petri en 5 partes y dejar caer la gota con la muestra cuidando que no escurra o se derrame de su sección.



T_0^{-0} : Tiempo 0 sin dilución
 T_0^{-1} : Tiempo 0, dilución 10^{-1}
 T_0^{-2} : Tiempo 0, dilución 10^{-2}
 T_0^{-3} : Tiempo 0, dilución 10^{-3}
 T_0^{-4} : Tiempo 0, dilución 10^{-4}

Figura 3. Inoculación de agares para conteo bacteriano para PROBION-forte.

La inoculación se realizó para los 5 tiempos de muestreo, en los 4 agares diferentes para observar en que medio de cultivo crecen mejor las cepas y que características fisicoquímicas presentan, además cada agar se realizó por duplicado para incubar en cámara aerobia y anaerobia por 24 horas a 36°C , por lo que al final se contaban con 40 cajas Petri. En la **Tabla 2** se especifican el número de agares y sus condiciones de incubación.

Tabla 2. Total de agares inoculados con las diluciones previas y sus condiciones de incubación para PROBION-forte.

Tiempo	Condiciones							
	MRS		BHI		Nutritivo		Clostridium	
	aerobio	anaerobio	aerobio	anaerobio	aerobio	anaerobio	aerobio	anaerobio
Tiempo 0	1	2	3	4	5	6	7	8
Tiempo 1	9	10	11	12	13	14	15	16
Tiempo 2	17	18	19	20	21	22	23	24
Tiempo 3	25	26	27	28	29	30	31	32
Tiempo 4	33	34	35	36	37	38	39	40

Condiciones de incubación:

Condiciones aerobias: Estufa de incubación microbiológica a 36°C .

Condiciones anaerobias: Cámara de incubación anaerobia a 36°C a.

Jarra de anaerobiosis con GasPak.

Cámara casera para anerobios

La incubación de los agares aerobios no presentó ningún problema o dificultad relacionados a la disponibilidad del equipo, sin embargo, la incubación de agares

anaerobios representó dificultades debido a la disponibilidad del equipo y mantenimiento de dichas condiciones, por esta razón se usaron alternativas para crear las condiciones anaerobias, sin hacer uso de la cámara de anaerobiosis, como lo son: jara con GasPak y la cámara casera.



Figura 5. Cámara casera para generación de condiciones anaerobias.



Figura 4. Jarra con GasPak para generación de condiciones

La jarra con GasPak consistió en meter los agares dentro de una jarra con sello hermético y adicionar un sobre llamado GasPak, el cual contiene catalizadores que son capaces de generar el medio anaerobio, como se observa en la **Figura 4**. Posteriormente se cerró la jarra y se metió a la cámara de anaerobios para mantenerla a una temperatura de 36°C.

La cámara de anaerobios casera consistió en meter los agares en un recipiente, meter un vaso de precipitados con poca agua y un Alka-Setlzer al recipiente con los agares, meter una vela prendida en inmediatamente cerrar el recipiente. Posteriormente se metió a la cámara de aerobios para mantener la temperatura a 36°C. Cómo se observa en la **Figura 5**.

RESULTADOS

Se observó que la digestión del probiótico fue exitosa ya que los agares muestran crecimiento bacteriano. PROBION-forte fue capaz de crecer en los 4 medios de cultivos probados, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, para esta digestión los agares se incubaron en la cámara de anaerobios. Cabe resaltar que, en los agares incubados en condiciones aerobias, el crecimiento bacteriano se observó desde a las 24 horas, a diferencia los agares incubados en condiciones anaerobias, que el crecimiento se observó hasta después de las 24 horas. Se observó el crecimiento de dos cepas distintas.

Sin embargo, la primera prueba no fue favorable para el conteo bacteriano ya que en la mayoría de los agares se observa un apelmazamiento de bacterias debido a

su rápido crecimiento y extensión por todo el agar, por lo que el recuento bacteriano no pudo llevarse a cabo. En la **Figura 6**. Se observa el crecimiento bacteriano.

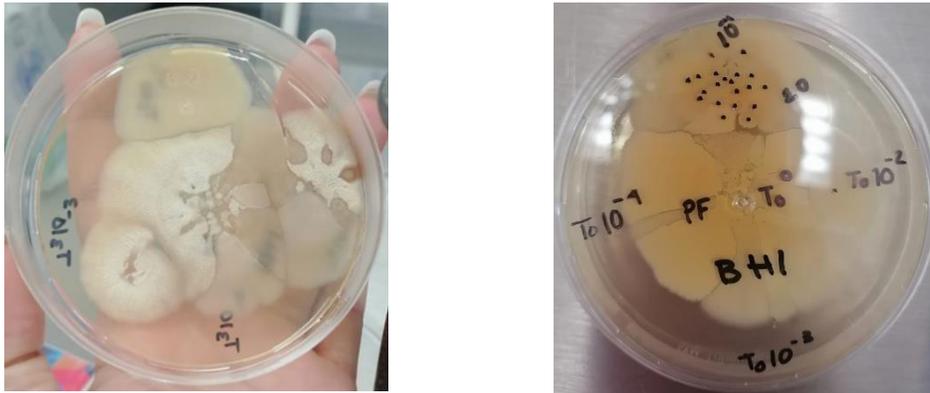


Figura 6. Crecimiento bacteriano de la primera digestión de PROBION-forte.

Se realizó una segunda digestión e inoculación, usando el probiótico SPOMUNE, siguiendo la metodología descrita previamente, con una variación en las diluciones ya que en lugar de ser 4, se hicieron 6, como se observa en la **Figura 7**. Con el objetivo de disminuir la biocarga bacteriana en cada dilución y permitir el recuento bacteriano.

Después de la digestión y la toma de muestras a los 5 tiempos, las diluciones fueron las siguientes:

- T_0^{-0} : Tiempo 0 sin dilución
- T_0^{-1} : Tiempo 0, dilución 10^{-1}
- T_0^{-2} : Tiempo 0, dilución 10^{-2}
- T_0^{-3} : Tiempo 0, dilución 10^{-3}
- T_0^{-4} : Tiempo 0, dilución 10^{-4}
- T_0^{-5} : Tiempo 0, dilución 10^{-5}
- T_0^{-6} : Tiempo 0, dilución 10^{-6}

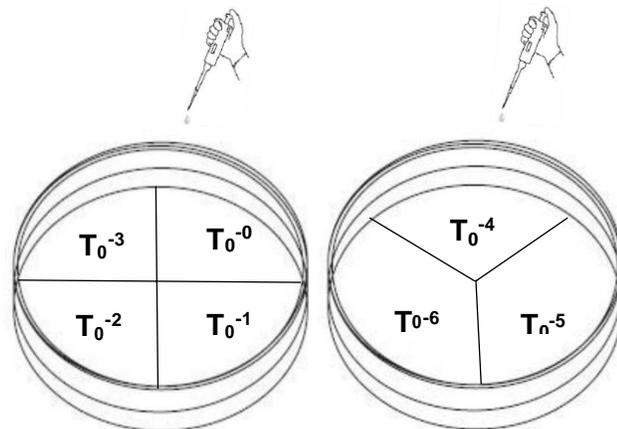


Figura 7. Inoculación de agares para conteo bacteriano de SPOMUNE.

Lo resultados fueron los siguientes:

Se observó que la digestión del probiótico fue exitosa ya que los agares muestran un abundante crecimiento bacteriano. SPOMUNE fue capaz de crecer en los 4 medios de cultivos probados, tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Para esta digestión los agares se incubaron en la jarra con GasPak y la cámara casera de anaerobios, sin embargo, se observó que estos mostraron nulo crecimiento, por lo que se decidió usar la cámara de anaerobios convencional para obtener mejores resultados. Se observa el crecimiento de al menos 7 cepas distintas.

La prueba resultó más efectiva que el primer recuento bacteriano, sin embargo, muchos agares también se observaron con bastante crecimiento bacteriano y, por lo tanto, se registran como incontables.

Debido al rápido crecimiento de las cepas y al apelmazamiento de las mismas, solo se pudo realizar en conteo de algunos agares, los resultados se muestran en las **Tablas 3, 4, 5, 6 7, 8, 9 10, 11 y 12**. De conteo bacteriano.

Tabla 3. Conteo bacteriano del tiempo 0, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_0^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-3}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-4}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-5}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-6}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables

Tabla 4. Conteo bacteriano del tiempo 1, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_1^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-3}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-4}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-5}	22	35	27	20
T_1^{-6}	13	15	8	11

Tabla 5. Conteo bacteriano del tiempo 2, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_2^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_2^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_2^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_2^{-3}	38	61	40	40
T_2^{-4}	23	44	37	25
T_2^{-5}	14	26	21	17
T_2^{-6}	12	13	11	8

Tabla 6. Conteo bacteriano del tiempo 3, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_3^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_3^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_3^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_3^{-3}	20	23	24	19
T_3^{-4}	8	14	16	7
T_3^{-5}	6	4	3	1
T_3^{-6}	0	0	0	0

Tabla 7. Conteo bacteriano del tiempo 4, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_4^{-0}	4	6	5	2
T_4^{-1}	0	0	0	0
T_4^{-2}	0	0	0	0
T_4^{-3}	0	0	0	0
T_4^{-4}	0	0	0	0
T_4^{-5}	0	0	0	0
T_4^{-6}	0	0	0	0

Tabla 8. Conteo bacteriano del tiempo 0, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_0^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-3}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-4}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-5}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_0^{-6}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables

Tabla 9. Conteo bacteriano del tiempo 1, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_1^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-3}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-4}	6	7	6	5
T_1^{-5}	4	4	4	1
T_1^{-6}	1	2	2	1

Tabla 10. Conteo bacteriano del tiempo 2, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_2^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_2^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	22
T_2^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables	12
T_2^{-3}	18	21	22	7
T_2^{-4}	4	4	6	2
T_2^{-5}	0	1	1	0
T_2^{-6}	0	0	0	0

Tabla 11. Conteo bacteriano del tiempo 3, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_3^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_3^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_3^{-2}	11	12	17	9
T_3^{-3}	9	8	10	3
T_3^{-4}	4	5	5	1
T_3^{-5}	0	0	0	0
T_3^{-6}	0	0	0	0

Tabla 12. Conteo bacteriano del tiempo 4, correspondiente a SPOMUNE.

SPOMUNE				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_4^{-0}	8	9	10	5
T_4^{-1}	4	5	5	1
T_4^{-2}	0	2	1	0
T_4^{-3}	0	0	0	0
T_4^{-4}	0	0	0	0
T_4^{-5}	0	0	0	0
T_4^{-6}	0	0	0	0

La fórmula empleada para las unidades formadoras de colonias fue la siguiente:

$$UFC = \frac{(No.de colonias * Factor de dilución)}{g} / \left(\frac{g}{mL \text{ de la solución madre}} \right)$$

Donde:

UFC: Unidades formadoras de colonias

No. De colonias: recuento bacteriano por agar

Factor de dilución: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} o 10^{-6}

El factor de dilución empleado para el cálculo de UFC se muestra en la **Tabla 13**.

Factor de dilución	
10^{-1}	0.1
10^{-2}	0.01
10^{-3}	0.001
10^{-4}	0.0001
10^{-5}	0.00001
10^{-6}	0.0001

Tabla 13. Factor de dilución

Los resultados para el cálculo de UFC para los distintos tiempo y diluciones de SPOMUNE se observan en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Unidades Formadoras de Colonias para los diferentes tiempos y diluciones de SPOMUNE

RESULTADO DE UFC SPOMUNE (UFC/mL)					
CONDICIÓN	MUESTRA	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
AGARES AEROBIOS	T ₁	2.75E+08	4.38E+08	3.38E+08	2.50E+08
	T ₁	1.63E+09	1.88E+09	1.00E+09	1.38E+09
	T ₂	4.75E+06	7.63E+06	5.00E+06	5.00E+06
	T ₂	2.88E+07	5.50E+07	4.63E+07	3.13E+07
	T ₂ ⁻⁵	1.75E+08	3.25E+08	2.63E+08	2.13E+08
	T ₂ ⁻⁶	1.50E+09	1.63E+09	1.38E+09	1.00E+09
	T ₃	2.50E+06	2.88E+06	3.00E+06	2.38E+06
	T ₃	1.00E+07	1.75E+07	2.00E+07	8.75E+06
	T ₃	7.50E+07	5.00E+07	3.75E+07	1.25E+07
	T ₄	5.00E+02	7.50E+02	6.25E+02	2.50E+02
AGARES ANAEROBIOS	T ₁	7.50E+06	8.75E+06	7.50E+06	6.25E+06
	T ₁	5.00E+07	5.00E+07	5.00E+07	1.25E+07
	T ₁ ⁻⁶	1.25E+08	2.50E+08	2.50E+08	1.25E+08
	T ₂ ⁻³	2.25E+06	2.63E+06	2.75E+06	8.75E+05
	T ₂ ⁻⁴	5.00E+06	5.00E+06	7.50E+06	2.50E+06
	T ₂	0.00E+00	1.25E+07	1.25E+07	0.00E+00
	T ₃	1.38E+05	1.50E+05	2.13E+05	1.13E+05

	T_3^{-3} -4	1.13E+06	1.00E+06	1.25E+06	3.75E+05
	T_3	5.00E+06	6.25E+06	6.25E+06	1.25E+06
	T_4^{-0}	1.00E+03	1.13E+03	1.25E+03	6.25E+02
	T_4^{-1} -2	5.00E+03	6.25E+03	6.25E+03	1.25E+03
	T_4	0.00E+00	2.50E+04	1.25E+04	0.00E+00

Los resultados de la segunda digestión tampoco fueron los esperados ya que no fue posible el recuento bacteriano de todas las diluciones, sin embargo, algunos agares si pudieron ser contados obteniendo datos para el probiótico de SPOMUNE.

Por otro lado, dado que el primer conteo bacteriano para PORBION-forte no fue exitoso, se llevó a cabo una tercera digestión para esta marca comercial, empleando una técnica de inoculación completamente diferente a las utilizadas en las primeras dos digestiones.

La metodología consistió en realizar la digestión previamente descrita en la digestión número 1, para la inoculación se usaron agares en cajas Petri de 60x15 mm, la técnica consistió tomar una muestra de 50 μ L y dejarla caer en medio del agar, luego, con ayuda de un asa de Drigalsky se esparció la gota por todo el agar con movimientos circulares, como lo muestra la **Figura 8**.



Figura 8. Técnica de inoculación para conteo bacteriano de PROBION-forte.

Las condiciones de incubación para esta digestión fueron las cámaras para aerobios y anaerobios convencionales.

Los resultados fueron los siguientes:

Esta técnica resultó mucho más favorable que los anteriores, el conteo bacteriano pudo realizarse en la mayoría de los agares como se observa en la **Figura 9**.



Figura 9. Conteo bacteriano correspondiente a PROBION-forte.

Los resultados se muestran en las **Tablas 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24**.

Tabla 15. Conteo bacteriano del tiempo 0, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_0^{-0}	3	6	5	2
T_0^{-1}	0	0	0	0
T_0^{-2}	0	0	0	0
T_0^{-3}	0	0	0	0
T_0^{-4}	0	0	0	0

Tabla 16. Conteo bacteriano del tiempo 1, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_1^{-0}	11	17	17	10
T_1^{-1}	9	15	13	8
T_1^{-2}	3	4	6	2
T_1^{-3}	0	0	0	0
T_1^{-4}	0	0	0	0

Tabla 17. Conteo bacteriano del tiempo 2, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_2^{-0}	20	24	23	18
T_2^{-1}	14	22	11	8
T_2^{-2}	11	15	9	6
T_2^{-3}	0	0	0	0
T_2^{-4}	0	0	0	0

Tabla 18. Conteo bacteriano del tiempo 3, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_3^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_3^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_3^{-2}	11	13	15	11
T_3^{-3}	7	6	7	8
T_3^{-4}	2	4	4	5

Tabla 19. Conteo bacteriano del tiempo 4, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
AEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_4^{-0}	8	12	13	9
T_4^{-1}	3	6	5	3
T_4^{-2}	0	0	0	0
T_4^{-3}	0	0	0	0
T_4^{-4}	0	0	0	0

Tabla 20. Conteo bacteriano del tiempo 0, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_0^{-0}	1	4	4	2
T_0^{-1}	0	0	0	0
T_0^{-2}	0	0	0	0
T_0^{-3}	0	0	0	0
T_0^{-4}	0	0	0	0

Tabla 21. Conteo bacteriano del tiempo 1, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_1^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_1^{-3}	22	27	30	21
T_1^{-4}	18	21	22	15

Tabla 22. Conteo bacteriano del tiempo 2, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_2^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_2^{-1}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_2^{-2}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_2^{-3}	15	19	18	13
T_2^{-4}	8	12	11	9

Tabla 23. Conteo bacteriano del tiempo 3, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_3^{-0}	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables
T_3^{-1}	8	12	11	12
T_3^{-2}	6	9	7	5
T_3^{-3}	1	2	2	0
T_3^{-4}	0	0	0	0

Tabla 24. Conteo bacteriano del tiempo 4, correspondiente a PROBION-forte.

PROBION-forte				
ANAEROBIO	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
T_4^{-0}	4	6	5	3
T_4^{-1}	1	2	1	2
T_4^{-2}	0	0	0	0
T_4^{-3}	0	0	0	0
T_4^{-4}	0	0	0	0

La fórmula empleada para las unidades formadoras de colonias fue la siguiente:

$$UFC = \left(\frac{\text{No.de colonias} * \text{Factor de dilución}}{mL} \right) / \left(\frac{g}{mL \text{ de la solución madre}} \right)$$

Donde:

UFC: Unidades formadoras de colonias

No. De colonias: recuento bacteriano por agar

Factor de dilución: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} o 10^{-6}

El factor de dilución empleado para el cálculo de UFC se muestra en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Factor de dilución

Factor de dilución	
10^{-1}	0.1
10^{-2}	0.01
10^{-3}	0.001
10^{-4}	0.0001

Los resultados para el cálculo de UFC para los distintos tiempo y diluciones de PROBION-forte se observan en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Unidades Formadoras de Colonias para los diferentes tiempos y diluciones de PROBION-forte.

RESULTADO DE UFC SPOMUNE (UFC/mL)					
CONDICIÓN	MUESTRA	MRS	NUT	BHI	CLOSTRIDIUM
AGARES AEROBIOS	T_0^{-0}	375	750	625	250
	T_1^{-0}	1375	2125	2125	1250
	T_1^{-1}	11250	18750	16250	10000
	T_1^{-2}	37500	50000	75000	25000
	T_2^{-0}	2500	3000	2875	2250
	T_2^{-1}	17500	27500	13750	10000
	T_2^{-2}	137500	187500	112500	75000
	T_3^{-2}	137500	162500	187500	137500
	T_3^{-3}	875000	750000	875000	1000000
	T_3^{-4}	2500000	5000000	5000000	6250000
	T_4^{-0}	1000	1500	1625	1125
	T_4^{-1}	3750	7500	6250	3750
AGARES AEROBIOS	T_0^{-0}	125	500	500	250
	T_1^{-3}	2750000	3375000	3750000	2625000
	T_1^{-4}	22500000	26250000	27500000	18750000
	T_2^{-3}	1875000	2375000	2250000	1625000
	T_2^{-4}	10000000	15000000	13750000	11250000
	T_3^{-1}	10000	15000	13750	15000

	T_3^{-2}	75000	112500	87500	62500
	T_3^{-3}	125000	250000	250000	0
	T_4^{-0}	500	750	625	375
	T_4^{-1}	1250	2500	1250	2500

La tercera digestión fue exitosa para la cuantificación bacteriana del probiótico PROBION-forte. Gracias al cambio de la técnica de inoculación los resultados pudieron ser cuantificados.

AISLAMIENTO BACTERIANO

Una vez observado el crecimiento bacteriano de ambos productos comerciales (PROBION-forte y SPOMUNE), se realizó el aislamiento bacteriano de las cepas obtenidas en los agares. El criterio para la elección de cepas a aislar se basó en las características físicas de las mismas y su extensión en el agar, es decir, se aislaron aquellas cepas que físicamente presentaban características distintas de las demás como el color, su textura, forma de sus bordes y extensión dentro del agar, así como las cepas cuyo crecimiento fue específico de acuerdo al agar y las condiciones que permitieron su crecimiento.

Respecto a PROBION-forte, en la primera digestión se logró aislar dos cepas diferentes, las cuales fueron las siguientes:



Figura 10. Crecimiento de cepas de PROBION-forte en agar BHI.

En la **figura 10** se observan claramente dos cepas distintas, una se observa de color ligeramente blanco, de textura rugosa y con bordes lisos, esta cepa se distinguió con el nombre de **R** (por su textura rugosa).

La segunda se observa transparente-opaca, completamente lisa, con bordes uniformes y se contempla la presencia de “puntos” más nítidos en el centro de la cepa, por esta característica se le denominó a esta cepa **HE** (por la característica de huevo estrellado).

Una vez seleccionadas estas cepas, se continuó con su aislamiento el cual consistió en sembrar las cepas en todos los agares para distinguir si había un cambio en su morfología de acuerdo a las características específicas de cada agar o de acuerdo a las condiciones aerobias o anaerobias.

En cada aislamiento se realizaban tinciones Gram para observar su morfología microbiológica. Lo resultados se muestran y detallan en la **Tabla 26**.

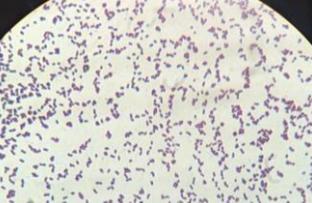
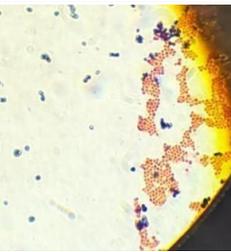
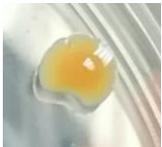
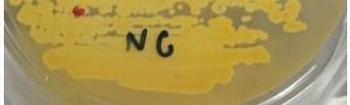
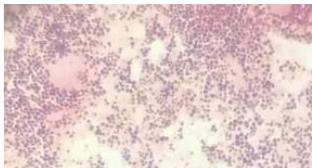
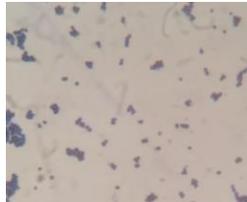
Tabla 26. Características de las cepas aisladas de PROBION-forte.

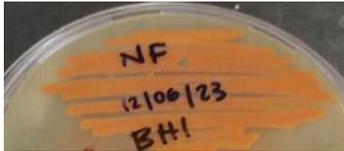
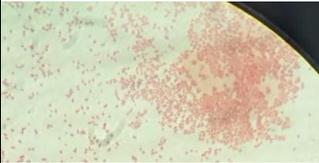
CEPA	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS
R	Color ligeramente blanco, de textura rugosa y con bordes lisos	<p>Se observan bacilos Gram positivos largos y delgados.</p> 
HE	Transparente-opaca, completamente lisa, con bordes uniformes y se contempla la presencia de “puntos” más nítidos en el centro de la cepa.	<p>Se observan bacilos Gram positivos cortos y anchos.</p> 

Se observó que únicamente se obtuvo el crecimiento de estas dos cepas en todos los agares y tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Cabe resaltar que el crecimiento en cuanto a tiempo y extensión se ve favorecido en condiciones aeróbicas y en agar BHI para ambas cepas. Ambas presentan bacilos Gram positivo en su morfología microscópica pero aun así se observan diferencias como el largo y ancho del bacilo.

El aislamiento de cepas de SPOMUNE resultó más complicado que el de PROBION-forte debido a que se visualizó el crecimiento de varias cepas distintas en los distintos agares, para seleccionar las cepas que serían aisladas y evitar la duplicidad de una misma cepa se decidió seleccionar 12 cepas distintas, las cuales fueron inoculadas en los todos los agares para así visualizar sus características físicas y morfológicas. Una vez realizada la caracterización de dichas cepas y eliminando duplicidades, únicamente se seleccionaron 8 cepas para conservar en glicerol al 20% para su posterior extracción de ADN. Las cepas y sus características se describen en la **Tabla 27**.

Tabla 27. Aislamiento de cepas de SPOMUNE.

Número de cepa	Características físicas		Características microbiológicas		Agar preferido
1		BO: Blanca ombligada Los puntos son pequeños y redondos		Diplococos Gram positivos	BHI
2		BR: Blanca con Rojo, se observa el centro rojo con bordes blancos		Contaminada, se observan diplococos Gram positivos y cocos Gram negativos	BHI
3		N: Naranja		Cocos Gram positivos pequeños	Nutritivo
4		NC: Naranja claro		Cocos Gram positivos medianos	BHI
5		BB: Blanca brillante Los puntos son muy grandes y redondos		Cocos Gram positivos "grandes"	BHI

6		BT Blanca ligeramente transparente, consistencia muy viscosa		Bacilos Gram positivos delgados	BHI
7		NF: Naranja Fuerte		Bacilos Gram positivos	BHI
8		RHE: Rugosa ombligada (como Huevo Estrellado)		Cocos Gram negativos	BHI

Se decidió resguardar la cepa número 2 por la peculiaridad de su color rojo a pesar de su contaminación.

EXTRACCIÓN DE ADN

Se experimentaron diferentes técnicas de extracción de ADN para las dos cepas aisladas del producto PROBION-frote empleando la herramienta: Wizard Genomic DNA Purification Kit, **Figura 11.**, el cual contiene los siguientes reactivos: enzimas líticas, solución de lisis, solución para precipitación de proteínas, solución de RNAsas y solución rehidratante.



Figura 11. Kit de extracción y purificación de ADN.

De acuerdo con el marbete del Kit, la metodología de extracción de ADN para bacterias Gram positivas deberá seguir los siguientes pasos:

1. Centrifugar 1 mL de la muestra durante 2 min de 13,000 a 16,000 rpm.
2. Suspender la muestra en 480 μ L de EDTA 50 mM.
3. Añadir 120 μ L de enzimas líticas.
4. Incubar de 30 a 60 min a 37°C.
5. Centrifugar de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min. Desechar el sobrenadante.
6. Añadir 600 μ L de solución de lisis (pipetear para mezclar y enjuagar la pipeta).
7. Incubar a 80°C durante 5 min.
8. Añadir 3 μ L de RNAsas, mezclar con pipeta e incubar a 37°C de 15 a 60 min.
9. Centrifugar de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min. Desechar el sobrenadante.
10. Añadir 200 μ L de solución para precipitación de proteínas y pasarlo a mezclar al vórtex durante 5 min.
11. Incubar la muestra en hielo durante 5 min.
12. Centrifugar de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min. Desechar el sobrenadante.
13. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf con 600 μ L de isopropanol a temperatura ambiente (pipetear para mezclar y enjuagar la pipeta).
14. Centrifugar de 13,000 a 16,000 rpm durante 1 min. Desechar el sobrenadante.
15. Añadir 600 μ L de etanol al 70% (pipetear para mezclar y enjuagar la pipeta).
16. Aspirar el etanol con la pipeta y dejar secar el tubo al aire libre.
17. Una vez seco el tubo, añadir 100 μ L de solución rehidratante.
18. Incubar a 65°C durante 1 hora.

Sin embargo, la metodología se fue modificando en el transcurso de la experimentación de acuerdo con los resultados obtenidos. La primera técnica de extracción para las cepas de PROBION-forte siguió la siguiente metodología:

1. Se seleccionaron 2 muestras de cada cepa, se inocularon en caldos BHI y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La extracción del ADN se realizó de estas cepas, teniendo un total de 4 tubos Eppendorf.
2. Con un mechero prendido, se pasaron los caldos a tubos Eppendorf, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante. Este paso se repitió hasta terminar los caldos con las cepas incubadas.
3. Se resuspendió el contenido de los tubos Eppendorf con 480 μ L de EDTA, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.

4. Se añadió a cada tubo Eppendorf 480 μL de EDTA, 120 μL de lisozima y 120 μL de lisostafina.
5. Se incubaron los tubos a 37°C durante 60 min. Se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.
6. Se añadieron 600 μL de solución de lisis tratando de resuspender el contenido del tubo Eppendorf con la micropipeta para obtener un mezclado exitoso, al mismo tiempo que se enjuagaba la micropipeta con la solución.
7. Se incubó a 80°C durante 5 min en baño María con un termómetro de mercurio dentro del baño para asegurar la temperatura del agua.
8. Se agregaron 3 μL de RNAsas y se resuspendió el contenido del tubo Eppendorf con la micropipeta para obtener un mezclado homogéneo.
9. Se metieron los tubos a incubar a 37°C durante 15 min, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.
10. Se agregaron 200 μL de solución para precipitación de proteínas y se llevaron al vórtex durante 1 min.
11. Se metieron a incubar en hielo durante 5 min, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min.
12. En nuevo tupos Eppendorf se añadieron 600 μL de isopropanol y se vació el sobrenadante de cada muestra. Se agitaron manualmente y se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min y se desechó el sobrenadante.
13. Se agregaron 600 μL de etanol al 70%, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min y se desechó el sobrenadante.
14. Se dejó secar los tubos Eppendorf sobre sanitas limpias y secas dentro de la campana por un lapso de aproximadamente 15 min.
15. Una vez completamente secos se agregaron 200 μL de solución rehidratante a cada tubo y se metieron a refrigerar.

Luego de la extracción de ADN se realizó una electroforesis para poder visualizar las bandas de ADN. La electroforesis se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se pegó una porción de Diurex a la mesa para la preparación de las muestras que fueron cargadas al gel de la electroforesis.
2. La muestra se preparó tomando 5 μL de muestra por 1 μL de colorante azul de bromofenol, se mezcló con la micropipeta para incorporar todo el colorante a la muestra.
3. Se rotularon los carriles conforme el orden de adición de las muestras, los carriles se rotularon de la siguiente manera:
 - a. Carril 1: R1 (rugosa muestra 1)
 - b. Carril 2: R2 (rugosa muestra 2)
 - c. Carril 3: HE1 (huevo estrellado muestra 1)
 - d. Carril 4: HE2 (huevo estrellado muestra 2)

4. Una vez cargadas las muestras en el gel, se inició la electroforesis, la cual se corrió a 80 V durante 40 min.
5. Pasados los 40 min, se tomó el gel de la electroforesis y se depositó en una solución de bromuro de etilo durante 15 min.
6. Transcurridos los 15 min, se leyó el gel en el transiluminador para observar las bandas de ADN.

El resultado de la electroforesis **Figura 12.**, no fue favorable ya que no se visualizaron bandas en el gel, por lo que la técnica de extracción se repitió junto con la electroforesis.

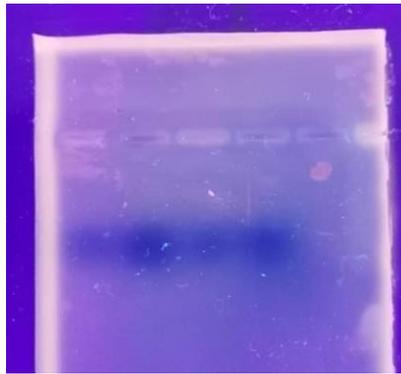


Figura 12. Electroforesis de la primera extracción de ADN de las cepas de PROBION-forte.

Metodología para la segunda técnica de extracción de ADN de las cepas de PROBION-forte:

1. Se seleccionaron 3 muestras de cada cepa, se inocularon en caldos BHI y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La extracción del ADN se realizó de estas cepas, teniendo un total de 6 tubos Eppendorf.
2. Con un mechero prendido, se pasaron los caldos a tubos Eppendorf, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante. Este paso únicamente se repitió dos veces.
3. Se resuspendió el contenido de los tubos Eppendorf con 480 µL de EDTA, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.
4. Se añadió a cada tubo Eppendorf 480 µL de EDTA, 60 µL de lisozima y 60 µL de lisostafina.
5. Se incubaron los tubos a 37°C durante 30 min. Se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.
6. Se añadieron 600 µL de solución de lisis tratando de resuspender el contenido del tubo Eppendorf con la micropipeta para obtener un mezclado exitoso, al mismo tiempo que se enjuagaba la micropipeta con la solución.

7. Se incubó a 80°C durante 5 min en baño María con un termómetro de mercurio dentro del baño para asegurar la temperatura del agua.
8. Se agregaron 3 µL de RNAsas y se resuspendió el contenido del tubo Eppendorf con la micropipeta para obtener un mezclado homogéneo.
9. Se metieron los tubos a incubar a 37°C durante 15 min, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.
10. Se agregaron 200 µL de solución para precipitación de proteínas y se agitaron las muestras manualmente.
11. Se metieron a incubar en hielo durante 5 min, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min.
12. En nuevo tipos Eppendorf se añadieron 600 µL de isopropanol y se vació el sobrenadante de cada muestra. Se agitaron manualmente y se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min y se desechó el sobrenadante.
13. Se agregaron 600 µL de etanol al 70%, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min y se desechó el sobrenadante.
14. Se dejó secar los tubos Eppendorf sobre sanitas limpias y secas dentro de la campana por un lapso de aproximadamente 15 min.
15. Una vez completamente secos se agregaron 200 µL de solución rehidratante a cada tubo y se metieron a refrigerar.

Luego de la segunda extracción de ADN se realizó una electroforesis para poder visualizar las bandas de ADN. La electroforesis se llevó a cabo de la siguiente manera:

7. Se pegó una porción de Diurex a la mesa para la preparación de las muestras que fueron cargadas al gel de la electroforesis.
8. La muestra se preparó tomando 5 µL de muestra por 1 µL de colorante azul de bromofenol, se mezcló con la micropipeta para incorporar todo el colorante a la muestra.
9. Se rotularon los carriles conforme el orden de adición de las muestras, los carriles se rotularon de la siguiente manera:
 - a. Carril 1: R1 (rugosa muestra 1)
 - b. Carril 2: R2 (rugosa muestra 2)
 - c. Carril 3: R3 (rugosa muestra 3)
 - d. Carril 4: HE1 (huevo estrellado muestra 1)
 - e. Carril 5: HE2 (huevo estrellado muestra 2)
 - f. Carril 6; HE3 (huevo estrellado muestra 3)
10. Una vez cargadas las muestras en el gel, se inició la electroforesis, la cual se corrió a 80 V durante 40 min.
11. Pasados los 40 min, se tomó el gel de la electroforesis y se depositó en una solución de bromuro de etilo durante 15 min.

12. Transcurridos los 15 min, se leyó el gel en el transiluminador para observar las bandas de DNA.

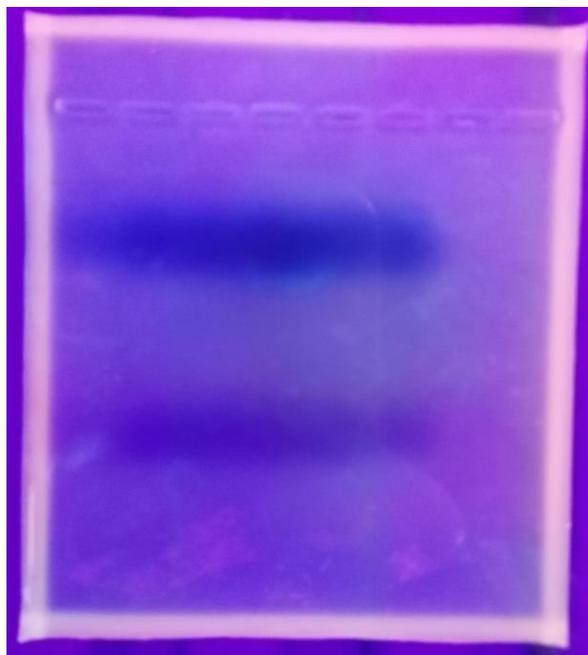


Figura 13. Electroforesis de la segunda extracción de ADN de las cepas de PROBION-forte.

El resultado de la electroforesis no fue favorable ya que no se visualizaron bandas en el gel, por lo que se utilizó un biofotómetro para poder cuantificar el ADN presente en las muestras tanto de la segunda extracción como de la primera, cabe resaltar que se utilizó la solución rehidratante del kit de extracción de ADN como blanco. Los resultados del biofotómetro se observan en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Resultados biofotómetro de la primera y segunda extracción de ADN de las cepas de PROBION-forte.

PRIMERA EXTRACCIÓN	BIOFOTÓMETRO (µg/µL)
BLANCO	0.0000
R1	0.0002
R2	0.0007
HE1	0.0007
HE2	0.0006
SEGUNDA EXTRACCIÓN	BIOFOTÓMETRO (µg/µL)
BLANCO	0.0000
R1	0.0037

R2	0.0028
R3	0.0000
HE1	0.0000
HE2	0.0029
HE3	0.0001

Se realizó una tercera extracción de ADN para las cepas de PROBION-forte, se siguieron los pasos descritos a continuación:

1. Se seleccionó 1 muestra de cada cepa, se inocularon en caldos BHI y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La extracción del ADN se realizó de estas cepas, teniendo un total de 2 tubos Eppendorf.
2. Con un mechero prendido, se pasaron los caldos a tubos Eppendorf, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante. Este paso únicamente se repitió dos veces.
3. Se resuspendió el contenido de los tubos Eppendorf con 480 µL de EDTA, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.
4. Se añadió a cada tubo Eppendorf 480 µL de EDTA, 60 µL de lisozima y 60 µL dodecil sulfato.
5. Se incubaron los tubos a 37°C durante 45 min. Se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.
6. Se añadieron 600 µL de solución de lisis tratando de resuspender el contenido del tubo Eppendorf con la micropipeta para obtener un mezclado exitoso, al mismo tiempo que se enjuagaba la micropipeta con la solución.
7. Se incubó a 80°C durante 5 min en baño María con un termómetro de mercurio dentro del baño para asegurar la temperatura del agua.
8. Se agregaron 3 µL de RNAsas y se resuspendió el contenido del tubo Eppendorf con la micropipeta para obtener un mezclado homogéneo.
9. Se metieron los tubos a incubar a 37°C durante 15 min, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 2 min y se desechó el sobrenadante.
10. Se agregaron 200 µL de solución para precipitación de proteínas y se agitaron las muestras manualmente.
11. Se metieron a incubar en hielo durante 5 min, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min.
12. En nuevo tupos Eppendorf se añadieron 600 µL de isopropanol y se vació el sobrenadante de cada muestra. Se agitaron manualmente y se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min y se desechó el sobrenadante.
13. Se agregaron 600 µL de etanol al 70%, se centrifugaron las muestras de 13,000 a 16,000 rpm durante 3 min y se desechó el sobrenadante.

14. Se dejó secar los tubos Eppendorf sobre sanitas limpias y secas dentro de la campana por un lapso de aproximadamente 15 min.
15. Una vez completamente secos se agregaron 100 μL de solución rehidratante a cada tubo y se metieron a refrigerar.

Luego de la tercera extracción de ADN se realizó una electroforesis para poder visualizar las bandas de ADN. La electroforesis se llevó a cabo de la siguiente manera:

13. Se pegó una porción de Diurex a la mesa para la preparación de las muestras que fueron cargadas al gel de la electroforesis.
14. La muestra se preparó tomando 5 μL de muestra por 1 μL de colorante blue orange, se mezcló con la micropipeta para incorporar todo el colorante a la muestra.
15. Se rotularon los carriles conforme el orden de adición de las muestras, los carriles se rotularon de la siguiente manera:
 - a. Carril 1: R1 (rugosa muestra 1)
 - b. Carril 2: HE1 (huevo estrellado muestra 1)
16. Una vez cargadas las muestras en el gel, se inició la electroforesis, la cual se corrió a 80 V durante 30 min.
17. Pasados los 30 min, se tomó el gel de la electroforesis y se depositó en una solución de bromuro de etilo durante 15 min.
18. Transcurridos los 15 min, se leyó el gel en el transiluminador para observar las bandas de DNA.



Figura 14. Electroforesis de la tercera extracción de ADN de las cepas de PROBION-forte.

El resultado de la tercera extracción tampoco fue exitoso ya que en la electroforesis no se visualizan bandas significativas, como se muestra en la **Figura 13.**, se utilizó un biofotómetro para poder cuantificar el ADN presente en las muestras, los resultados se describen en la **Tabla 29.**

Tabla 29. Resultados biofotómetro de la tercera extracción de ADN de las cepas de PROBION-forte.

PRIMERA EXTRACCIÓN	BIOFOTÓMETRO ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
BLANCO	0.0000
R1	0.0022
HE1	0.0002

Al no obtener resultados visibles con la extracción de ADN, se decidió continuar con PCR realizado a todas las muestras con el fin de obtener un resultado favorable mediante el uso del kit Master Mix, **Figura 15.**, el cual contiene los siguientes componentes: agua libre de nucleasas, Primer 8 For, Primer 1492 For y solución PCR Master Mix 2x.



Figura 15. Kit Master Mix 2x para PCR.

De acuerdo con el marbete del Kit, la metodología para la realización de PCR se continuó de la siguiente manera:

1. Se preparó una solución madre en un tubo para PCR con las siguientes características:
 - a. 3.5 μL de agua libre de nucleasas
 - b. 1.5 μL de Primer 8 For
 - c. 1.5 μL de Primer 1492 For
 - d. 12.5 de PCR Master 2x
2. Al tubo con la solución madre, se añadió 1 μL de muestra. Teniendo un total de 20 μL por muestra.
3. Se centrifugó por 3 min a 6,000 rpm para homogeneizar la muestra.
4. Las muestras se metieron al termociclador con los ajustes de volumen correspondientes.
5. Se realizó la electroforesis y congelar el restante de las muestras.

Nota: Durante este proceso los reactivos del kit PCR Master Mix 2x se mantuvieron todo el tiempo en hielo para evitar su degradación. Todos los

equipos y materiales usados fueron limpiados con solución de etanol al 70% y luz UV durante 15 min en la campana. Los tubos de PCR eran nuevos.

El objetivo principal de realizar la PCR fue para ampliar el ADN de las extracciones previas y obtener alguna señal en el gel de electroforesis, es por esto, que la PCR se realizó a las siguientes muestras:

- Muestra 1: R1 de la primera extracción.
- Muestra 2: HE1 de la primera extracción.
- Muestra 3: R1 de la segunda extracción.
- Muestra 4: HE1 de la segunda extracción.
- Muestra 5: R1 de la tercera extracción.
- Muestra 6: Control positivo.
- Muestra 7: Control negativo.

Una vez realizada la PCR, se realizó una electroforesis en la cual se usaron 2 μ L de colorante Blue Orange por 10 μ L de muestra los carriles designados para cada muestra fueron los siguientes:

- Carril 1: R1 de la primera extracción.
- Carril 2: HE1 de la primera extracción.
- Carril 3: R1 de la segunda extracción.
- Carril 4: HE1 de la segunda extracción.
- Carril 5: R1 de la tercera extracción.
- Carril 6: Control positivo.
- Carril 7: Control negativo.

Los resultados de la electroforesis se muestran en la **Figura 16**.

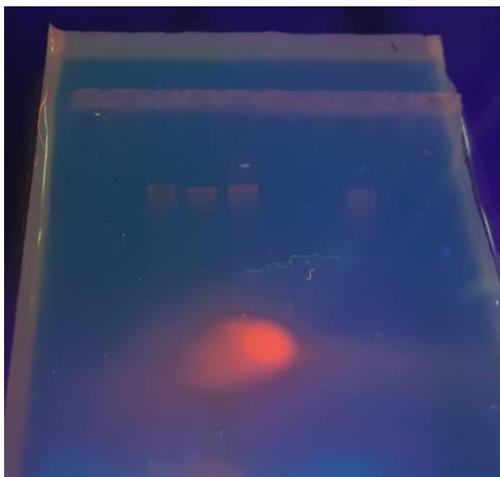


Figura 16. Electroforesis de PCR de las muestras de PROBION-forte.

En la electroforesis se observa que los carriles 3, 4 y 5 mostraron resultados visibles positivos. El control positivo no mostró nada, esto debido a la poca cantidad de muestra proporcionada ya que se contaba con menos de 1 μL . La última banda visible del lado derecho se debe a un marcador extra puesto en la electroforesis.

Se continuó con la purificación de ADN de las muestras que obtuvieron resultados positivos, es decir, las muestras R1 y HE1 de la segunda extracción y la muestra R1 de la tercera extracción.

PURIFICACIÓN DE ADN

Se empleo el kit Exo SAP para la purificación de ADN de las muestras de PCR previamente seleccionadas. La metodología fue la siguiente:

1. Se tomaron 5 μL de la muestra.
2. Se añadió 1 μL de fosfatasa alcalina.
3. Se añadió 1 μL de Exonucleasa 1
4. Se mezcló manualmente para homogeneizar la solución.
5. Se incubó a 37°C durante 15 min.
6. Se incubó a 80 °C durante 15 min (para inactivación de enzimas).
7. Se obtuvo el producto de PCR está listo para secuenciación.

Las muestras purificadas se mantuvieron en congelación para su posterior secuenciación.

EXTRACCIÓN DE METAGENOMA

Durante la experimentación se prosiguió con la extracción de metagenoma para ambos probióticos comerciales, se siguieron varias metodologías para la extracción de metagenoma, primero se preparó la muestra para la extracción siguiendo el próximo procedimiento:

1. Para esta extracción se utilizaron las muestras de los tiempos número 4 de las digestiones de ambos probióticos.
2. Se tomaron 250 μL de cada muestra de la digestión del tiempo 4 y se transfirieron a nuevos tubos Bead Beater de 1 mL.
3. Se centrifugaron durante 3 min a 12,000 rpm.
4. Se desechó el sobrenadante con micropipeta.
5. Se añadió 1 mL de TEX1, se llevaron las muestras a vórtex y posteriormente se centrifugaron por 3 min a 12,000 rpm.
6. El paso 5 se repitió 3 veces para lavar el HCL 0.1 N de las muestras.

7. Se tomó el pH durante cada lavado con TEX1 hasta asegurarse de llegar a la neutralidad.
8. Se agregaron 100 μL de muestra con el objetivo de obtener un pellet más grande, se continuaron con los enjuagues con TEX1 hasta llegar a la neutralidad.
9. Se desechó el sobrenadante con micropipeta, dejando el pellet

Una vez preparada la muestra se continuó con la extracción de metagenoma usando el Kit Zymo BIOMICS DNA, siguiendo la metodología:

1era extracción de metagenoma:

1. Se resuspendió el pellet con 250 μL de TEX1.
2. Se transfirieron las perlas de sílica presentes en el kit a cada tubo con muestra. Se llevaron las muestras al vórtex durante 1 min.
3. Se añadieron 750 μL de solución de lisis y se llevaron a vórtex por 1 min.
4. Las muestras se pasaron al equipo Bead Beating durante 1 min a una velocidad de 4,800 rpm.
5. Posteriormente se dejaron reposar en hielo durante 5 min.
6. El paso 5 y 6 se repitió 4 veces más, obteniendo un total de 5 min en el Bead Beating.
7. Se centrifugaron las muestras durante 1 min a 10,000 rpm.
8. Se transfirieron 400 μL de sobrenadante a filtros Zymo-Spin III presentes en el Kit, se colocó cada filtro con la muestra en tubos colectores.
9. Se metieron los tubos colectores con los filtros a centrifugar durante 1 min a 8,000 rpm.
10. Se añadieron 1,200 μL de buffer Zymo BIOMICS DNA binding al tubo de colección y se mezcló con micropipeta hasta homogeneizar la muestra.
11. Se transfirieron 800 μL del tubo del paso 10 a la columna Zymo-Spin IC, se colocó dicha columna en un tubo colector y se centrifugaron las muestras durante 1 min a 10,000 rpm. Se desechó el contenido del tubo colector.
12. Se repitió por segunda vez el paso 11.
13. Posteriormente se añadieron 800 μL más de muestra a cada columna y se añadieron 400 μL de buffer I Zymo BIOMICS DNA Wash. La columna se metió en un tubo colector nuevo y las muestras se centrifugaron durante 1 min a 10,000 rpm.
14. Se añadieron 700 μL de buffer II a la misma columna y se colocó la columna en el mismo tubo colector, Se centrifugaron las muestras durante 1 min a 10,000 rpm. Se desechó el sobrenadante.
15. Se añadieron 200 μL de buffer II a la misma columna IC, se pusieron las columnas en tubos colectores nuevos y las muestras se centrifugaron durante 1 min a 10,000 rpm.

16. Se transfirieron las columnas a tubos Eppendorf nuevos y se agregaron 30 μL de agua libre de RNAsas, se incubaron las muestras a 37°C durante 1 min.
17. Se centrifugaron las muestras durante 1 min a 10,000 rpm.
18. Por otro lado, se tomaron dos filtros II-MHRC Zymo-Spin (un filtro por muestra) y se colocaron en tubos colectores nuevos.
19. Se añadieron 600 μL de solución prep HCR del kit Zymo BIOMICS a cada filtro del paso 17 y se centrifugaron durante 3 min a 8,000 rpm.
20. Se transfirió el contenido del paso 16 a los filtros del paso 18. Se pusieron los filtros en tubos Eppendorf nuevos y las muestras se centrifugaron durante 3 min a 13,000 rpm.
21. El ADN filtrado ahora puede ser empleado para realizar electroforesis o PCR.
22. Las muestras de la extracción del metagenoma fueron congeladas para su preservación.

Se realizó PCR a las muestras de la extracción de metagenoma siguiendo la metodología para PCR descrita previamente. Se realizó la electroforesis, pero el gel no mostró señales significativas. La extracción de metagenoma se repite modificando la metodología.

2da extracción de metagenoma:

1. Se tomaron 1.5 mL de cada muestra de las digestiones al tiempo 4 de cada probiótico y se pasaron a tubos Eppendorf. Se centrifugaron las muestras durante 2 min a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante.
2. El paso 1 se repitió durante 3 veces con el fin de obtener un pellet concentrado.
3. A los pellets obtenidos se les añadió 1.5 mL de solución salina y se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante.
4. El paso 3 se repitió por segunda vez.
5. Se resuspendió el pellet con 1 mL de solución PBS a cada tubo y 60 μL de lisozima. Se mezcla manualmente hasta homogeneizar.
6. Posteriormente se pesaron 500 mg de perlas de cristal de 0.5 mm y se pasaron a tubos Bead Beating.
7. El contenido del paso 5 se transfirió a los tubos Bead Beating del paso 6.
8. Los tubos con las muestras se metieron al Bead Beating durante 1 min. Posteriormente se dejaron reposar en hielo durante 5 min.
9. Se añadieron 60 μL de dodecil al 20%, se dejaron reposar los tubos durante 10 min antes de repetir el paso 8.
10. Después de dejar los tubos reposados en dodecil, el paso 8 se repitió 4 veces más, obteniendo un total de 5 min en el Bead Beating.
11. Se centrifugaron las muestras durante 1 min a 10,000 rpm.

12. Se transfirieron 400 μ L de sobrenadante a filtros Zymo-Spin III presentes en el Kit, se colocó cada filtro con la muestra en tubos colectores.
13. Se metieron los tubos colectores con los filtros a centrifugar durante 1 min a 8,000 rpm.
14. Se añadieron 600 μ L de fenol a cada tubo. Las muestras se pasaron 1 min a vórtex y posteriormente se centrifugaron durante 3 min a 13,000 rpm.
15. Con una micropipeta se separó la fase acuosa de la fase oleosa cuidando de no mezclarlas. La fase acuosa se transfirió a nuevos tubos Eppendorf.
16. Se añadieron 600 μ L de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se pasaron a vórtex durante 1 min. Se pasaron a centrifugar durante 3 min a 13,000 rpm.
17. Se extrajo nuevamente la fase acuosa de ambas muestras y se transfirió a nuevos tubos Eppendorf.
18. Se añadieron 600 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se llevaron a vórtex durante 1 min y se centrifugaron durante 3 min a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante.
19. Se lavaron los pellets con etanol al 70%, se centrifugaron durante 1 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante.
20. Los pellets se dejaron secar en la campana. El paso 19 se repitió una segunda vez.
21. Se resuspendieron los pellets en 50 μ L de solución amortiguadora de TEX1 estéril.
22. Las muestras están listas para electroforesis o PCR. Se mantuvieron en congelación para su adecuada conservación.

Posteriormente se realizó la electroforesis la cual no resultó favorable ya no se encontraron señales visuales significativas. Se repite la extracción de metagenoma usando una técnica de digestión de los probióticos diferente. El objetivo de la nueva técnica para la digestión fue recrear la digestión fisiológica de los peces, la cuál se realizó de la siguiente manera:

1era digestión para la 3era extracción de metagenoma, la cual se realizó por duplicado a cada probiótico, es decir, se obtuvieron 2 muestra de digestión por cada probiótico, dando un total de 4 muestras:

1. Se pesaron 250 mg de cada probiótico y transferirlos a tubos Eppendorf.
2. Se añadieron 990 μ L de solución de PBS 60 mM a pH 6.2 y 10 μ L de lisozima.
3. Se metieron a la incubadora durante 5 min con agitación a 37°C.
4. Posteriormente se centrifugaron durante 5 min a 12,000 rpm. Se desecho el sobrenadante.
5. Se tomó una gota de cada pellet para realizar tinción Gram y confirmar la liberación de la carga bacteriana de los probióticos.
6. Se añadió 1 mL de solución fisiológica gástrica: HCl pH 1.5+3 mg de pepsina.

7. Se agitó en vórtex durante 1 min y se incubaron las muestras a 37°C con agitación durante 90 min.
8. Se centrifugaron las muestras durante 5 min a 12,000 rpm y se desechó el sobrenadante.
9. Se tomó una gota de cada pellet para realizar tinción Gram y confirmar la liberación de la carga bacteriana de los probióticos.
10. Se añadió 1 mL de solución fisiológica intestinal: 10 mL de PBS a pH 6.8+0.05 mg de Oxgal.
11. Se agitaron las muestras hasta homogeneizar y se incubaron a 37°C con agitación durante 120 min.
12. Se centrifugaron las muestras durante 5 min a 12,000 rpm.
13. Se tomó una gota de cada pellet para realizar tinción Gram y confirmar la liberación de la carga bacteriana de los probióticos.
14. Finalmente se tomó una muestra de cada pellet y se sembraron en agares Clostridium y BHI para confirmar la liberación de la carga bacteriana.

En las **Figuras 17 y 18** se muestran los resultados de las tinciones Gram realizadas en el paso 5 de la digestión de ambos probióticos

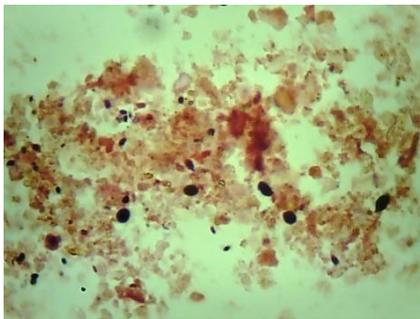


Figura 17. Tinción Gram del paso 5 de la digestión de PROBION-forte.

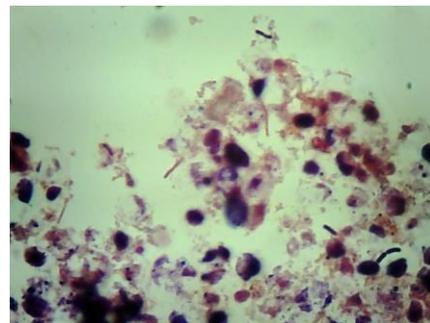


Figura 18. Tinción Gram del paso 5 de la digestión de SPOMUNE.

Es importante recordar que, una vez realizada la digestión de los probióticos, la extracción del metagenoma se debe realizar en un lapso no mayor a 24 horas para así evitar la degradación del metagenoma manteniendo la muestra lo más fresca posible.

3era extracción de metagenoma mediante el uso de el del Kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep ZYMO REASEARCH, la extracción se realizó sobre las 4 muestras de la digestión anterior:

1. Se tomaron 1.5 mL de cada muestra de las digestiones y se depositaron en tubos Eppendorf nuevos, se centrifugaron durante 2 min a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante.
2. Se añadió 1 mL de solución de PBS pH 6.8 a cada tubo Eppendorf y se centrifugaron las muestras durante 2 min a 13,000 rpm. Este paso se repitió 2 veces.
3. Se añadieron 750 µL de solución de lisis, se llevaron las muestras al disruptor durante 1 min, luego se dejaron reposar en hielo durante 5 min. Este paso se repitió por 4 veces más, hasta completar un total de 5 min en el disruptor.
4. Se centrifugaron las muestras durante 1 min a 10,000 rpm.
5. Se tomaron 400 µL del sobrenadante de cada muestra y se transfirieron a la columna Zymo-Spin III-F Filter del Kit y se colocaron las columnas en tubos de colección nuevos. Se centrifugaron las muestras durante 1 min a 8,000 rpm. Se desecharon las columnas Zymo-Spin III-F Filter.
6. Se añadieron 1,200 µL de la solución ZymoBIOMICS DNA Binding Buffer a los tubos colectores del paso 5 y se homogeneizó el contenido con la micropipeta.
7. Se tomaron 800 µL de cada muestra de los tubos colectores del paso anterior y se transfirieron a las columnas Zymo-Spin IICR del Kit. Las columnas se pusieron en nuevos tubos colectores y se centrifugaron durante 1 min a 10,000 rpm. Se desecharon los tubos colectores.
8. Se añadieron 400 µL de solución ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 1 a las columnas del paso anterior. Las columnas se colocaron en tubos colectores nuevos y metieron a centrifugar durante 1 min a 10,000 rpm. Se desechó el contenido de los tubos colectores.
9. Se añadieron 700 µL de solución ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2 a las columnas del paso anterior. Las columnas se colocaron en tubos colectores nuevos y metieron a centrifugar durante 1 min a 10,000 rpm. Se desechó el contenido de los tubos colectores.
10. Se añadieron 200 µL de solución ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 2 a las columnas del paso anterior. Las columnas se colocaron en tubos colectores nuevos y metieron a centrifugar durante 1 min a 10,000 rpm.
11. Se pasaron las columnas Zymo-Spin IICR del paso anterior a nuevos tubos colectores y se añadieron 100 µL de solución ZymoBIOMICS DNase/RNase Free Water y se incubaron las muestras durante 1 min a 37°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 1 min a 10,000 rpm con el fin de eluir el ADN conservando el contenido de estos tubos colectores.
12. Se colocaron las columnas Zymo-Spin IICR nuevas en tubos colectores nuevos, se añadieron 600 µL de solución ZymoBIOMICS HRC Prep Solution. Se centrifugaron las columnas durante 3 min a 8,000 rpm.
13. Se transfirió el contenido de los tubos colectores del paso 11 a las columnas preparadas del paso 12 y se colocaron en tubos colectores nuevos.
14. Se centrifugaron las muestras durante 3 min a 13,000 rpm.

15. Las muestras quedaron listas para realizar electroforesis o PCR.
16. Las muestras están listas para electroforesis o PCR. Se mantuvieron en congelación para su adecuada conservación.

Se realizó electroforesis a las muestras de esta extracción de metagenoma y se acomodaron las muestras de la siguiente manera:

- Carril 1: Muestra 1 de PROBION-forte con colorante azul.
- Carril 2: Muestra 2 de PROBION-forte con colorante azul.
- Carril 3: Control negativo
- Carril 4: Control positivo
- Carril 5: Muestra 1 de PROBION-forte con colorante Blue Orange.
- Carril 6: Muestra 2 de PROBION-forte con colorante Blue Orange.
- Carril 7: Muestra 1 de SPOMUNE con colorante Blue Orange.
- Carril 8: Muestra 1 de SPOMUNE con colorante Blue Orange.

Se decidió cambiar el colorante debido a que se observaron dos grandes manchas en el gel de electroforesis. **Figura 19.**

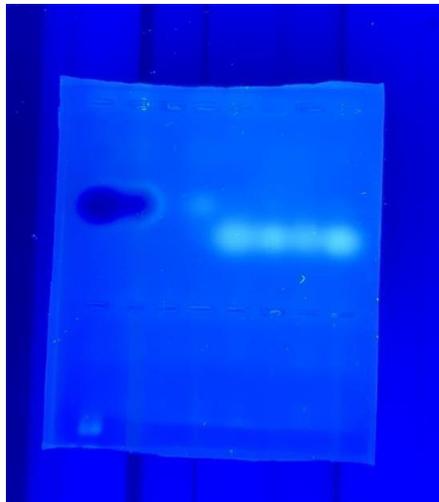


Figura 19. Electroforesis de la 3era extracción de metagenoma para PROBIO-forte y SPOMUNE.

Debido a que se obtuvieron resultados dudosos en la electroforesis de la **Figura 19.** Se decidió repetir la digestión para ambos probióticos y la extracción de metagenoma. En este punto de la experimentación se postergó y se cedió la continuidad del proyecto debido a falta de insumos para la siguiente extracción.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La primera técnica empleada para la digestión de los probióticos resultó exitosa, logrando el rompimiento de la cápsula que contiene los probióticos y liberando su contenido microbiológico para su posterior inoculación y cuantificación de UFC.

Sin embargo, la técnica de inoculación para la cuantificación bacteriana no fue exitosa debido al poco espacio de la caja Petri y el rápido crecimiento bacteriano. Se prefiere la técnica de la digestión 3 correspondiente a PROBION-forte para el objetivo de cuantificación de UFC.

De acuerdo con las tablas de resultados de conteo bacteriano correspondiente a SPOMUNE y conforme a lo observado durante la experimentación de digestión e incubación de este probiótico, se afirma que el crecimiento bacteriano de las cepas cumple con las fases del crecimiento bacteriano (latencia, exponencial, estacionaria y muerte). Se puede deducir que la fase exponencial corresponde a lo registrado en las tablas correspondientes a los tiempos T0 y T1 debido a que fueron los tiempos en donde hubo mayor crecimiento, tanto que se define como incontable. La fase estacionaria se observa en los tiempos T2 y T3 ya que no presentan alta variación de conteo bacteriano entre ellos, por último, la fase de muerte se puede observar en T4 ya que hubo poco o nulo crecimiento.

Desafortunadamente, no se pudieron obtener datos de la fase de latencia debido a que las cepas presentaron un crecimiento muy rápido, es por esto por lo que no se pueden graficar los resultados ya que no se observaría una cinética bacteriana por la falta de resultados obtenidos durante la experimentación.

Conforme a las tablas de resultados de cuantificación bacteriana de PROBION-forte se identifica una mejoría en la obtención de datos y se puede observar el crecimiento bacteriano en sus distintas fases. No obstante, los resultados no pueden ser graficados porque no se obtuvo la información completa para poder realizar la comparación correspondiente de cada tiempo de muestreo y cada dilución.

Los agares que mostraron mejores resultados para el crecimiento de ambos probióticos fueron BHI y nutritivo en condiciones aerobias, se recomienda una revisión periódica de dichos agares ya que algunas cepas mostraron cambios físicos significativos luego de varios meses de su inoculación como lo fue el cambio en la coloración en cuatro cepas de SPOMUNE, de igual manera, se recomienda una revisión de esta metodología para la optimización de recursos ya que durante esta experimentación se empleó una alta cantidad de medios de cultivos y cajas Petri.

De acuerdo con los resultados y a lo observado durante la experimentación de extracción de ADN para PROBION-forte, se observó que la mejor técnica de extracción fue la segunda. Cabe resaltar que estos resultados únicamente pudieron ser revelados después de realizar PCR a las cepas, ya que con la técnica de extracción de ADN se obtenía muy poca cantidad de este por lo tanto no el gel de electroforesis no mostraba bandas significativas. Otro aspecto a mencionar es la importancia y cantidad de colorante empleado en el gel de electroforesis ya que se observó que el colorante Blue Orange actuaba de manera más favorable para la visualización de las bandas mientras que el azul no mostraba resultados.

Por otro lado, la extracción de ADN de las cepas asiladas de SPOMUNE no fue llevada a cabo debido a la falta de insumos en el laboratorio, sin embargo, las cepas fueron resguardadas y etiquetadas en tubos Eppendorf con glicerol al 20% para su posterior extracción y secuenciación. Es recomendable realizar la extracción sobre la muestra tomada directamente del agar en lugar de la muestra tomada de la inoculación en caldos BHI para aumentar la concentración de ADN.

Durante la purificación de ADN no se presentaron problemas, sin embargo, se debe recordar que la limpieza de las áreas y equipos empleados en este proceso debe realizarse de manera correcta para evitar la contaminación de las muestras. Siguiendo con la extracción de metagenoma, se observó que la técnica con la que se obtuvieron resultados favorables fue con la primera digestión de la tercera extracción de metagenoma, en donde se simuló la digestión fisiológica de los peces y posteriormente se empleó el kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep ZYMO RESEARCH, sin embargo, los resultados obtenidos en la electroforesis resultaron dudosos, se deduce que el colorante empleado durante las electroforesis no es el adecuado para las muestras de metagenoma ya que se observa que los procesos de digestión y extracción fueron exitosos ya que las tinciones Gram realizadas en cada etapa de la digestión mostraron que si se obtuvo la liberación del contenido bacteriano de los probióticos, inclusive, se observó crecimiento bacteriano en los agares inoculados con las muestras tomadas durante las diferentes etapas de la digestión.

La experimentación de la tolerancia al amonio se inició con la generación de biomasa de algunas cepas seleccionadas, sin embargo, al momento de realizar la toma de absorbancias el equipo presentó un fallo en la lectura y no se pudo continuar dicha experimentación debido a la falta del medio de cultivo.

Para finalizar, se recomienda realizar la digestión e inoculación de probióticos a la par de la extracción del metagenoma para futuras experimentaciones debido a que la coloración presentada en algunas cepas se pudo visualizar luego de un mes después de su inoculación en los agares.

CONCLUSIONES

Se concluye que la digestión con HCL 0.1 N es efectiva para la digestión de ambos probióticos, la técnica para el conteo bacteriano que mostró mejores resultados fue la de que emplea el asa de Drigalsky.

Los agares en los que se observó un mejor crecimiento bacteriano fueron nutritivo y BHI, ambos en condiciones aerobias; se lograron aislar e identificar dos cepas del producto comercial PROBION-forte y ocho cepas de SPOMUNE, las cuales se nombraron de la siguiente manera de acuerdo a sus características físicas:

- PROBION-forte: R (Rugosa) y HE (Huevo Estrellado).
- SPOMUNE: BO (Blanca ombligada), BR (Blanca con Rojo), N (Naranja), NC (Naranja Claro), BB (Blanca Brillosa), BT (Blanca Transparente), NF (Naranja Fuerte), RHE (Rugosa como Huevo Estrellado).

Por otro lado, la mejor técnica de extracción de ADN fue la segunda, cabe resaltar que es necesario realizar PCR luego de cada extracción para poder observar las bandas en el gel de electroforesis. Se mandaron las muestras a secuenciación del gen 16s rDNA y quedamos a reserva de sus resultados.

Bibliografía

- Bou, et al. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio demicrobiología. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Volumen 29, número 8 , páginas 601-608.
- BIOMIN, (2021). Los probióticos en la acuicultura. Recuperado de: <https://www.biomin.net/mx/species/aquaculture/probiotics-in-aquaculture/>
- Claro R., (2019). Análisis de los compuestos nitrogenados y fósforo, bajo diferentes condiciones de alimentos, probióticos y densidades de siembra en un cultivo superintensivo de camarón blanco (*litopenaeus vannamei*) en geomembranas. Recuperado de: <http://aramara.uan.mx:8080/bitstream/123456789/2291/1/AN%c3%81LISIS%20DE%20LOS%20COMPUESTOS%20NITROGENADOS%20Y%20F%c3%93SFORO%2c%20BAJO%20DIFERENTES%20CONDICIONES%20DE%20ALIMENTOS%2c%20PROBI%c3%93TICOS%20Y%20DENSIDADES%20DE%20SIEMBRA%20EN%20UN%20CULTIVO%20SUPERINTENSIVO%20DE%20CAMAR%c3%93N%20BLA.pdf>

- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2011). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Secretaria de salud.
- Deseure J., Obeid J., Willison C., Magnin P., (2021). Determinación fiable de los parámetros de crecimiento y producción de hidrógeno de la bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* en cultivo discontinuo alimentado mediante una combinación de la función de Gompertz y el modelo de Luedeking-Piret, Vol. 7, No. 7.
- EduLabC, (2020). Medios de cultivo. Recuperado de: <https://edulabc.com.mx/medios-de-cultivo/>
- FAO, (2021). *Fisheries & Aquaculture*. Recuperado de: <https://www.fao.org/fishery/es/aquaculture>
- Galarza B., Vera L., (2022). Determinación del límite de tolerancia del amoniaco y sus síntomas asociados en el cultivo de juveniles de huayaipe (*Seriola rivoliana*). Recuperado de: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/52738/1/T-76762%20Aguilar%20Galarza.pdf>
- Global Seafood Alliance. (2019). *Toxicidad de las sustancias químicas en la acuicultura - Responsible Seafood Advocate*. Recuperado de: <https://www.globalseafood.org/advocate/toxicidad-de-las-sustancias-quimicas-en-la-acuicultura/>
- Gómez A., Gutiérrez L., Silgado D., García A., (2020). Evaluación del desempeño de los microorganismos eficientes en el cultivo de tilapias, con tecnología Biofloc. Recuperado de: <https://repositorio.umecit.edu.pa/bitstream/handle/001/5998/Informe%20Final%20Evaluaci%C3%B3n-Alexis%20G%C3%B3mez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gómez M., (2020). Probióticos en Acuicultura. Recuperado de: <https://riunet.upv.es/handle/10251/136915>
- Labster, (2021). Reactivos utilizados en la tinción de Gram. Recuperado de: <https://theory.labster.com/reagents/>
- Lifeder, (2020). Aislamiento de microorganismos: técnicas e importancia. Recuperado de <https://www.lifeder.com/aislamiento-de-microorganismos/>
- Méndez J., Flores M., Páramo L., (2017). Isolation and identification of *bacillus subtilis* and evaluation of antagonism in vitro against phytopathogenic fungi. Nexo-Revista Científica, Vol. 30, No. 02, pp. 96-110.
- Mesa Villegas, L. (2021). Evaluación de la eficiencia de un sistema de acuaponía por biofiltración en el sistema RAS (Doctoral dissertation, Unilasallista Corporación Universitaria).
- NCBI. *Clostridium butyricum*, (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Clostridium+butyricum>

-
- NCBI. *Rhodobacter capsulata* (2021). [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Rhodobacter+capsulatus\[Organism\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Rhodobacter+capsulatus[Organism])
- Pérez M., Álvarez M., Soriano J., Aurelio M., (2020). Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. *Hidrobiológica* 2020, 30 (1): 93-105.
- Rodríguez Gómez, H., & Anzola Escobar, E. (2001). *La calidad del agua y la productividad de un estanque en acuicultura* (No. Doc. 20684)* CO-BAC, Bogotá).
- SADER, (2019). Acuicultura, producción y conservación de organismos acuáticos. Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/acuicultura-produccion-y-conservacion-de-organismos-acuaticos>
- Watts JEM, Schreier HJ, Lanska L, Hale MS. The Rising Tide of Antimicrobial Resistance in Aquaculture: Sources, Sinks and Solutions. *Mar Drugs*. 2017 Jun 1;15(6):158.
- Zuffo T., Giuilani E., Berticelli M., Picoli F., Folmann S., Kinas J., Savarias T., Zampar A., Alcantara D., (2021). Temperatura letal y toxicidad del amoníaco en juveniles de Curimatá (*Prochilodus lineatus*). Elsevier, *Acuicultura*, Tomo 545, 2021, Artículo 737186.
- Méndez J., Flores M., Páramo L., (2017). Isolation and identification of *Bacillus subtilis* and evaluation of antagonism in vitro against phytopathogenic fungi. *Nexo-Revista Científica*, Vol. 30, No. 02, pp. 96-110.
- Zhang C, Yu Q, Wang J, Yu Y, Zhang Y, Sun Y. (2022). Effects of Dietary Supplementation With *Clostridium butyricum* on Growth Performance, Apparent Digestibility, Blood Metabolites, Ruminal Fermentation and Bacterial Communities of Fattening Goats. *Front Nutr*. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9173004/>

