



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL
PROBIÓTICO DE *Lactobacillus brevis* Y
Lactobacillus plantarum AISLADOS DEL PULQUE.

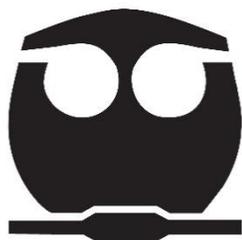
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

XIMENA MORALES HUERTA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. GLORIA DÍAZ RUÍZ

VOCAL: M. en B. MARTHA GILES GÓMEZ

SECRETARIO: Dr. FRANCISCO RUÍZ TERÁN

1er. SUPLENTE: Q.A. ALEIDA MINA CETINA

2° SUPLENTE: Dr. HUGO ANTONIO HERNÁNDEZ PÉREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CEPARIO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

LABORATORIO DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOQUÍMICA DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI.

BIOTERIO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO.

M. EN B. MARTHA GILES GÓMEZ

ASESOR DEL TEMA

XIMENA MORALES HUERTA

SUSTENTANTE

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM <IN207917>

En el proyecto de investigación <Estudio de la diversidad microbiana, genética y metabólica del pulque por medio de un enfoque polifásico>

Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

Índice

A. Índice de figuras	7
B. Índice de tablas	8
1. Resumen	9
2. Introducción	10
3. Antecedentes	12
3.1 Problemas gastrointestinales	12
3.1.1 Enfermedades gastrointestinales en México	12
3.1.1.1 Enfermedades inflamatorias intestinales	13
3.1.1.2 Maldigestión de la lactosa	14
3.2 Alimentos funcionales	15
3.3 Alimentos fermentados	16
3.3.1 Pulque	17
3.3.1.1 Orígenes	17
3.3.1.2 Proceso de elaboración	18
3.3.1.3 Composición fisicoquímica y microbiológica	20
3.4 Probióticos	21
3.4.1 Beneficios asociados al consumo de probióticos	22
3.4.2 Guía FAO/OMS Criterios de evaluación	24
3.4.3 Criterios y métodos para la evaluación de probióticos frente a patógenos	24
3.5 Bacterias ácido-lácticas	26
3.5.1 Género <i>Lactobacillus</i>	27
3.5.2 Efectos asociados al consumo de lactobacilos	27
3.6. Género <i>Salmonella</i>	30
3.6.1. <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium	31
4. Justificación	33
5. Hipótesis	33
6. Objetivos	35
6.1 Objetivo general	35
6.2 Objetivos particulares	35
7. Metodología	35
7.1 Diagrama de metodología realizada	35
7.2 Reactivación y conservación de bacterias ácido-lácticas	36
7.2.1 Aislamiento y conservación de la cepa de referencia	36
7.2.2 Corroboración de pureza de bacterias ácido lácticas	37

7.3 Cepas patógenas empleadas	37
7.3.1 Conservación de cepas patógenas	38
7.4 Evaluación del desarrollo de <i>L. plantarum</i> P46 y <i>L. brevis</i> P47 a la temperatura del cuerpo humano	38
7.5 Determinación de la sensibilidad a antibióticos	39
7.6 Identificación molecular	40
7.6.1 Extracción de DNA cromosomal	40
7.6.2 Electroforesis en gel de agarosa.....	41
7.6.3 Amplificación del ADN por PCR	41
7.6.4 Secuenciación del operón ribosomal	42
7.6.5 Elaboración de un árbol filogenético	43
7.7 Evaluación cualitativa de resistencia a medio ácido pH 3.5 y sales biliares	43
7.8 Evaluación cuantitativa de resistencia a medio ácido pH 3.5 y sales biliares.....	44
7.9 Ensayos de actividad antimicrobiana	44
7.10 Ensayos de inhibición competitiva entre cepas aisladas del pulque	45
7.11 Obtención de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> P46	46
7.12 Ensayos con extracto crudo de <i>L. plantarum</i> P46	47
7.13 Ensayos con extracto crudo concentrado de <i>L. plantarum</i> P46	47
7.14 Evaluación <i>in vivo</i> de <i>L. plantarum</i> P46 en ratones Balb/c	48
7.14.1 Modelo animal.....	49
7.14.2 Preparación de dosis	49
7.14.3 Periodo y método de administración	50
7.14.4 Recolección de órganos	51
7.14.5 Cuantificación de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium STR ^r viable en órganos de ratones Balb/c	51
8. Resultados y discusión	52
8.1 Reactivación y comprobación de pureza de las cepas <i>L. plantarum</i> P46 y <i>L. brevis</i> P47	52
8.2 Evaluación del desarrollo de <i>L. plantarum</i> P46 y <i>L. brevis</i> P47 a la temperatura del cuerpo humano	53
8.3 Sensibilidad a antibióticos	54
8.4 Identificación molecular	58
8.4.1 Extracción y amplificación de ADN cromosomal por PCR	59
8.4.2 Secuenciación del operón ribosomal	60
8.5 Evaluación cualitativa de resistencia a medio ácido pH 3.5 y sales biliares	63
8.6 Evaluación cuantitativa de resistencia a medio ácido pH 3.5 y sales biliares	64

8.7 Ensayos de antibiosis	68
8.8 Ensayos de inhibición competitiva entre cepas aisladas del pulque	73
8.9 Obtención de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> P46	75
8.10 Efecto antimicrobiano del extracto crudo y concentrado de <i>L. plantarum</i> P46	76
8.11 Evaluación <i>in vivo</i> de <i>L. plantarum</i> P46 en ratones Balb/c	78
9. Conclusiones	84
10. Perspectivas	85
11. Bibliografía	86
12. Anexos	97
I. Ajuste de 0.2 D.O. 600 nm	97
II. Metodologías empleadas en la identificación molecular.....	98
III. Alineamiento del operón ribosomal de la cepa P46	100
IV. Análisis estadístico	106
V. Ensayo de resistencia antimicrobiana mediante tira ATB STREP 5	111
VI. Resultados y tratamiento estadístico de ensayos <i>in vivo</i>	112

A. Índice de figuras

Figura 1. Proceso general de la elaboración del pulque	18
Figura 2. Mecanismos de acción de los probióticos	23
Figura 3. Efectos y aplicaciones de bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	28
Figura 4. Mecanismo general de infección de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium...32	
Figura 5. Esquema general de la metodología empleada	35
Figura 6. Organización del operón ribosomal de <i>L. plantarum</i> b-2	43
Figura 7. Metodología empleada en los ensayos de inhibición competitiva entre cepas aisladas del pulque	45
Figura 8. Protocolo experimental seguido para las pruebas en ratones Balb/c con cepas ácido-lácticas	48
Figura 9. Administración de las bacterias de ensayo mediante sonda esofagástrica	50
Figura 10. Tinción Gram de <i>L. plantarum</i> P46 y <i>L. brevis</i> P47	53
Figura 11. Electroforesis de la extracción de DNA cromosomal de la cepa P46 y productos de PCR	59
Figura 12. Árbol filogenético de la secuenciación del operón ribosomal de la cepa P46 elaborado por Neighbor-Joining	62
Figura 13. Ensayo de antibiosis sobre el desarrollo de patógenos.....	70
Figura 14. Halos de inhibición generados por cepas aisladas a partir del pulque	74
Figura 15. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> P46	75
Figura 16. Ensayos de antibiosis con sobrenadantes concentrados	77
Figura 17. Concentración de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium Str ^r viable en bazo e hígado de ratones Balb/c	79
Figura 18. Ejemplares representativos de cada lote de ensayo	82

B. Índice de tablas

Tabla 1. Métodos para la evaluación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del efecto antagónico de probióticos frente a patógenos.....	25
Tabla 2. Bacterias del género <i>Lactobacillus</i> asociados a alimentos fermentados y sus beneficios	29
Tabla 3. Cepas patógenas empleadas	37
Tabla 4. Interpretación de los resultados de la tira ATB STREP 5 (Biomérieux) ...	40
Tabla 5. Primers empleados en la amplificación de ADN extraído de <i>L. plantarum</i> P46	41
Tabla 6. Condiciones para la reacción de amplificación de DNA en el termociclador MyCycler (Bio-Rad)	42
Tabla 7. Cuantificación de crecimiento de <i>L. brevis</i> P47 y <i>L. plantarum</i> P46 en caldo ATP a 28 y 37 °C durante 24 horas	54
Tabla 8. Antibiograma de las bacterias ácido-lácticas estudiadas	55
Tabla 9. Concentración de DNA de los productos de PCR	60
Tabla 10. Identidad de la cepa P46 con base en el análisis de secuencias (BLAST)	61
Tabla 11. Resultados cualitativos de resistencia a condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i> de <i>L. plantarum</i> P46, <i>L. brevis</i> P47 y <i>L. casei</i> Shirota	63
Tabla 12. Resultados del monitoreo a las 4 y 24 horas de las cepas de estudio en el medio de estrés en incubación a 37 °C en condiciones reducidas de oxígeno	66
Tabla 13. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas de estudio sobre diversos patógenos	69
Tabla 14. Halo de inhibición producido entre cepas aisladas del pulque	73
Tabla 15. Resultados del efecto antimicrobiano del sobrenadante crudo y concentrado de <i>L. plantarum</i> P46	76

1. Resumen

Las bacterias ácido lácticas se encuentran altamente distribuidas en la naturaleza, sus beneficios y aplicaciones están asociados a la industria láctea pero también se encuentran en otro tipo de productos (embutidos, pescados, bebidas no lácteas, etc.), actualmente presentan un gran potencial biotecnológico en la producción de alimentos de consumo humano y animal, en este grupo se encuentran los Lactobacilos, entre este género se ha encontrado una gran cantidad de bacterias benéficas consideradas como probióticos. Estudios recientes han caracterizado a bacterias con capacidad probiótica aisladas a partir del pulque, P45, por lo que puede encontrarse otros microorganismos propios de esta bebida fermentada que cumplan con esta función, Gutiérrez (2015) aisló e identificó a las cepas *L. brevis* 2S1.12b y *L. plantarum* 2S1.9 como microorganismos con posibilidad a ser considerados probióticos. Por lo que se realizó la caracterización de dichas cepas sometiénolas a condiciones similares al tracto gastrointestinal (pH 3.5 y sales biliares 0.3%) *in vitro*, así mismo se evaluó su sensibilidad a 12 antibióticos y posteriormente ensayos de antibiosis frente a 9 patógenos, en donde la cepa de *Lactobacillus plantarum* demostró mejores aptitudes, por lo que se confirmó su identidad mediante la secuenciación de su operón ribosomal, corroborando su identificación como *L. plantarum* P46 (previamente descrita como *L. plantarum* 2S1.9), a la par se realizaron ensayos antagónicos de su sobrenadante frente a los mismos patógenos con la finalidad de identificar si en este se encontraban sus efectos antimicrobianos.

Por último, se evaluó la capacidad antagonista de la cepa P46 *in vivo*, frente a *S. enterica* Typhimrium Str^r en 39 ratones Balb/C, demostrando que es capaz de disminuir la infección de 48 h en dos ciclos logarítmicos de esta bacteria.

2. Introducción

En México un alto porcentaje de la población presenta desordenes gastrointestinales como consecuencia de dietas inadecuadas y estilos de vida poco saludables, asociados al consumo de alimentos preparados en la vía pública, una higiene inadecuada, así como la poca concientización sobre métodos de saneamiento propios de lugares en donde se preparan y distribuyen alimentos, esto a su vez, asociado a los grupos más vulnerables como lo son niños y ancianos, sin embargo, estos padecimientos pueden presentarse en la población en general, sin importar la edad o la condición socioeconómica (Paniagua *et al.*, 2007). Sin embargo, los probióticos son considerados como una estrategia para contribuir a disminuir la incidencia de dichos trastornos (Castro *et al.*, 2015).

La principal fuente de los probióticos conocidos es el tracto intestinal humano, sin embargo, se han encontrado microorganismos con estas características provenientes de otros sitios como lo son los alimentos fermentados, los cuales, para su elaboración requieren la presencia de microorganismos que, tras su metabolismo, generan modificaciones en la matriz alimentaria y a su vez transforma sus características organolépticas. En México existe una gran variedad de bebidas y alimentos fermentados, en su mayoría, su elaboración es tradicional, ejemplo de ellos son el pozol, tepache y pulque.

El pulque, es una bebida alcohólica no destilada, que se obtiene a partir de la fermentación del aguamiel extraído de algunas especies de maguey, al ser su proceso de elaboración tradicional, las condiciones en las que se produce esta bebida generan una amplia diversidad microbiana. Estudios asociados a los microorganismos presentes durante la elaboración del pulque indican la presencia de tres tipos de fermentación, en donde *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* producen alcohol, bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus* sp. le proporcionan la ligera acidez que se percibe en la bebida y bacterias como *Leuconostoc mesenteroides* son responsables de la viscosidad (Escalante *et al.*, 2012).

Se le atribuyen al pulque propiedades benéficas hacia la salud de su consumidor, tanto medicinales como nutricionales entre los que destaca la prevención de trastornos gastrointestinales, los cuales pueden estar ligados a los microorganismos presentes en dicha bebida, ya que presenta bacterias ácido-lácticas, en donde, especies pertenecientes a este grupo son empleadas como probióticos (Saad *et al.*, 2013), sin embargo, al considerar que el pulque es una bebida alcohólica, ésta presenta los mismos problemas asociados al consumo excesivo de bebidas de esta índole, por lo que, contemplando a las enfermedades gastrointestinales como un problema de salud pública, al ser la quinta causa de muerte infantil en México, (Hurtado, 2015), es importante encontrar nuevas alternativas de microorganismos probióticos a partir de productos como lo es el pulque, con el fin de retomar sus propiedades positivas en productos de consumo apto para la población en general.

Se han realizado diversos estudios acerca de la microbiota presente en la fermentación del pulque, Campos (2010), aisló y caracterizó a *Leuconostoc mesenteroides* P45, cuya capacidad probiótica se corroboró mediante investigaciones posteriores (Giles-Gómez *et al.*, 2016), al tomar en cuenta la presencia de bacterias con características probióticas presentes en esta bebida, Gutiérrez (2015), realizó el aislamiento e identificación de distintos lactobacilos, que tras pruebas preliminares, destacaron las cepas *L. brevis* 2S1.12b y *L. plantarum* 2S1.9 como microorganismos con posibilidad a ser considerados probióticos. Por lo que el objetivo de este trabajo es realizar la caracterización del potencial probiótico de ambas cepas con base en los criterios establecidos en la guía para la evaluación sistemática de probióticos en alimentos de la FAO/WHO (2002).

3. Antecedentes

3.1 Problemas Gastrointestinales

Mundialmente, los padecimientos gastrointestinales son considerados problemas de salud pública al no solo afectar a la población infantil sino también a personas de cualquier edad y condición social, los cuales son consecuencia de estilos de vida poco saludables debido al consumo de alimentos preparados con una higiene inadecuada.

Dentro de los problemas gastrointestinales más comunes se encuentran las enfermedades causadas por microorganismos, cuya presencia en el organismo es evidenciada generalmente por provocar diarreas (Godínez-Oviedo, 2017). Por otro lado, existen padecimientos vinculados a la dieta, debido a la intolerancia hacia algunos alimentos, modificación en la microbiota intestinal, lo cual a su vez desencadena reacciones inflamatorias intestinales (Moctezuma *et al.*, 2016).

3.1.1 Enfermedades gastrointestinales en México

En México, uno de los principales problemas de salud pública son las enfermedades gastrointestinales, las cuales afectan a personas de cualquier edad, aunado a su vez a factores socioeconómicos y nutricionales, en donde ancianos y niños son los más propensos a ellas, en este país la cuarta causa de morbilidad hospitalaria son las infecciones intestinales (INEGI, 2016). La alimentación y el estado nutricional de cada individuo influyen en la predisposición de algunas personas a contraer enfermedades gastrointestinales, la malnutrición por lo tanto puede ser el origen o la consecuencia de esta (Hernández *et al.*, 2011).

Estas infecciones son de índole básicamente bacteriano o parasitario, de modo que causan gastroenteritis, la cual es una inflamación del tracto gastrointestinal. Al ser uno de los principales problemas de salud pública en México, es importante la disminución de las incidencias de las enfermedades gastrointestinales (Vila, *et al.* 2009).

Las enfermedades gastrointestinales son causadas principalmente por bacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp., así como parásitos, por ejemplo, *Giardia lamblia* o *Entamoeba histolytica* (Restrepo *et al.*, 2006).

Como se mencionó anteriormente, estas infecciones ocurren al ingerir alimentos contaminados, lo cual ocurre a través de tres principales vías. En primer lugar, contaminación de un alimento a otro, la cual ocurre en los alimentos crudos o sin desinfectar que al estar en contacto con alimentos listos para consumir se pueden contaminar. En segundo lugar, es de persona a alimento, en donde la manipulación no higiénica de los alimentos puede transferir microorganismos de uno a otro. Por último, la contaminación de superficie a alimentos, en donde se emplean utensilios o recipientes sucios en contacto con alimentos listos para el consumo.

Debe ser primordial, el conocimiento y práctica entre la población de las medidas de prevención que deben tomarse para no padecer alguna enfermedad gastrointestinal, así como mejorar la calidad de vida de los habitantes de comunidades rurales mediante el suministro de agua potable y los servicios básicos. Aunado a ello, es importante la búsqueda de otras opciones que permitan mejorar la resistencia al padecimiento de este tipo de infecciones.

3.1.1.1 Enfermedades inflamatorias intestinales

Las enfermedades inflamatorias intestinales son un conjunto de padecimientos asociados a la inflamación crónica del tracto gastrointestinal, los cuales se presentan con periodos de recaída y remisión. Estas enfermedades se asocian a diversas causas como lo son cambios en el sistema inmune, modificación de la microbiota intestinal, así como factores genéticos y ambientales, por lo que se considera una enfermedad multifactorial (Yamamoto *et al.*, 2017).

En este grupo se encuentran la enfermedad de Crohn, la cual puede afectar a todo el tracto intestinal, la colitis ulcerosa se limita al colon y en los casos clínicos en donde no es posible diferenciar entre colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn se indica como colitis indeterminada (Sylvester, 2011).

La microbiota intestinal presenta un rol importante en la conservación de la salud del hospedero, en personas sanas se ha observado la presencia de dos phylum principalmente, siendo estos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, sin embargo, en personas con enfermedad inflamatoria intestinal se ha observado la disminución en la diversidad del phylum *Firmicutes* en muestras fecales, mediante estudios metagenómicos, respecto a la población sana (Manichanh *et al.*, 2006; Kang, *et al.*, 2010), lo cual proporciona un indicio de la importancia de la interacción entre la microbiota intestinal y la respuesta inmune del hospedero como un factor en la disminución de la incidencia de dicho padecimiento.

3.1.1.2 Maldigestión de la lactosa

La lactosa es un disacárido presente en la leche y en productos derivados de la misma, para su digestión es necesaria la presencia de la enzima β -galactosidasa con el fin de generar monosacáridos que son fácilmente absorbidos en el intestino delgado (Terrés *et al.*, 2002). No obstante, la digestión de este carbohidrato es influenciado por tres factores, siendo estos, la superficie de absorción, la cantidad de enzima y la velocidad del tránsito gastrointestinal (Marteau *et al.*, 1997).

Del dos al tres por ciento de la población presenta intolerancia a la lactosa, la cual es debida a la deficiencia de la enzima β -galactosidasa, por lo cual la lactosa no es digerida, lo que origina diversos síntomas gastrointestinales como dolor abdominal, diarrea y flatulencias (Savaiano *et al.*, 2013).

Por otro lado, del 50 al 70 % de la población puede sufrir maldigestión de la lactosa, la cual presenta síntomas similares a la intolerancia de este carbohidrato, por tanto llegan a ser confundidos ambos padecimientos, en cambio, una mala digestión de la lactosa es debida a una disminución en la funcionalidad de la enzima que hidroliza el enlace entre los monosacáridos glucosa y galactosa, lo cual permite el paso de la lactosa hasta el colon, en donde es fermentada por los microorganismos presentes (Rosado, 2016).

Bacterias como los lactobacilos producen la enzima β -galactosidasa, la cual actúa igual que la enzima de origen humano encargada de romper el enlace glucosídico de los monosacáridos constituyentes de la lactosa, permitiendo su digestión en personas con deficiencia en la actividad de esta enzima (Madry *et al.*, 2012), favoreciendo así la disminución de los malestares causados por el consumo de productos lácteos.

3.2 Alimentos funcionales

De manera general, un alimento es un producto que, al ser ingerido, posee una serie de nutrientes que cumplen determinadas funciones en el organismo, no obstante, se han realizado investigaciones asociadas a su consumo, que además de brindar nutrientes, también aporten un bien adicional, siendo este asociado a la mejora de la salud de quien lo ingiere.

Existen diversas definiciones adscritas al término alimento funcional, proporcionadas por varias organizaciones, esto ligado a la concepción y cultura de cada país, sin embargo, la IFIC (2010), los define como alimentos o componentes que, al ser incluidos en la dieta, pueden aportar un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica. Su impacto es debido a la característica particular de algunos de sus componentes que afectan funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico o psicológico al contribuir a la conservación de la salud y/o a la disminución del riesgo de contraer enfermedades (Araya *et al.*, 2003).

Los componentes bioactivos de los alimentos funcionales que generan efectos en la salud se conocen comercialmente como nutraceuticos, siendo estos, sustancias nutricionales y farmacéuticas. Sin embargo, hay una cantidad extensa de componentes bioactivos en los alimentos, dentro de los cuales se encuentran antioxidantes, fibra, microorganismos benéficos, siendo estos conocidos como probióticos, por otro lado, también existen los prebióticos, los cuales, al no ser metabolizados por el cuerpo humano, tras ser ingeridos llegan intactos al intestino para ser consumidos por la microbiota intestinal (Tamang *et al.*, 2010).

3.3 Alimentos fermentados

Las bebidas y alimentos fermentados son aquellos que presentan para su elaboración, actividad microbiana que, a través de reacciones metabólicas, se generan ácidos orgánicos y alcoholes principalmente, lo cual modifica las características organolépticas originales del alimento (Madigan *et al.*, 2015).

La gran mayoría de los alimentos fermentados son realizados de manera tradicional, en donde los sustratos, cepas, contenedores y condiciones de fermentación son asociado a la cultura de cada país y región de este. Actualmente se sabe de la existencia de más de 5000 variedades de alimentos fermentados (incluyendo bebidas) elaborados a partir de distintas bases de alimentos como lo son vegetales, frutas, semillas, carne y leche, etc. (Paramithiotis, 2017).

La fermentación, si bien fue empleada inicialmente como un método de conservación de los alimentos, también tiene relación otro tipo de características que se desarrollan durante este proceso como lo es el aumento en su valor nutritivo debido al enriquecimiento en proteínas y aminoácidos aunado a la disminución en el contenido de carbohidratos, también aumenta su contenido de vitaminas, las cuales se generan como metabolitos de algunos microorganismos (García *et al.*, 2004).

Por otra parte, la fermentación favorece la disminución considerable de la presencia de toxinas y microorganismos patógenos como se mencionó previamente por la producción de metabolitos y condiciones que inhiben el desarrollo de estos microorganismos y de descomposición, no obstante, la fermentación de alimentos permite la reducción en los tiempos de cocción y elaboración de los alimentos ya que, en la mayoría de los casos, no es necesario someter a cocción los alimentos fermentados para poder ser ingeridos y al ser la fermentación, un proceso de conservación es fácilmente almacenable para su posterior consumo (Steinkraus, 2002).

Mediante estudios recientes se ha demostrado que algunos alimentos fermentados mexicanos muestran actividad probiótica (Wacher, 2014). En México existen diversos alimentos fermentados como lo son bebidas cuya producción es desarrollada en lugares específicos del país, por lo que algunos de estos alimentos únicamente son elaborados en poblados, lo que genera un conocimiento limitado de su existencia, pero otros tales como el Pozol, tepache, tesgüino y el pulque, son elaborados en diferentes estados del país (Jiménez *et al.*, 2010).

3.3.1 Pulque

Dentro de los platillos y bebidas tradicionales de México se encuentra el pulque, la cual es una bebida fermentada alcohólica, de aspecto lechoso y viscoso, que llega a presentar de 4 a 7% de alcohol. Se elabora a partir del aguamiel procedente de ciertas especies de maguey como lo son: *Agave salmiana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, entre otras. Esta bebida es producida principalmente en los estados del centro de México como Hidalgo, Tlaxcala, Morelos, Puebla y Querétaro (García *et al.*, 2004).

3.3.1.1 Orígenes

Históricamente varias civilizaciones al desarrollarse en vastas zonas geográficas, en donde el maguey era una especie endémica, se narran distintos orígenes del pulque, no obstante, la leyenda de Mayahuel es de las más arraigadas a su creación al explicar el surgimiento del maguey y de la bebida (Vela, 2014), esta leyenda narra el encuentro de Mayahuel con el dios Quetzalcóatl, juntos descienden a la tierra, al llegar se unen en representación de su amor en un árbol, en donde cada uno es representado por ramas, sin embargo, la abuela de Mayahuel molesta por esta acción, juntó a demonios estelares, la siguen a la tierra y rompen las ramas que personifican a Mayahuel despedazando sus restos, posterior a ello, Quetzalcóatl retoma su forma, recolecta los restos de la diosa y los entierra, surgiendo de ahí el primer maguey y posteriormente la creación de la bebida que lleve alegría a los hombres (Sierra, 2005).

3.3.1.2 Proceso de elaboración

Al ser el pulque una bebida de origen tradicional, existen variaciones asociadas a su elaboración, todo el proceso es llevado a cabo por un tlachiquero, quien posee los conocimientos necesarios para realizar la extracción y recolección del aguamiel de la manera más productiva y es la persona encargada elaboración del pulque (Fournier *et al.*, 2012; Escalante *et al.*, 2016), el proceso tradicional de elaboración del pulque consiste en general en cuatro etapas, como se observa en la Figura 1.



Figura 1. Proceso general de la elaboración del pulque.

Pasos del procedimiento:

- 1) **Proceso de castración del maguey:** Se realiza únicamente a las plantas de maguey maduras, de entre 6 y 15 años de edad, una vez seleccionadas, se procede a efectuar la castración, lo cual consiste en eliminar el quiote de la planta y generar un hueco dentro de esta con la finalidad de recolectar el aguamiel, previo a que este florezca o no podrá producir aguamiel.
- 2) **Raspado del maguey:** Las paredes interiores del maguey son raspadas, dichas laceraciones favorecen la acumulación de aguamiel, del cual puede recolectarse hasta 6 litros en su interior.
- 3) **Extracción del aguamiel:** la savia acumulada en el interior del maguey se colecta dos veces al día, mediante el uso de un acocote, que es una calabaza hueca que permite la succión del aguamiel y se deposita en tinajales.
- 4) **Fermentación:** Este último paso es el que permite la modificación del aguamiel en pulque, una vez recolectada la savia del maguey se procede a inocularlo a partir de una semilla, la cual es una porción de pulque del lote anterior, esta es resguardada y constantemente renovada con aguamiel para evitar su descomposición, en este inóculo la comunidad microbiana es asociada a las condiciones geográficas del lugar y de higiene durante el proceso de elaboración, esta se estabiliza durante el tiempo de fermentación, este varía en función de la calidad del aguamiel empleado, este proceso puede durar de 3 a 6 horas (Escalante *et al.*, 2016).

Una vez incorporada la semilla, se desarrollan los microorganismos presentes dando origen a tres tipos de fermentaciones siendo éstas: fermentación tipo ácida (generación de ácidos láctico y acético), fermentación alcohólica (obtención de etanol) y viscosa (producción de exopolisacaridos), las cuales le confieren al pulque sus características organolépticas y benéficas a la salud (Escalante *et al.*, 2012).

Dentro de los estudios realizados para la caracterización de la microbiota asociada al pulque se ha encontrado a *Saccharomyces cerevisiae*, *L. mesenteroides* y *Z. mobilis* como esenciales para el proceso de fermentación de esta bebida mexicana, sin embargo, se ha encontrado una gran diversidad de levaduras y bacterias ácido lácticas dentro de las que destacan las del género *Lactobacillus* (Escalante *et al.*, 2008).

3.3.1.3. Composición fisicoquímica y microbiológica

El aguamiel es la savia que se obtiene de los magueyes pulqueros, se observa como un líquido incoloro cuya composición principal consiste en agua, oligosacáridos, proteínas, minerales vitaminas y otros azúcares como xilosa y arabinosa (Escalante *et al.*, 2012). La composición del aguamiel presenta variaciones entre las especies de Agave, la estación del año en el que se recolecte, así como las condiciones de cultivo de la planta, sin embargo, estudios realizados en distintas muestras de aguamiel (Ortíz-Basurto *et al.*, 2008) indican que no se encontraron diferencias significativas en su contenido de oligosacáridos, excepto en muestras almacenadas más de 3 meses tras su colecta, los carbohidratos presentes, propician que el aguamiel sea un medio óptimo para la proliferación de una gran diversidad microbiana que incluye bacterias homo-fermentativas y hetero-fermentativas.

La fermentación del aguamiel da paso a la formación del pulque, en donde se modifica su composición principalmente en cuanto a la disminución en el contenido de carbohidratos, mayor disponibilidad de la proteína y disminución del pH de 6.0 a 4.5, así como el aumento en su viscosidad y presencia de etanol (Escalante *et al.* 2012).

Debido al proceso de elaboración del pulque, la diversidad de microorganismos involucrados es variable en función de la región y condiciones de elaboración, así mismo esta heterogeneidad de microbiota se modifica durante el tiempo de fermentación.

Inicialmente Sánchez-Marroquín (1953) propuso como los principales microorganismos implicados en la fermentación del aguamiel a *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* y *Leuconostoc mesenteroides*. Estudios recientes demuestran la variedad microbiana presente en el aguamiel y pulque, en donde destaca la presencia de levaduras, como *Saccharomyces* sp., α y γ -Proteobacterias así como miembros del phylum *Firmicutes* en donde sobresale la presencia de bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus* sp. *L. citreum* y *L. kimchi* (Escalante *et al.*, 2008). Por otra parte, hay una relación entre la diversidad microbiana presente en el pulque y su efecto antimicrobiano frente a patógenos como *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, aunado a sus características fisicoquímicas de pH y contenido de alcohol lo cual lo vuelve una bebida microbiológicamente segura para su consumo (Gómez-Aldapa *et al.*, 2011).

3.4 Probióticos

Metchnikoff (1907), expresó en un contexto científico a los probióticos como la modificación de la diversidad de la comunidad microbiana del interior del cuerpo humano al reemplazar los microorganismos patógenos por otros benéficos; Actualmente los probióticos se definen como microorganismos vivos que administrados en las cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico al hospedero (FAO/OMS, 2002), debido a lo cual pueden ejercer sus efectos beneficiosos en el huésped mediante su crecimiento y/o actividad en el cuerpo humano, por lo cual, lo más importante es su capacidad de seguir siendo viable en el lugar de destino y de ser eficaz, por lo que el concepto de probiótico está ligado a la interacción bacteria-hospedero para la generación de un efecto benéfico sobre la salud de este último.

La mayoría de los probióticos son pertenecientes al grupo de las bacterias ácido-lácticas, las cuales, como se mencionó anteriormente participan en la elaboración de diversos alimentos fermentados como el yogurt, siendo el producto con probióticos más conocido entre la población y cuya ingesta es asociada a diversos beneficios a la salud del consumidor. Dentro de los géneros comúnmente descritos

como posibles probióticos se encuentran los *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Tamang, *et al.*, 2010).

En cuanto a los microorganismos probióticos es necesario realizar una consideración ecológica de la microbiota intestinal, para comprender su relevancia en la salud. Cada individuo presenta una comunidad microbiana única, de más de 1000 especies diferentes en el tracto gastrointestinal, en total, esta comunidad de microorganismos se comprende de entre 10^{11} a 10^{12} UFC/g (Kerry *et al.*, 2018).

La colonización bacteriana del intestino comienza en el nacimiento cuando los recién nacidos se exponen por primera vez a un ambiente no estéril, a partir de este punto y durante toda la vida esta comunidad se irá modificando, dependiendo de una interacción compleja y dinámica entre la dieta, el genoma y el estilo de vida del huésped, sin embargo, es mayormente estable durante la etapa adulta del individuo (Lloyd-Price *et al.*, 2016).

Los hábitos de vida actuales modifican de manera negativa la microbiota intestinal, lo cual genera la necesidad de consumir alimentos que además de nutrir, presenten un beneficio adicional a la salud, dentro de estos atributos se encuentran los prebióticos y los probióticos en donde, los primeros son carbohidratos de cadena corta principalmente, que llegan intactos al intestino y sirven como alimento para los microorganismos presentes, que tras su metabolismo ejercen efectos funcionales sobre la mucosa del tracto digestivo (Brunser, 2017).

3.4.1 Beneficios asociados al consumo de probióticos

Actualmente los probióticos se pueden ingerir a partir de matrices alimentarias o en su forma farmacéutica en concentrados, sin embargo, los beneficios asociados al consumo de probióticos, sin importar su presentación, se encuentran ligados a beneficios nutricionales, estimulación del sistema inmune, además de efecto antagónico frente a patógenos. La utilidad y beneficios aportados por el consumo de probióticos están ligados a su modo de acción, en la Figura 2, se presentan algunos de los mecanismos que siguen.



Figura 2. Mecanismos de acción de los probióticos.

Elaborado a partir de: Soriano *et al.*, 2003; Arribas, 2009; Wohlgemuth *et al.*, 2010; Monteagudo *et al.*, 2012; Medina *et al.*, 2014.

El mecanismo de acción de los probióticos no es uniforme para todos ya que no ejercen los mismos efectos, dependerán del microorganismo e incluso pueden existir diferencias entre cepas de una misma especie, sin embargo, de manera general mejoran la resistencia a la colonización por patógenos. Diversos estudios muestran efectos diferentes asociados a algunas cepas como lo es favorecer la reducción del colesterol, tratamiento a la intolerancia a la lactosa, prevención y tratamiento de diarrea. (Gaik *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018).

3.4.2 Guía FAO/OMS Criterios de evaluación

La FAO/OMS (2002), realizó una serie de directrices para la evaluación de posibles probióticos, dentro de este consenso, los puntos más importantes son los que se enumeran a continuación:

1. **Clasificación e identificación de las distintas cepas:** La nomenclatura de los probióticos debe seguir las indicaciones actuales de taxonomía, un aspecto importante para considerar a un microorganismo como probiótico es la importancia del concepto de cepa dentro de la especie, para lo cual se deben llevar a cabo métodos genéticos reproducibles, tales como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), a su vez se recomienda realizar primero ensayos fenotípicos, seguidos de la identificación genética mediante métodos como la hibridación de ADN con ADN, la determinación de secuencias del ARN 16S u otros métodos reconocidos internacionalmente.
2. **Pruebas *in vitro*:** Dentro de las pruebas a realizar se encuentra la resistencia a las condiciones gastrointestinales por lo que se deben efectuar ensayos de resistencia a pH similar al del estómago, también resistencia a sales biliares, así como adherencia a las líneas celulares humanas y actividad antimicrobiana frente a otros microorganismos. Dichas pruebas no son definitivas y deben ser corroboradas mediante estudios *in vivo* en ensayos clínicos.
3. **Consideraciones relativas a la inocuidad:** En general deben cumplir unas condiciones básicas mínimas, como son la ausencia de resistencia a los antimicrobianos, la ausencia de efectos secundarios en estudios en humanos y la ausencia de factores de virulencia.

3.4.3 Criterios y métodos para la evaluación de probióticos frente a patógenos

Dentro de los parámetros empleados para evaluar a un microorganismo con potencial probiótico además de presentar resistencia a la acidez gástrica y a sales biliares, se encuentra su efecto antagonista hacia patógenos.

Dentro de las características asociadas a este efecto se encuentra la adherencia a la mucosa intestinal ya que ejerce efectos inmunomoduladores, así como la reducción en la capacidad de la adhesión de la microbiota competitiva y la producción de metabolitos que inhiben su desarrollo (Collado *et al.*, 2007). En la Tabla 1, se enlistan algunos de los métodos comúnmente empleados para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de microorganismos probióticos *in vivo* e *in vitro*.

Tabla 1. Métodos para la evaluación *in vivo* e *in vitro* del efecto antagónico de probióticos frente a patógenos.

Métodos <i>in vitro</i>		
Método	Prueba	Observaciones
Ensayo de antibiosis	Efecto antimicrobiano célula-célula.	A partir de la observación de un halo de inhibición de la cepa patógena alrededor de un cultivo puro de la cepa potencialmente probiótica.
Difusión en agar	Efecto antimicrobiano del sobrenadante.	Se realiza la separación de las células y el sobrenadante con el cual se realizan ensayos.
Macrodilución en caldo	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).	Es la determinación de la cantidad mínima de bacteria probiótica capaz de impedir el crecimiento bacteriano.
Adherencia a líneas celulares	Efecto antimicrobiano indirecto (Efecto barrera).	Mediante la adhesión al epitelio intestinal de las bacterias probióticas se impide la adhesión y posterior colonización por parte de patógenos.

Tabla 1. Métodos para la evaluación *in vivo* e *in vitro* del efecto antagónico de probióticos frente a patógenos (Continuación).

Métodos <i>in vivo</i>		
Efecto protector en huésped.	Cuantificación bacteriana en órganos diana.	A partir de la administración con el posible probiótico en un modelo animal definido (ratones, ratas, cobayas, lechones, etc.) acorde con el objetivo y uso del microorganismo, se administra un patógeno frente al cual se desea evaluar su efecto antagonista.

Elaborado a partir de: Hernani *et al.*, 2007; Montiel *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2011; Lasserrot, 2015; Muñoz, 2015; Jurado-Gómez *et al.*, 2017.

3.5 Bacterias ácido-lácticas

Las BAL pertenecen al phylum *Firmicutes*, a su vez comprende aproximadamente 20 géneros, aunque, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weisella* son los más representativos de este grupo microbiano (Maldonado *et al.*, 2018). Las bacterias ácido lácticas tienen un alto potencial, ya que son empleadas en la elaboración de alimentos fermentados tanto artesanales como a nivel industrial, a partir de diversas matrices alimentarias, modificando sus características sensoriales y nutricionales, así mismo, varias de estas bacterias son utilizadas como probióticos.

Este grupo de bacterias se divide dependiendo de su producto final del metabolismo de la glucosa, siendo estos, las homofermentativas, en donde el único producto es el ácido láctico y las heterofermentativas, son aquellas que producen cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono y etanol (Jay *et al.*, 2009). Además de los productos previamente mencionados, las BAL producen distintos metabolitos como acetaldehído y acetilo, además de algunas sustancias antimicrobianas (Savadogo *et al.*, 2006).

3.5.1 Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus*, se encuentra presente en la composición de la microbiota intestinal, cuya identidad y concentración varía dependiendo de la edad del hospedero y su localización dentro del intestino, por lo que es el género microbiano más asociado a alimentos fermentados y productos probióticos (Iñiguez-Palomares, *et al.*, 2014).

Este género comprende un amplio grupo de bacterias no esporuladas, catalasa negativa, de morfología bacilar o cocobacilar de distintas longitudes, además son microaerófilos, por lo que requieren una baja presencia de oxígeno en el medio donde se desarrollen, así mismo, la mayoría de estas bacterias pueden crecer en medios cuyo pH es inferior a cuatro, por lo cual, permanecen presentes en la mayoría de los alimentos fermentados tras metabolizar los carbohidratos presentes (Vasiee, *et al.*, 2014).

3.5.2 Efectos asociados al consumo de lactobacilos

Los lactobacilos presentan un papel importante en el hospedero, ya que realiza o complementa una serie de funciones metabólicas necesarias para el desarrollo del organismo, como la síntesis de vitaminas y la biodisponibilidad de minerales mediante la descomposición de taninos y fitatos (Zhang *et al.*, 2018), distintas cepas de este género pueden activar diversos componentes de la respuesta inmune, mediante la capacidad de producir y secretar metabolitos específicos que influyen en las células del hospedero (Su *et al.*, 2017).

El tracto gastrointestinal alberga una compleja comunidad microbiana, en donde se ha desarrollado una relación simbiótica ya que sus interacciones presentan un efecto sobre la salud del hospedero, puesto que las bacterias presentes en el intestino modulan el desarrollo del sistema inmune.

Los lactobacilos generan varios efectos benéficos a la salud del hospedero, cuando son administrados bajo diferentes circunstancias, algunos de ellos son descritos en la Figura 3.

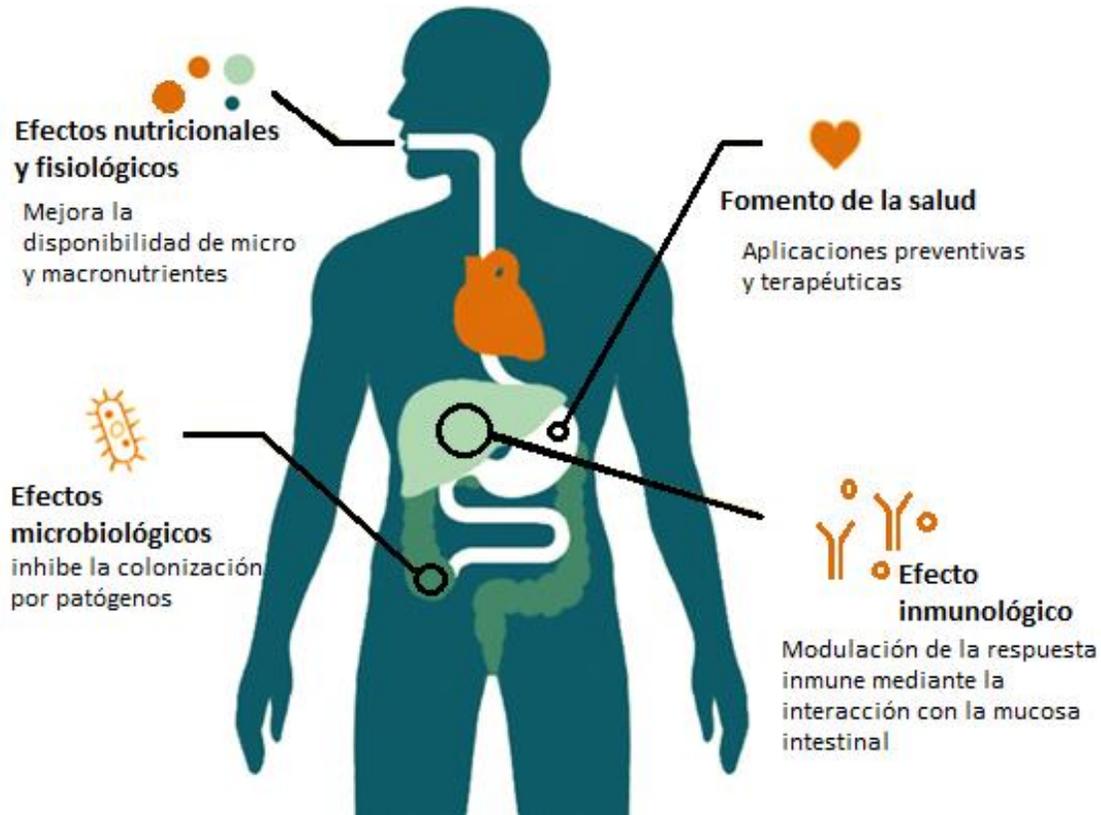


Figura 3. Efectos y aplicaciones de bacterias del género *Lactobacillus*.

Adaptado de Singh *et al.*, 2017 y Zhang *et al.*, 2018

El efecto benéfico asociado al consumo de lactobacilos como probióticos depende de su capacidad de adaptación al intestino del hospedero, ya que, tras su ingesta es sometido a factores de estrés como el pH gástrico y la presencia de sales biliares, por lo que, los mecanismos de resistencia de este tipo de bacterias mantienen la integridad de la célula, mediante la exportación de macromoléculas además de la detección de factores de estrés como los mencionados anteriormente (Zhang *et al.*, 2018).

Varias de las especies del género *Lactobacillus*, son parte de la composición de alimentos fermentados, en la Tabla 2, se encuentran descritos algunos de ellos y ejemplos de los alimentos donde se han encontrado, así como los beneficios asociados a estos, cabe aclarar que se pueden hallar en más de uno, ya que estos actúan como comunidades microbianas y no todas las cepas de dicha especie presentan las mismas características benéficas al ser consumidas, un ejemplo de ello son *L. reuteri* NCIMB 701089, *L. plantarum* 299v, *L. plantarum* LP14 y *L. gasseri* SBT2055, las tres cepas han demostrado tener efectos sobre la reducción de los niveles de colesterol en sangre, mediante distintos mecanismos de acción (De Vries, 2006; Rodríguez *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018).

Tabla 2. Bacterias del género *Lactobacillus* asociados a alimentos fermentados y sus beneficios.

Especie	Alimentos donde se han encontrado	Beneficios asociados
<i>L. acidophilus</i>	Leche ácida, yogurt, tempeh, miso.	Previene y reduce la diarrea, mediante la inhibición de la adhesión de patógenos al intestino.
<i>L. casei</i>	Bebidas a base de leche fermentada, quesos.	Efecto antagonista hacia patógenos.
<i>L. delbrueckii</i> subs. <i>bulgaricus</i>	Yogurt, suero de leche búlgaro, quesos italianos.	Incrementa la digestibilidad de la lactosa, regulación de la inflamación.
<i>L. helveticus</i>	Quesos suizos, yogurt.	Modulación de la respuesta inmune, previene enfermedades intestinales.
<i>L. plantarum</i>	Pulque, kimchi, chucrut, ensilados.	Modulación de la microbiota intestinal e inhibición de patógenos
<i>L. rhamnosus</i>	Quesos, leches fermentadas.	Revierte disbiosis intestinal y diarrea moderada.

Elaborado a partir de: Hudault *et al.*, 1997; Jain *et al.*, 2004; Jay *et al.*, 2009; Pundir *et al.*, 2010; Turróni *et al.*, 2013; Kafsi *et al.*, 2014; Banna *et al.*, 2017; Freitas., 2017.

La adhesión de los lactobacilos al epitelio intestinal es una de las principales características para permitir su colonización y la estimulación de la microbiota presente, lo cual realiza gracias a los componentes de su pared celular como adhesinas, proteínas y polisacáridos, sin embargo, estas propiedades superficiales son modificadas en respuesta a los cambios que se presenten en el ambiente (Sengupta *et al.*, 2013). Esta adhesión influye en la estimulación del sistema inmune y permite actuar como barrera frente a patógenos (Martín *et al.*, 2012; Laurencio-Silva *et al.*, 2017).

Estas bacterias escasamente se han asociado a infecciones, por lo que son en su mayoría descritos como GRAS (generalmente reconocidos como seguros) por la FDA, así mismo son de los microorganismos más estudiados por el efecto benéfico que otorgan tras su consumo, ya que históricamente han sido parte de la elaboración de alimentos fermentados, además de formar parte de la microbiota intestinal humana, sin embargo se han reportado escasos episodios asociados brotes patogénicos son ligados a personas inmunocomprometidas y tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro (Carasi, 2014; Turpin, *et al.*, 2012; Brunser, 2017).

3.6 Género *Salmonella*

Entre los bacilos Gram negativos ligados a padecimientos gastrointestinales, los más importantes son del género *Salmonella*, debido a que se encuentran muy distribuidos, al ser su hábitat natural el tracto intestinal de animales y humanos asimismo es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas (WHO, 2018), aunado a la poca concientización sobre las medidas de higiene necesarias para la manipulación de alimentos.

Este género de bacterias es no esporulado, anaerobio facultativo, poseen flagelos por lo que son móviles. Existen dos especies, *S. bongori* y *S. enterica* a su vez, divididos en subespecie y estos últimos subdivididos en serotipos acorde con el antígeno flagelar o somático que presenten (Figueroa, *et al.*, 2005).

La ingesta de alimentos contaminados es el precursor de la infección por *Salmonella enterica*, sin embargo, no todas las cepas se comportan del mismo modo, una vez que se encuentra en el hospedero estas pueden ser eliminadas por el sistema inmune, presentarse en un portador asintomático o desarrollar la enfermedad la cual dependerá de la concentración del microorganismo, el antígeno que presenta la cepa y el estado fisiológico del individuo (Cardona-Castro *et al.*, 2003). No todas las serovariedades de este género presentan especificidad por el huésped, por lo que son capaces de producir enfermedades en un amplio rango de seres vivos como lo son los mamíferos.

3.6.1 *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium

Una de las serovariedades con mayor incidencia en México es Typhimurium la cual presenta un amplio rango de hospederos, puede generar gastroenteritis, por lo que la ingesta de alimentos con presencia de este microorganismo es la principal causa de diarrea bacteriana (Mussaret *et al.*, 2006). En la Figura 4 se presenta el mecanismo general de invasión de una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, cuya patogenicidad es debida a la regulación de sus genes. Dependiendo del hospedero será el tipo de infección producida por este microorganismo, y al poder infectar tanto a humanos como a animales, se ha empleado como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares que emplea *Salmonella* para desarrollar la infección en el huésped (Haraga *et al.*, 2008). La trascendencia de la infección con *Salmonella* es determinada por los factores de virulencia que emplea esta bacteria para interaccionar y evadir la respuesta inmune del hospedero. Dentro de los factores de virulencia de este género se encuentran las adhesinas, flagelos, así como la capacidad para formar biopelículas.

La primer barrera a la que se enfrenta esta bacteria es el pH ácido del estómago, por lo que activa una respuesta de tolerancia ácida, lo cual le permite mantener un pH intracelular superior al del medio extracelular, posteriormente, al situarse en el epitelio del intestino, al cual se adhiere mediante el uso de distintas adhesinas como lo son las fimbrias, comienza con la invasión, en donde emplea un sistema

especializado de secreción de proteínas, mediada por el SST3 codificado en SPI-1, ya que las proteínas que se translocan por medio de éste hacia la célula intestinal, en donde se genera una serie de cambios fisiológicos, tras lo cual se induce la modificación de la superficie de la célula blanco, generando un ondulamiento que permite que se internalice el patógeno, una vez dentro, permanece en el interior de vacuolas, donde se replica y posteriormente se disemina, así mismo induce la fagocitosis por macrófagos , pero inhibe la presentación de sus antígenos, por lo que pueden migrar hacia hígado y bazo (Parra, *et al.*, 2002). Simultáneamente, se activa una respuesta secretora en el epitelio intestinal, en donde se acumulan fagocitos, asociado a la producción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa e interleucinas (IL-8, IL-23 e IL-1 β), este proceso inflamatorio provoca la acumulación de fluidos que a su vez desencadena la diarrea. (Valdespino, 2018).

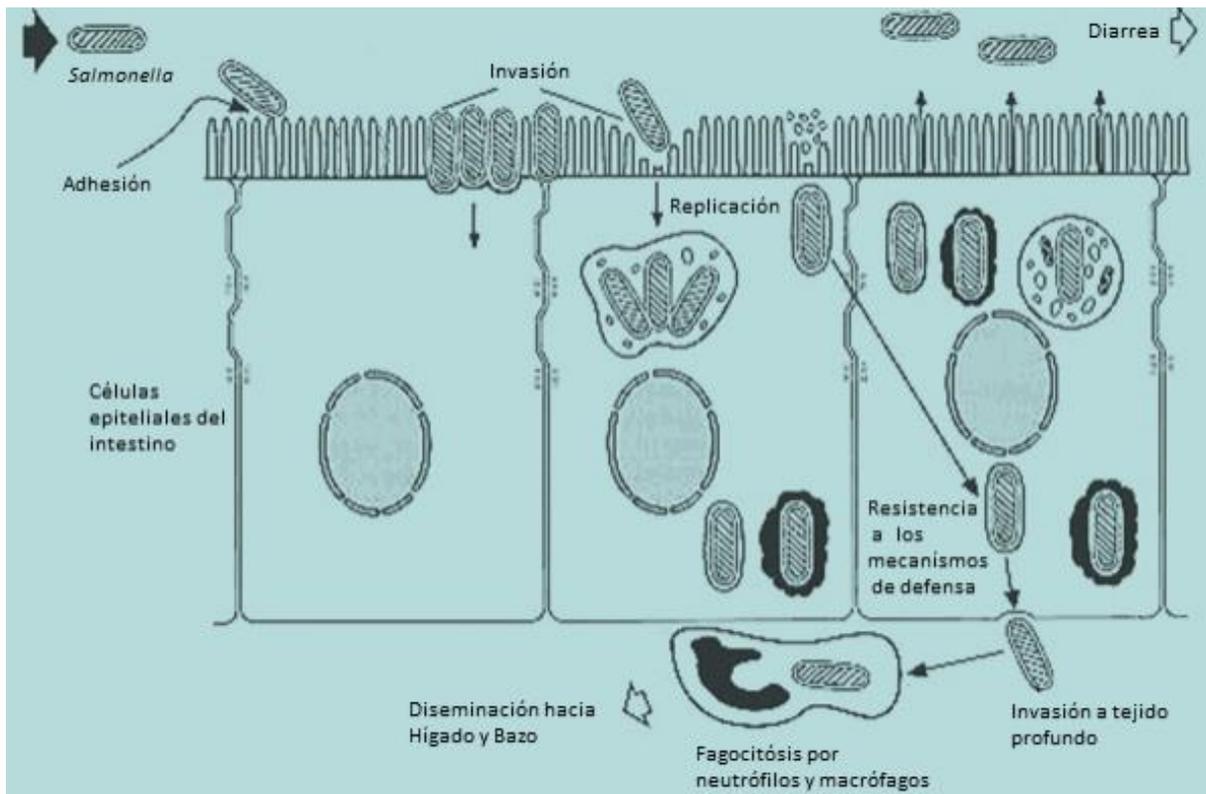


Figura 4. Mecanismo general de infección de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (adaptado de Giannella, 1996).

4. Justificación

Debido a la incidencia de enfermedades gastrointestinales en México, es importante la búsqueda de alternativas para su prevención y tratamiento, actualmente existen en el mercado diversos productos alimenticios que contienen probióticos y prebióticos, en su mayoría de origen lácteo como lo son leches fermentadas, yogurt, quesos, entre otros, de los cuales se han realizado diversos estudios acerca de sus beneficios a la salud, sin embargo, se debe tomar en cuenta que del 70 al 75% de la población puede sufrir maldigestión y más del 3% intolerancia a la lactosa, por lo que es importante encontrar alternativas para el consumo de probióticos de origen no lácteo como lo son los microorganismos presentes en la fermentación del aguamiel para la producción de pulque. Tomando en cuenta lo anterior, este trabajo permitirá la caracterización de cepas presentes en el pulque como lo son los lactobacilos, lo cual permitirá encontrar nuevas alternativas de probióticos endémicos de México y a su vez ahondar en el conocimiento de los beneficios atribuidos a esta bebida fermentada tradicional sin los efectos nocivos del alcohol que contiene.

5. Hipótesis

Las cepas de *Lactobacillus* sp. aisladas del pulque tras ser confrontadas *in vitro* e *in vivo* bajo concentraciones estandarizadas similares a las condiciones gastrointestinales y tras mostrar capacidad antimicrobiana entonces serán capaces de considerarse probióticos.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Caracterizar el potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* P46 y *Lactobacillus brevis* P47 mediante ensayos *in vitro* y seleccionar la cepa que presente características probióticas para evaluar su efecto antimicrobiano frente a una infección de *S. enterica* serovar Typhimurium str^r en modelo *in vivo*.

6.2 Objetivos particulares

- Evaluar el potencial probiótico de las cepas P46 y P47 mediante ensayos *in vitro* en condiciones gastrointestinales de manera cualitativa y cuantitativa con concentraciones estandarizadas.
- Determinar la sensibilidad a antibióticos que presentan las cepas *L. plantarum* P46 y *L. brevis* P47.
- Efectuar ensayos de antibiosis con concentraciones estandarizadas frente a nueve patógenos asociados a enfermedades gastrointestinales y la determinación preliminar del tipo de compuestos antimicrobianos generados por los microorganismos de estudio, empleando como control probiótico a una cepa comercial, como *Lactobacillus casei* Shirota.
- Confirmar la identidad de la cepa con mejores características mediante la secuenciación de su operón ribosomal completo.
- Evaluar la capacidad antagonista de la cepa con los resultados más sobresalientes en las pruebas *in vitro*, frente a *S. enterica* Typhimurium Str^r en ratones Balb/c tomando como referencia a *L. mesenteroides* P45 y *L. casei* Shirota.

7. Metodología

7.1 Esquema de la metodología seguida

En la Figura 5 se muestra un esquema general de la metodología empleada para la evaluación del potencial probiótico de las cepas *L. plantarum* P46 y *L. plantarum* P47.

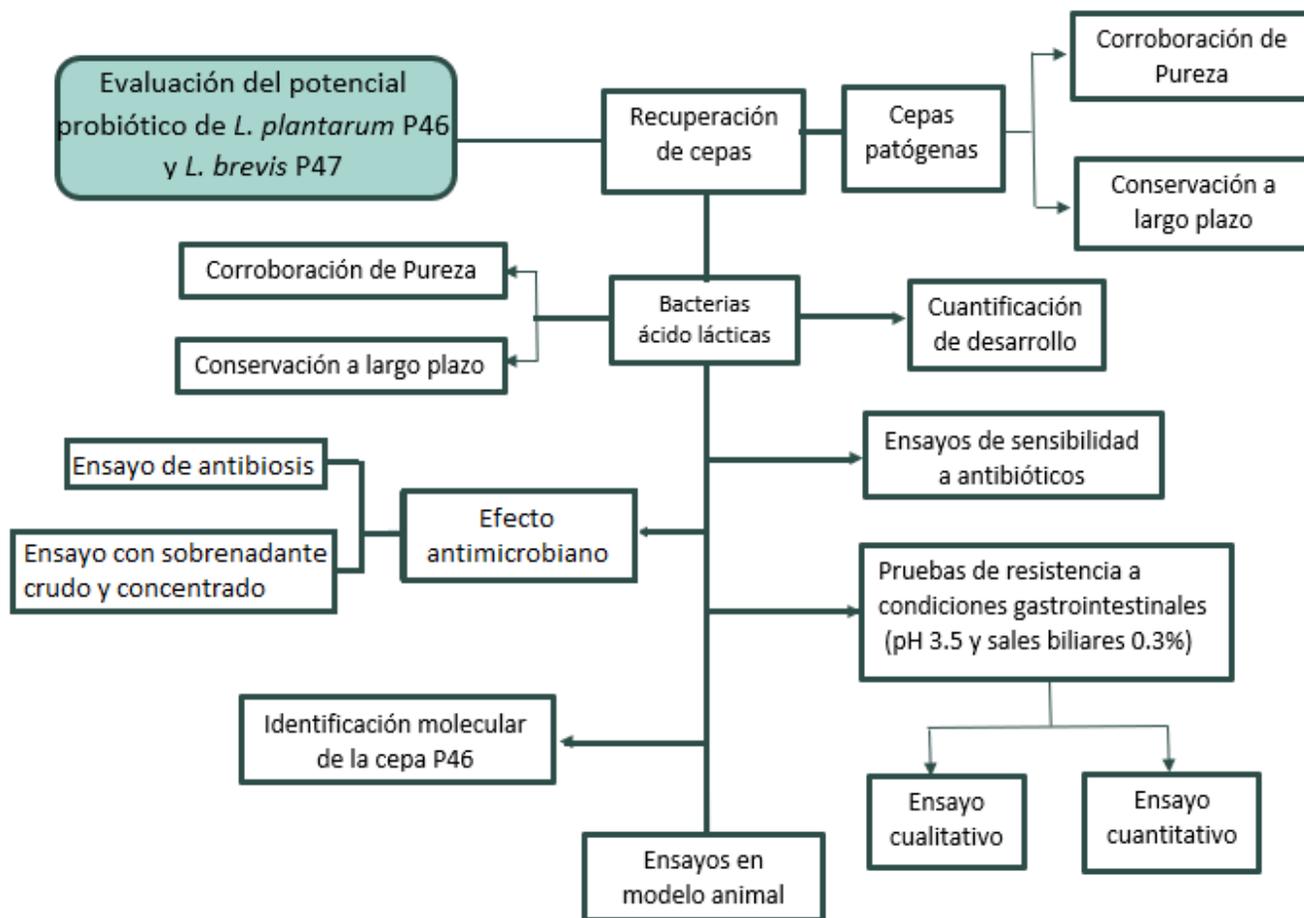


Figura 5. Metodología experimental general para la evaluación del potencial probiótico de las cepas P46 y P47.

7.2 Reactivación y conservación de bacterias ácido-lácticas

Las cepas de estudio *Lactobacillus plantarum* P46 y *Lactobacillus brevis* P47 (previamente aisladas y descritas como *L. brevis* 2S1.12b y *L. plantarum* 2s1.9; Gutiérrez, 2015), fueron conservadas por ultracongelación a -70°C , por lo que se tomó con palillo de madera estéril una muestra y se inoculó en 4.5 mL de caldo MRS o APT (Difco) incubando a $37^{\circ}\text{C}/24$ h, en condiciones de microaerofilia (atmósfera rica en CO_2 mediante la reacción entre 1g de ácido cítrico y 2g de NaHCO_3 , en jarra anaeróbica). La cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45 conservada por ultracongelación a -70°C fue reactivada en 4.5 mL de caldo MRS o APT incubando a $28^{\circ}\text{C}/24$ h.

Posteriormente, se reinoculó a las tres cepas por agotamiento radial a caja de agar MRS o APT (Difco) incubadas en las condiciones correspondientes mencionadas previamente. Tras desarrollar el cultivo, se corroboró su pureza mediante tinción Gram (como se indica en el punto 7.2.2) y se realizó una suspensión saturada de cada microorganismo en 4.5 mL caldo MRS de la cual se tomó 500 μL y se colocó en crioviales de 1 mL de capacidad junto con 500 μL glicerol al 50%, tras homogenizar, se preservaron a largo plazo por crioconservación a -70°C .

7.2.1 Aislamiento y conservación de la cepa de referencia.

Como cepa de referencia probiótica para este trabajo se empleó a *L. casei* Shirota la cual se aisló a partir del producto comercial Yakult 40 LT, mediante estriado por cuadrantes en agar MRS, se incubó a $37^{\circ}\text{C}/24$ h, en microaerofilia (inciso 7.2), de las colonias obtenidas se corroboró su pureza mediante tinción Gram y prueba de la catalasa (punto 7.2.2), tras lo cual se realizó una suspensión saturada de este cultivo en 4.5 mL de caldo APT o MRS y se conservó a largo plazo en crioviales de 1 mL de capacidad con 500 μL de la suspensión realizada y 500 μL de glicerol al 50%, conservando en ultracongelación a 70°C .

7.2.2 Corroboración de pureza de bacterias ácido-lácticas

A partir de cultivos de 24 h incubados en las condiciones descritas en el punto 7.2, se corroboró su pureza mediante la observación de su morfología colonial en agar MRS o APT, posteriormente se realizó la tinción de Gram y se observó su morfología al microscopio, del mismo cultivo se realizó la prueba de la catalasa, ya que la ausencia de dicha enzima es característica de este género (Cástulo *et al.*, 2008).

7.3 Cepas patógenas empleadas

En la Tabla 3, se muestran las cepas patógenas utilizadas en este trabajo y los medios en los que se cultivaron. Se empleó tres cepas Gram negativo y seis cepas Gram positivo para ensayos de antibiosis (inciso 7.9) y una cepa Gram negativo para la evaluación en modelo animal (inciso 7.14), tales microorganismos fueron seleccionados por ser previamente empleadas en retos microbianos frente a bacterias ácido-lácticas (Matus, 2011; García-Cano *et al.*, 2011).

Tabla 3. Cepas patógenas empleadas.

Cepa	Medios de cultivo	Procedencia
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium STR ^r	Agar Luria-Bertani*, agar y caldo luria (DIBICO) con 100 µL/mL estreptomina (Sigma-Aldrich)	Donada por el Dr. José Adelfo Escalante Lozada; Instituto de Biotecnología, UNAM.
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium cepa ATCC14028	Agar y caldo Luria (DIBICO)	
<i>E. coli</i> 11229		Colección del Ceparario de la Facultad de Química, UNAM.
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853		
<i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	Agar y caldo (BHI) infusión cerebro-corazón (DIBICO)	
<i>S. pyogenes</i> CFQ-B-218		
<i>S. aureus</i> ATCC6538		
<i>E. faecalis</i> CFQ		
<i>B. cereus</i> CFQ-B-230		
<i>B. subtilis</i> ATCC6633		

*el agar LB fue preparado por componentes [agar 1.5% (DIBICO), tripeptona 1% (DIFCO), Extracto de levadura 0.5% (DIFCO) y NaCl 0.5% (J.T. BAKER)].

7.3.1 Conservación de cepas patógenas

Los microorganismos patógenos empleados, fueron recuperados a partir de cultivos inoculados por agotamiento radial en agar Luria o BHI (acorde con la Tabla 3) de los cuales se corroboró su pureza mediante tinción Gram.

Para realizar su conservación a largo plazo se realizó una suspensión saturada en caldo (Luria o BHI) a partir de cultivos puros de 24 horas de incubación a 37°C, del cual se depositó 500 µL en un criovial de 1 mL de capacidad y 500 µL de glicerol al 50%, tras ser homogeneizado se conservó en ultracongelación a -70°C.

7.4 Evaluación del desarrollo de *L. plantarum* P46 y *L. brevis* P47 a la temperatura del cuerpo humano.

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* P46 y *Lactobacillus brevis* P47 fueron reactivadas como se indica en el inciso 7.2, tras lo cual se inocularon 500 µL del cultivo previo en 4.5 mL de caldo APT por duplicado, incubando a 28°C/24 h un juego de cepas y a 37°C/24h el duplicado, ambos en condiciones reducidas de oxígeno (inciso 7.2).

Se realizaron diluciones decimales seriadas en 9 mL de solución salina isotónica (0.9 %P/V), a partir de los cultivos puros de *L. plantarum* P46 y *L. brevis* P47 previamente desarrollados. Se efectuó la cuenta en placa inoculando 0.1 mL del cultivo por extensión superficial en agar MRS o APT, para conocer el crecimiento de las cepas empleadas tras 24 h de incubación en las condiciones descritas anteriormente.

Dicho ensayo se realizó por duplicado y se determinó su desviación estándar para todos los casos, con el fin de corroborar la confiabilidad de los datos obtenidos (adaptado de: ISO-IDF 20128:2006).

7.5 Determinación de la resistencia a antibióticos de las bacterias ácido lácticas mediante la tira ATB STREP 5

El indiscriminado uso de antibióticos tanto en humanos como en animales de consumo ha promovido la resistencia a antibióticos por parte de microorganismos, no solo patógenos, lo cual ha generado serios problemas en el tratamiento de infecciones bacterianas (Saarela *et al.*, 2009).

El sistema ATB consiste en análisis miniaturizados que permiten determinar la sensibilidad a antibióticos en un medio semi-sólido en condiciones muy próximas a las técnicas de referencia de dilución en agar o de microdilución (según las recomendaciones de CLSI), el análisis se basa en la presencia o ausencia de turbidez en el medio mediante el cual se demuestra la resistencia o sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos presentes en cada pozo a distintas concentraciones.

Se reactivaron las cepas *L. mesenterioides* P45, *L. plantarum* P46, *L. brevis* P47 y *L. casei* Shirota como se indica en el inciso 7.2 y se realizó la suspensión bacteriana de cada una, de turbidez equivalente al patrón 1 de McFarland en solución salina isotónica (NaCl 0.85% p/v).

Con 200 μ L de la suspensión previa, se inoculó el medio ATB S Medium [triptona 1%, gelisato 1%, bio-soyase 0.3%, extracto de levadura 0.5%, glucosa 0.15%, cloruro de sodio 0.5%, L-arginina 0.1%, piruvato de sodio 0.1%, menadiona 0.5 mg, hemina 15 mg, Agar 0.15%], una vez homogeneizado se inoculó con 135 μ L cada uno de los pozos de la tira ATB STREP 5, se incubó a 37°C en condiciones de microaerofilia durante 24 horas.

Los resultados obtenidos se interpretaron acorde a las indicaciones del proveedor (Biomérieux, 2009), mediante la observación de turbidez en los pozos (+), o su ausencia (-), reportando los resultados como se indica en la Tabla 4, a partir de lo cual se determinó si la cepa fue sensible al antibiótico, con susceptibilidad intermedia o presenta resistencia.

Tabla 4. Interpretación de los resultados de la tira ATB STREP 5 (Biomereux).

Para los antibióticos estudiados a dos concentraciones:					
Aspecto de las cúpulas		Resultados		La cepa es:	
C	C	C	C		
Claro	Claro	-	-	S	Sensible
Turbio	Claro	+	-	I	Intermedia
Turbio	Turbio	+	+	R	Resistente
Para los antibióticos estudiados a una sola concentración:					
Aspecto de la cúpula		Resultado		La cepa es:	
Claro		-		S	Sensible
Turbio		+		R	Resistente

7.6 Identificación molecular

La cepa P46 fue identificada como *Lactobacillus plantarum* (Gutiérrez, 2015), para asegurar la identidad de esta cepa se realizó la secuenciación del operón ribosomal puesto que se ha reportado casos de identificaciones erróneas entre el género *Pediococcus* y *Lactobacillus*, por lo que es preciso aseverar la identidad de una cepa con potencial probiótico (FAO/OMS, 2002).

La identificación se realizó mediante la secuenciación del operón ribosomal de la cepa ya que es una estructura clave de genes para la síntesis de proteínas, relacionado con la fisiología del crecimiento bacteriano y a su vez, es una herramienta que ayuda a definir a una especie (Valdivia-Anistro *et al.*, 2016).

7.6.1 Extracción de ADN cromosomal

Se realizó la extracción de ADN de la cepa *Lactobacillus plantarum* P46 a partir de un cultivo puro obtenido mediante las condiciones de incubación descritas en el inciso 7.2, se efectuó una suspensión saturada de cultivo y con el kit Ultraclean Microbial DNA Isolation (MOBIO Laboratories, Inc.), partiendo de una muestra de 3.6 mL, acorde con las indicaciones del proveedor se obtuvo el ADN cromosomal (metodología detallada en Anexo II). El producto de la extracción se conservó a -20°C para usos posteriores.

7.6.2 Electroforesis en gel de agarosa

Para corroborar la extracción exitosa del material genético y la amplificación de los productos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con buffer de Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, pH 8 y bromuro de etidio al 0.04%, las muestras (5 µL) se cargaron con 3 µL de colorante (azul de bromofenol) para este fin, al mismo tiempo, se colocó un marcador de peso molecular O´geneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas). Se empleó un amperaje a 80 A y un voltaje constante de 100 V. Los geles obtenidos se observaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador UVP (AnalytikJena).

7.6.3 Amplificación del ADN por PCR

El ADN extraído fue empleado como templado para su amplificación mediante PCR, utilizando los primers descritos en la Tabla 5. Los cebadores fueron sintetizados para el Género *Lactobacillus*, a partir de una secuencia guía de los genes ribosomales 16S, 23S y 5S, el operón ribosomal fue dividido en fragmentos de 900-1500 pb, por lo que se realizaron cuatro amplificaciones.

Tabla 5. Primers empleados en la amplificación del operón ribosomal de *Lactobacillus plantarum* P46.

Clave	Primer (5'→3')	A ₍₂₆₀₎	C+G %	Región 5'→3'	Tamaño de producto
Fw1	TGA GAG TTT GAT CCT GGC TCA	56.77	47.62	1-950	950
Rv1	CGG CTG GTT CCT AAA AGG TTA	56.23	47.62		
Fw2	AAA GCC ATT CTC AGT TCG GA	56.78	45.00	850-2010	1160
Rv2	CAC ATC CTT TTC CAC TTA GCA	57.76	42.86		
Fw3	TCG GAA TTA GGA TCA TGG AGG	38.50	47.62	1950-3230	1280
Rv3	TGT CTG TCT CGC AGT CAA GCT	73.01	52.38		
Fw4	ACT ACC CTC GCT GTA TGA CCA	52.68	52.38	3300-4832	1532
Rv4	TCG AAC CGT CGA CT CTT GA	58.27	50.00		

La mezcla de reacción preparada fue específica para cada par de primer en función de su concentración (metodología descrita en el Anexo II), las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador My Cyclor (Bio-Rad) bajo las condiciones descritas en la Tabla 6, se empleó la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Thermo-Scientific).

Tabla 6. Condiciones para la reacción de amplificación en el termociclador MyCicler (Bio-Rad).

Paso	Temperatura (°C) y tiempo (min)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C por 5 minutos	1
Amplificación	Desnaturalización 95°C por 1 minuto	30
	Alineamiento 58.7°C por un minuto	
	Extensión 72°C por 1.5 minutos	
Extensión final	72°C por 5 minutos	1

Los productos de las reacciones se observaron en un gel de agarosa al 1%. para asegurar la correcta amplificación de los fragmentos. Confirmada la amplificación, se purificaron los productos de PCR con el kit Pure link PCR purification (Invitrogen) acorde con las indicaciones del proveedor (metodología descrita en el anexo II), la pureza de los productos se verificó mediante electroforesis (inciso 7.6.2).

7.6.4 Secuenciación de productos de PCR

Una vez purificados los fragmentos obtenidos, se midió su concentración en el equipo NanoDrop (Thermo Scientific) y estos se llevaron a secuenciar a la unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología UNAM, mediante el método de Sanger usando didesoxiterminadores fluorescentes y un secuenciador automatizado de DNA. Las reacciones de amplificación se prepararon en microtubos de 200 µL, con 10-12 µL (dependiendo del amplicon), 1 µL del primer correspondiente y finalmente aforando a un volumen de 16 µL con agua grado BM.

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas para corroborar la calidad de estas y ensambladas posteriormente para obtener la secuencia consenso (programas empleados: Finch TV, DNA Baser Assembler y Bioedit). El ensamble final de la secuencia fue manual con base a la secuencia del operón ribosomal de *L. plantarum* cepa b-2 (CP027349.1), obtenida del banco de datos del NCBI (Figura 6), la cual fue tomada como guía, posteriormente se realizó un alineamiento en el programa Clustal W entre la secuencia de referencia y la secuencia consenso, la cual se comparó en la base de datos del GenBank (programa BLAST) para corroborar la identidad de la cepa.

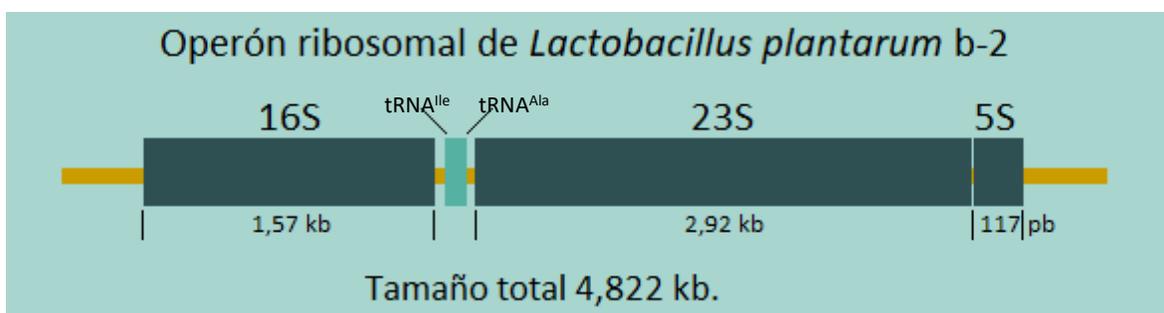


Figura 6. Organización del operón ribosomal de *L. plantarum* b-2.

7.6.5 Elaboración de un árbol filogenético

Para corroborar la identidad molecular de la cepa P46, se construyó un árbol filogenético utilizando el programa MEGA 7, en donde se tomaron como referencia varias secuencias de *L. plantarum* y se tomó como grupos externos a *Z. mobilis* (KC243981.1), *E. coli* (KJ660337.1) y *Sulfolobus acidocaldarius* (NR_043400.1), las secuencias se obtuvieron de la base de datos de la NCBI. El alineamiento se realizó con el programa Clustal W y para calcular la matriz de distancia el modelo Jukes & Cantor, con el método Neighbor-Joining y se ejecutó un Bootstrap de 1000 réplicas.

7.7 Evaluación cualitativa de resistencia a medio ácido pH 3.5 y sales biliares

Se ajustó el pH de caldo APT o MRS a 3.5 con ácido clorhídrico 1N, corroborando con potenciómetro Ion 510 (OAKTON), del mismo modo se preparó caldo APT con 0.3% de sales biliares a partir de bilis de buey (OXOID).

Se realizó la reactivación de *L. plantarum* P46, *L. brevis* P47 y *L. casei* Shirota (inciso 7.2), de las cuales se tomaron 500 µL de cultivo de 24 horas de crecimiento, incubado a 37°/24 h, con el cual se inoculó en 4.5 mL de medio de estrés, siendo este caldo MRS con pH 3.5, y los sobrevivientes a esta primera prueba, se reinocularon en 4.5 mL de caldo MRS con sales biliares al 0.3%.

Además, se realizó el ensayo con ambas condiciones, es decir, se ajustó el pH de caldo APT a 3.5 con la presencia de sales biliares al 0.3%. Se observó el desarrollo mediante turbidez y su crecimiento posterior en agar MRS, inoculando 0.1 mL por extensión superficial, por duplicado.

7.8 Evaluación cuantitativa de resistencia a medio ácido pH 3.5 y sales biliares

Para las cepas P46, P47 y *L. casei* Shirota desarrolladas en 4.5 mL de caldo MRS o APT (inciso 7.2), se ajustó la concentración a una D.O._{600 nm} 0.2, (metodología detallada en el Anexo I) y se inoculó en caldo MRS con pH 3.5, del cual se monitoreó a 4 y 24 horas de incubación a 37°C.

Del cultivo previo se tomó como inóculo inicial a los sobrevivientes de esta primer prueba para re-inocular en 4.5 mL de caldo MRS con sales biliares 0.3%, además de realizar ensayos con ambas condiciones de estrés a la par, todos los caldos fueron elaborados como se describió en el inciso 7.7, incubando en las condiciones descritas, dichos ensayos realizados por duplicado, se monitoreó la sobrevivencia de las cepas mediante cuenta en placa por extensión superficial en placas de agar MRS o APT realizando diluciones decimales seriadas (acorde a la metodología del 7.4).

7.9 Ensayos de actividad antimicrobiana

Se reactivó a las cepas P46, P47 y *L. casei* Shirota (inciso 7.2) y se ajustó su concentración a una D.O._{600 nm} igual a 0.2 (Anexo I). Se inoculó en cajas de agar APT (Difco) por cuadruplicado 3 µL de cultivo de las bacterias lácticas, se incubó a 37°C durante 24h en condiciones reducidas de oxígeno.

A la par se realizó la reactivación de los patógenos de ensayo (microorganismos mencionados en el inciso 7.3), los cuales fueron reactivados en caldo BHI o Luria acorde a la Tabla 3 y se incubaron a 37°C/24h en atmosfera reducida en oxígeno.

Tras el desarrollo de las bacterias ácido-lácticas, se realizó la estandarización de inóculos a D.O._{600 nm} 0.2 de los patógenos en 9 mL de agar suave BHI o Luria fundido (0.5% agar) tras ser homogeneizado en vortex durante 15 segundos, se procedió a verter sobre la caja de agar APT con el crecimiento previo de la BAL de ensayo (descrito con anterioridad), una vez solidificada la capa, se incubaron las cajas a 37°C/24h. Los resultados se obtuvieron mediante la medición de los halos de inhibición generados.

7.10 Ensayos de inhibición competitiva entre cepas aisladas del pulque

Se realizaron ensayos de antibiosis entre las cepas aisladas del pulque *L. plantarum* P46, *L. brevis* P47 y *L. mesenteroides* P45, las cuales fueron reactivadas en caldo APT (inciso 7.2) después se inoculó a las BAL en agar APT por cuadruplicado con 3 µL de cultivo estandarizado a D.O._{600 nm} 0.2 y se incubaron a 37 °C/24h en condiciones reducidas de oxígeno las cepas P46 y P47, la cepa P45 se incubó a 28°C/24h (como se indica en la Figura 7).

Con las cepas nuevamente a concentración estandarizada a 0.2 D.O._{600 nm} en 9 mL de agar suave (0.5%) APT fundido, se colocó como sobrecapa de los cultivos realizados en el párrafo anterior, incubado a 37°C o 28°C durante 24 h acorde a las condiciones del inciso 7.2.

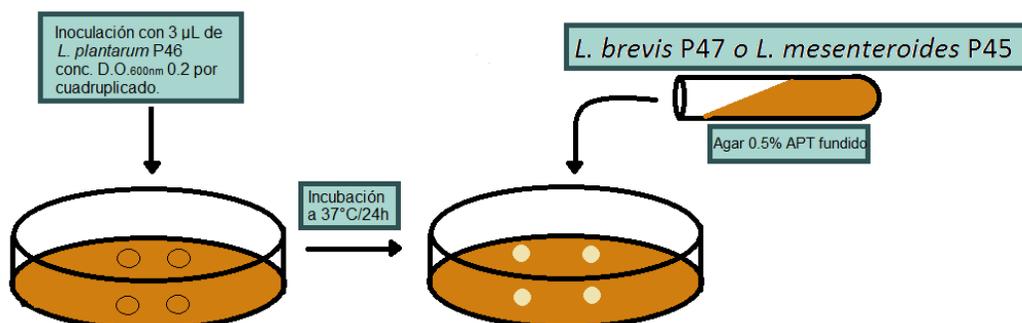


Figura 7. Metodología empleada en los ensayos de inhibición competitiva entre las cepas aisladas del pulque.

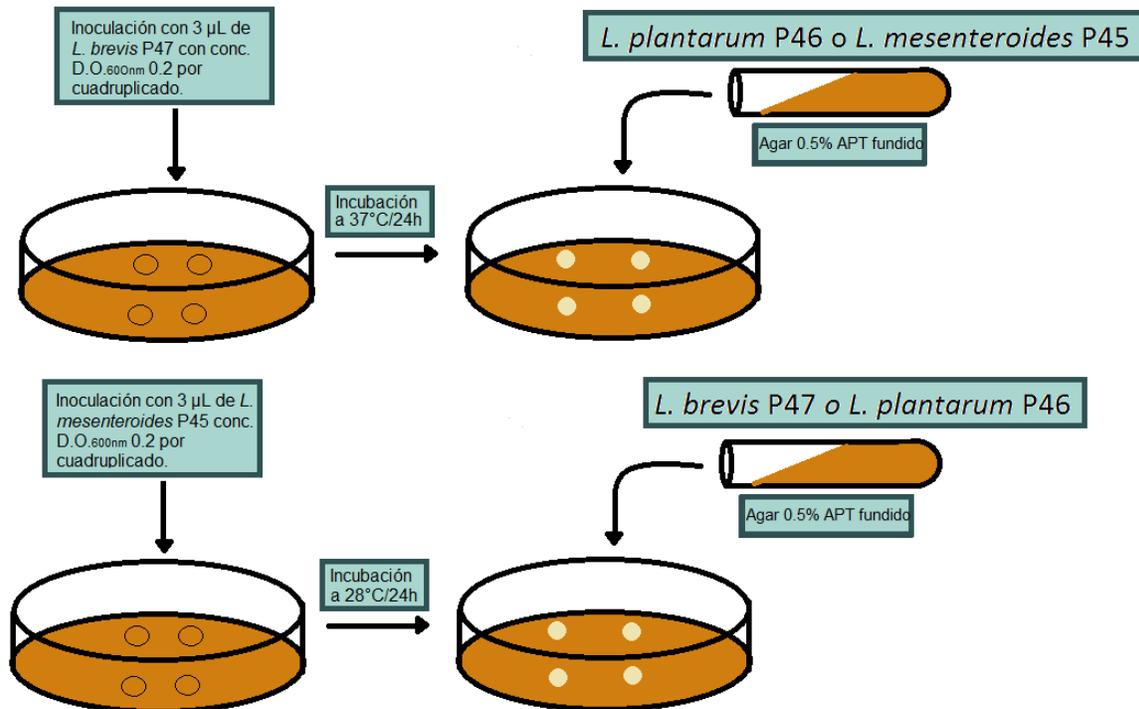


Figura 7. Metodología empleada en los ensayos de inhibición competitiva entre las cepas aisladas del pulque (Continuación).

7.11 Obtención de la curva de crecimiento de *L. plantarum* P46

Con la finalidad de relacionar la densidad óptica observada a 600 nm de los cultivos de *Lactobacillus plantarum* P46 y la cuenta en placa de esta se realizó su curva de crecimiento y relacionar el tiempo de incubación con el nivel de desarrollo a esperar.

La cepa *Lactobacillus plantarum* P46 se reactivó en caldo APT a 37°C/24 h en atmosfera reducida en oxígeno. Del cultivo anterior, se inoculó 1 mL en 25 mL de caldo APT en matraces y se incubó a 37°C en microaerofilia (inciso 7.2), esto se realizó por triplicado.

Se monitoreó su desarrollo cada dos horas mediante la medición de D.O. a 600 nm y a la par se realizó cuenta en placa mediante diluciones seriadas en 9 mL de Solución salina (0.9%) como se indica en el 7.4 e inoculando 0.1 mL por extensión superficial. Dicho ensayo se realizó durante 12 horas consecutivas y una última medición a las 24 horas de crecimiento.

7.12 Ensayos con extracto crudo de *L. plantarum* P46

Para esclarecer la ubicación de los posibles metabolitos asociados a la actividad antimicrobiana adscrita a *L. plantarum* P46 se determinó la presencia o ausencia de agentes antimicrobianos dentro de los sobrenadantes de cultivos de esta BAL.

Se prepararon cajas Petri con doble capa de agar APT de diferente concentración entre las capas, siendo la primera de 3% y la segunda de 1.5% (Matus, 2011), a las cuales se les realizó 4 pozos de 0.5 cm de diámetro por caja con una pipeta Pasteur estéril. A partir de cultivos de 24 h de crecimiento de la cepa P46 (reactivada como indica el 7.2), se centrifugó 1 mL en microtubos a 5000 rpm durante 15 minutos en microcentrifuga 5415C (Eppendorf), se separó el sobrenadante y se descartaron las células.

Se colocó 100 µL de extracto crudo en cada uno de los pozos antes realizados y se añadió una sobrecapa de 9 mL de agar suave BHI (0.5%) para *L. monocytogenes* CFQ-B-103, *S. aureus* ATCC6538 y *S. pyogenes* CQF-B-218; agar suave Luria (0.5%) para *S. enterica* Typhimurium ATCC14028, en una concentración de 0.2 D.O._{600 nm}, previamente homogeneizado y se incubó a 37°C/24 h.

Como control se empleó caldo APT siguiendo la metodología descrita en el párrafo anterior en lugar del sobrenadante de la bacteria. Se midió el halo de inhibición generado en cada caja con sus réplicas para indicar la posible presencia de antimicrobianos producidos por la cepa P46.

7.13 Ensayos con extracto crudo concentrado de *L. plantarum* P46

Para aumentar la concentración de los posibles componentes presentes en la cepa P46 el extracto crudo, se concentró 1.5 veces. Se reactivó a *Lactobacillus plantarum*, siguiendo la metodología descrita en el inciso 7.2 y a partir de un cultivo puro de 24 h de incubación a 37°C en atmósfera reducida en oxígeno.

Se centrifugó 1 mL en microtubos a 5000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se colocó 1.5 mL del extracto crudo en microtubos de 2 mL de capacidad, los cuales se concentraron 1.5 veces en un Concentrator

5310 (Eppendorf). A partir del extracto crudo concentrado se colocó 100 µL en cada uno de los pozos previamente realizados como en el inciso 7.11 y se añadió una sobrecapa de 9 mL de agar suave (0.5%) BHI o Luria con el patógeno correspondiente en una concentración de 0.2 D.O._{600 nm}, e incubando a 37°C/24h (como se indica en el Anexo I).

Como control, se utilizó caldo APT concentrado 1.5 veces, colocando 100 µL en cada pozo y su respectiva sobrecapa de agar suave inoculado con el patógeno con concentración estandarizada, como se describe previamente. Los resultados se obtuvieron mediante la medición de los halos de inhibición generados.

7.14 Evaluación *in vivo* de *L. plantarum* P46 en ratones Balb/c

A partir de los resultados *in vitro* obtenidos por *L. plantarum* P46 se decidió evaluar el efecto antimicrobiano frente a *S. enterica* serovar Typhimurium STR^r en un ensayo *in vivo*, en ratones Balb/c en donde se tomó como referencias a *Leuconostoc mesenteroides* P45 y *Lactobacillus casei* Shirota como probióticos confirmados.

El protocolo experimental seguido se presenta en la Figura 8, dicho procedimiento fue realizado por duplicado con la finalidad de asegurar la reproducibilidad de los datos obtenidos.

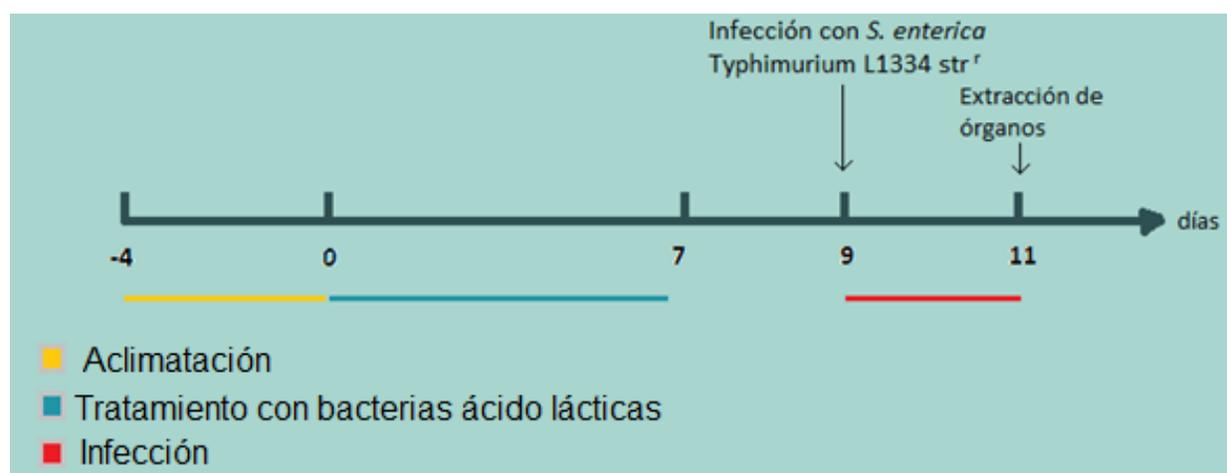


Figura 8. Protocolo experimental seguido para las pruebas en ratones Balb/c machos de 8-9 semanas con las cepas ácido-lácticas.

7.14.1 Modelo animal

El modelo animal empleado fueron 39 ratones *Mus musculus* cepa Balb/c, machos de 8-9 semanas, el ensayo fue realizado por duplicado empleando 4 lotes (tres grupos experimentales y uno de control) de 5 ratones para el análisis de cada bacteria (*L. plantarum* P46, *Leuconostoc mesenteroides* P45 y *L. casei* Shirota) además de un grupo control tratados con buffer salino de fosfatos (PBS, NaCl 0.8%, K₂HPO₄ 0.121%, KH₂PO₄ 0.034%, pH 7.4).

Se consideró un lapso de 4 días para la adaptación de los animales al bioterio del Departamento de medicina experimental (UNAM) en el Hospital General de México, durante este periodo no se realizó ningún tipo de procedimiento.

7.14.2 Preparación de dosis

A partir de cultivos de 24 h de *L. plantarum* P46 y *L. casei* Shirota incubados a 37°C en microaerofilia y un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* P45 incubado a 28°C/24 h se realizó la centrifugación de 1 mL de cada uno, a 14000 rpm en microcentrífuga durante 20 minutos.

El pellet obtenido se enjuagó con buffer de carbonatos pH 7 dos veces, posteriormente se aforaron a 1 mL con PBS, del cual se ajustó su concentración a 2x10⁹ UFC/mL en un volumen de 300 µL de PBS.

Para trabajar con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium STR^r, se incubó a 35°C durante 12 h con agitación, de dicho cultivo se tomó una muestra de 20 µL y se inoculó en 50 mL de caldo luria con 100 µg/mL de estreptomina (Sigma-Aldrich), se monitoreó su crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica de 1 a 600 nm, lo cual correspondió a una concentración de 1x10⁹ UFC/mL, la preparación de la bacteria siguió la metodología descrita en el párrafo anterior, para la obtención de las células únicamente, pero el ajuste de concentración fue a 1x10⁷ UFC/mL en un volumen de 300 µL, ya que se requiere de 10⁶-10⁸ bacterias para generar la enfermedad sintomática (Robledo, 2015).

7.14.3 Periodo y método de administración

El ensayo fue realizado en el Bioterio del Departamento de Medicina Experimental (UNAM), en donde los ratones se mantuvieron en condiciones controladas durante todo el experimento.

El esquema de administración fue dividido en dos etapas, la primera consistió en la administración diaria a cada ratón, durante 7 días con las bacterias ácido- lácticas, el grupo control recibió PBS, todos fueron administrados mediante el uso de sonda esofagástrica para asegurar la ingesta total del volumen administrado.

La segunda etapa se realizó al final del tratamiento con las BAL, se dejó un día sin administración y al siguiente se infectaron todos los ratones con *S. enterica* serovar Typhimurium STR^r a 1×10^7 UFC/mL mediante sonda esofagástrica para asegurar la llegada al estómago del total de la dosis empleada de cada microorganismo (Figura 9), durante todo el estudio, los animales tuvieron libre acceso a una dieta convencional balanceada y agua.



Figura 9. Administración de las bacterias de ensayo mediante sonda esofagástrica.

7.14. 4 Recolección de órganos

Tras 48 h de infección se realizó el sacrificio de los ratones mediante dislocación cervical, se extrajeron hígado y bazo en condiciones estériles, los órganos fueron pesados y conservados en tubos Falcon de 50 y 15 mL con PBS (10 y 1 mL respectivamente), en hielo, previo a ensayos posteriores.

7.14.5 Cuantificación de *S. enterica* serovar Typhimurium STR^r viable en órganos de ratón Balb/c.

Se realizó la ruptura de los órganos extraídos en fragmentos de aproximadamente 5 mm de grosor con tijeras estériles, tras lo cual fueron homogeneizados con perlas de vidrio estériles en vortex (en PBS como se indica en el inciso 7.14.4).

De la suspensión anterior se realizaron diluciones decimales seriadas en 900 µL de PBS, efectuando la cuenta en placa, inoculando 0.1 mL por extensión superficial en agar LB con 100 µg/mL de estreptomicina, para conocer la sobrevivencia del patógeno después de incubar a 35°C 24 h, se realizó la cuenta en placa y el ensayo se realizó por duplicado.

8. Resultados y Discusión

8.1 Reactivación y comprobación de pureza de las cepas *L. plantarum* P46 y *L. brevis* P47.

Se logró la recuperación de las cepas *L. plantarum* P46 y *L. brevis* P47, en caldo MRS a 37°C/24h para comprobar su viabilidad tras el almacenamiento y generar nuevas fuentes de obtención de los microorganismos de estudio.

Se observaron en agar MRS ambos casos con colonias blancas puntiformes, bordes enteros y elevación convexa en ambas cepas, las colonias de *L. brevis* P47 presentaron un diámetro inferior a 2 mm, lo cual coincide con lo indicado en la literatura sobre las características mofo-coloniales de las especies del género *Lactobacillus* (Forouhandeh *et al.*, 2010; Menconi *et al.*, 2014).

En la Figura 10, se presentan las observaciones al microscopio de la tinción Gram (aumento 1000x) de ambos microorganismos, los cuales son Gram-positivos, sin embargo, *L. brevis* P47 es considerablemente más pequeño respecto a *L. plantarum* P46 al observarse como bacilos cortos de extremos redondos, mientras que la cepa P46 se presenta como cadenas cortas de dos bacilos de extremos redondos lo cual coincide con la literatura en donde se describe a *L. brevis* como un bacilo de longitud corta y llega a presentar distintas longitudes en función del medio y condiciones de cultivo (De Vos *et al.*, 2009; Salvetti *et al.*, 2012), y a *L. plantarum* como bacilos de mayor grosor de longitud media (Melgar-Lalanne *et al.*, 2012).

Dentro de las características del género *Lactobacillus* se encuentra la carencia de la enzima catalasa, ya que, al ser microorganismos aerotolerantes, no hay producción de peróxido de hidrógeno en el medio al ser este uno de los productos finales del metabolismo aeróbico (Madigan *et al.*, 2015), lo cual se corroboró con las cepas de ensayo las cuales fueron catalasa-negativas.

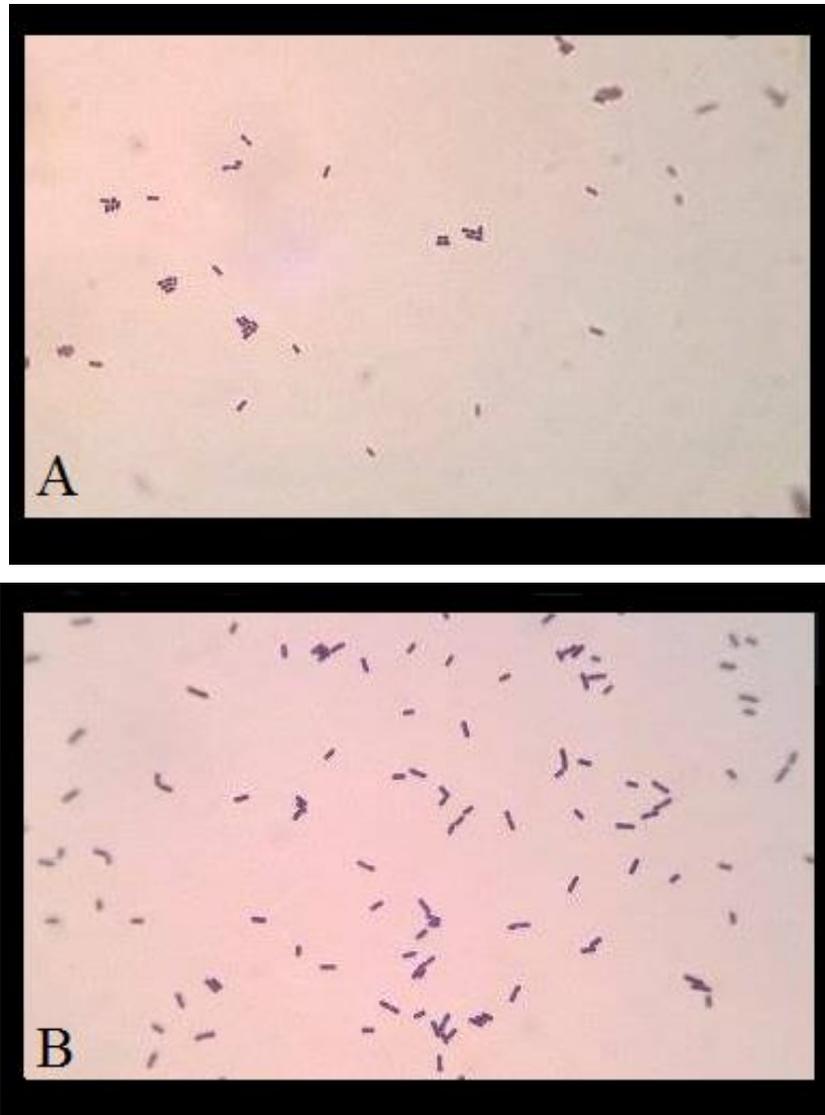


Figura 10. Tinción Gram de *L. plantarum* P46 y *L. brevis* P47 incubados a 37 °C/24 horas en condiciones de microaerofilia. Aumento total 1000x A) *Lactobacillus brevis* P47; B) *Lactobacillus plantarum* P46.

8.2 Evaluación del desarrollo de *L. plantarum* P46 y *L. brevis* P47 a la temperatura del cuerpo humano

Puesto que, ambas cepas fueron aisladas del pulque, cuya fermentación es a temperatura ambiente (<28 °C) se evaluó el adecuado desarrollo de las cepas P46 y P47 en condiciones similares a la temperatura del cuerpo humano (37°C) para corroborar de manera *in vitro* su a desarrollo dentro de él.

En la Tabla 7 se presentan los resultados de la cuantificación del crecimiento de *L. brevis* P47 y *L. plantarum* P46, en dos condiciones de temperatura diferentes, siendo estas a 28°C y 37°C.

Tabla 7. Cuantificación de crecimiento de *L. brevis* P47 y *L. plantarum* P46 en caldo ATP a 28 °C y 37 °C durante 24 horas.

Microorganismo	UFC/mL a 28°C	UFC/mL a 37°C
<i>L. plantarum</i> P46	22 x10 ⁹ ± 0.046	38 x10 ⁹ ± 0.037
<i>L. brevis</i> P47	20 x10 ⁹ ± 0.051	24 x10 ⁹ ± 0.024

La cepa P47 presentó un crecimiento similar en ambas condiciones de temperatura, siendo del orden de 10⁹ UFC/mL por lo que esta cepa puede desarrollarse de manera adecuada en ambas condiciones. *L. plantarum* P46 al igual que la cepa anterior se desarrolló en el orden de 10⁹ UFC/mL, pero presentó un crecimiento ligeramente mayor a la temperatura de 37°C, por lo que ambas cepas son capaces de desarrollarse en condiciones similares a la temperatura del cuerpo humano. Las especies del género *Lactobacillus* pueden desarrollarse en temperaturas que oscilan entre 10°C y 40°C (Olivera, 2011; Estela-Escalante *et al.*, 2015).

8.3 Sensibilidad a antibióticos

Dentro de las consideraciones relativas a la inocuidad de los probióticos estos no deben presentar resistencia a antibióticos, no obstante, como cualquier bacteria, existen ácido-lácticas que presentan resistencia a antibióticos, por lo que lo que es importante el conocer el perfil de antibióticos a los que se es resistente o sensible por parte de las cepas de estudio.

Mediante el uso de las tiras ATB STREP 5 (Biomereux) se evaluó el perfil de sensibilidad a antibióticos por parte de las cepas, las cepas de lactobacilos P46, P47, *L. casei* Shirota y *Leuconostoc mesenteroides* P45 siendo esta última una cepa aislada del pulque cuya capacidad probiótica ya ha sido comprobada, este sistema

está diseñado para realizar un antibiograma para estreptococos y pneumococos, sin embargo, al ser estos, microorganismos Gram positivos se optó por usar este sistema para bacterias ácido-lácticas (en el Anexo V se presentan los resultados del sistema ATB STREP 5). En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos para todos los antibióticos ensayados.

Tabla 8. Antibiograma de las bacterias ácido-lácticas estudiadas.

Antibiótico	Concentración cC mg/L	<i>L.</i> <i>plantarum</i> P46	<i>L.</i> <i>brevis</i> P47	<i>L.</i> <i>mesenteroides</i> P45	<i>L. casei</i> Shirota
PEP	0.031-0.5	R	R	R	I
PEP	0.063-1	R	R	R	I
PEP	0.125-2	R	R	I	I
PEP	0.25-4	I	R	I	I
PES	0.12-2	I	R	I	I
AMOP	2-4	S	S	I	S
CTXP	0.5-2	R	R	R	R
CTXP	0.25	R	R	R	R
CTXS	0.5-1	R	R	R	R
ERY	0.25	S	S	R	S
QDA	1	S	S	S	S
CLI	0.25	S	S	S	S
TET	2	R	R	S	S
LVX	2-4	I	R	I	R
CMP	4	S	R	R	R
VAN	1	R	R	R	R
TSU	0.5/9.5-2/38	S	S	R	R

C concentración alta **c** concentración baja **R** resistente **I** intermedio **S** sensible

PEP penicilina **AMOP** amoxicilina **CTXP** cefotaxima **ERY** eritromicina **QDA** quinupristina
CLI clindamicina **TET** tetraciclina **LVX** levofloxacin **CMP** cloranfenicol **VAN** vancomicina
TSU cotrimoxazol

Para el cloranfenicol la única cepa que presentó susceptibilidad fue la P46, este antimicrobiano es principalmente empleado para infecciones oculares y antiguamente en infecciones de *Salmonella enterica* Typhi, a pesar de ser un antibiótico de amplio espectro su uso ha sido limitado debido a los efectos nocivos asociados a largo plazo de su uso (Morales *et al.*, 2007).

Todas las bacterias de estudio, presentaron resistencia a cefatoxima, esto se repite para la penicilina con excepción de *L. casei* Shirota y *L. plantarum* P46, los cuales presentaron una susceptibilidad intermedia, sin embargo, ambos antibióticos presentan un mecanismo de acción similar, es decir, actúan inhibiendo enzimas importantes para la síntesis de la pared celular bacteriana. No se han realizado estudios acerca de los posibles mecanismos asociados a la resistencia de estos antibióticos en bacterias ácido-lácticas, sin embargo, en patógenos es debido a la producción de β -lactamasas, disminución de la afinidad del antibiótico por las enzimas de la membrana y la inhibición de la capacidad de penetración de la penicilina a la pared bacteriana (Calvo *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos para vancomicina demostraron la resistencia de todas las cepas analizadas, esto se afirma ya que varias especies de lactobacilos como *L. rhamnosus* y *L. casei* son intrínsecamente resistentes a la vancomicina, ya que estas especies poseen precursores de peptidoglicano con terminación D-lactato, mientras que el precursor objetivo de la vancomicina es con terminación D-alanina (Saarela *et al.*, 2009).

En muchas cepas de *Lactobacillus* empleados como probióticos y algunos *Leuconostoc* se ha identificado la resistencia a este antibiótico, pero no se ha demostrado que este factor pueda ser transmitido a otros grupos microbianos como, por ejemplo, los enterococos (Nannini *et al.*, 2004).

Todas las cepas fueron sensibles a la clindamicina y a los compuestos sinérgicos quinupristina/dalfopristina, de igual modo con la eritromicina, con excepción de *L. mesenteroides* P45, estos antibióticos tienen la particularidad de pertenecer al grupo Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas, que presentan un mecanismo de acción similar, razón por la cual fueron capaces de inhibir a estas bacterias, ya

que intervienen en la síntesis de proteínas, en cepas de *Streptococcus* se han descrito dos mecanismos de resistencia, siendo la modificación de un residuo de adenina del RNAr 23S, lo cual genera un cambio conformacional en el ribosoma, lo que produce una menor afinidad de unión de macrólidos, el otro mecanismo consiste en conferir un fenotipo de resistencia disociado, la resistencia es debida a la eliminación del antibiótico al exterior de la célula (Portillo, *et al.*, 2000; Tamariz *et al.*, 2009), esto puede explicar los resultados obtenidos por la cepa P45, sin embargo, estos mecanismos han sido encontrados en estreptococos, por lo que es necesario realizar otro tipo de estudios para confirmar esta hipótesis.

Los resultados obtenidos para cotrimoxazol y levofloxacin son variados entre las cepas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* analizados, sus mecanismos de acción son la inhibición de la síntesis del ácido fólico y ADN, respectivamente, resultados similares se han encontrado en distintas especies de BAL (Silva, 2008; Melkumyan *et al.*, 2015; Giok, 2016) lo cual indica que la resistencia o sensibilidad a estos antibióticos es específico de la cepa y no del género o especie, no obstante, no se han caracterizado los posibles mecanismos que generen esta resistencia. Las cepas P46 y P47 mostraron resistencia hacia la tetraciclina, mientras que *L. mesenteroides* P45 y *L. casei* Shirota fueron susceptibles, estudios acerca del efecto de la tetraciclina frente a bacterias ácido-lácticas, presentan este tipo de resultados, en donde el efecto inhibitorio o resistente es propio de la cepa y no del género microbiano (Maurad *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2014). Dicha resistencia por parte de algunas cepas del género *Lactobacillus* es debido a que poseen el gen *tet(M)*, el cual codifica a una proteína de protección ribosomal, además de este gen se han identificado otros que codifican a proteínas secretoras o nuevamente, de protección ribosomal (Flores, 2007).

Contrario a la búsqueda de cepas probióticas sin resistencia a antibióticos, existen casos en donde es empleada esta característica como un beneficio, para la manutención de la microbiota intestinal, colón y vaginal durante tratamientos para procesos infecciosos, con la finalidad de disminuir efectos adversos asociados al uso de antibióticos, por otro lado puede ser de utilidad para conocer los efectos

benéficos asociados a microorganismos específicos mediante ensayos suplementados con tetraciclina. Las concentraciones asociadas a la resistencia mostrada por lactobacilos son muy amplias (8-64 µg/mL) por lo que su uso dependerá de la cepa en cuestión (Feichtinger, *et al.*, 2016; Marciano *et al.*, 2017).

Si bien el método empleado para la realización de este antibiograma no es específico para BAL, acorde con los resultados de la literatura (Yuki *et al.*, 1999; Usman *et al.*, 2017) el antibiograma de *L. casei* Shirota presenta el mismo comportamiento que el obtenido en este trabajo, los resultados citados son mediante la Técnica de Bauer, y el método de dilución en placa, obteniendo la concentración mínima inhibitoria para esta bacteria.

En la actualidad, existen pocos estudios asociados a la investigación de los posibles mecanismos de resistencia a probióticos en bacterias provenientes de alimentos no patógenas como lo son las bacterias ácido lácticas, si bien son pocos y muy dispersos los casos asociados a infecciones por lactobacilos, como endocarditis en personas inmunocomprometidas (Cabrera *et al.*, 2010), es importante la implementación de nuevos métodos para el conocimiento del perfil antimicrobiano de cepas aisladas de alimentos, así como el mecanismo asociado a la resistencia de los mismos, si esto es parte de genes transmisibles a otros microorganismos y las implicaciones que esto pueda generar, tomando en cuenta el aumento de la resistencia a antibióticos por parte de microorganismos patógenos asociados a enfermedades gastrointestinales, los lactobacilos pueden ser una nueva barrera de defensa para este tipo de microorganismos, obtenidos a partir de la dieta.

8.4 Identificación molecular

Gutiérrez (2015), identificó a la cepa P46 como *Lactobacillus plantarum*, por lo que se realizó la secuenciación del operón ribosomal completo para asegurar la identidad del microorganismo ya que es preciso aseverar la identidad de una cepa con potencial probiótico (FAO/OMS, 2002) debido a que se ha reportado puesto que se ha reportado casos de identificaciones erróneas entre el género *Pediococcus* y *Lactobacillus*.

8.4.1 Extracción y amplificación de ADN cromosomal por PCR

En la Figura 11 se observa la electroforesis en gel de agarosa al 1% llevada a cabo con la finalidad de corroborar el tamaño del amplicon y la pureza del producto de ADN extraído en donde se observa una banda integra por arriba del marcador de peso más alto, lo cual indica la correcta extracción del material genético ya que el ADN cromosomal del género *Lactobacillus* es de entre 2,200 a 4,500 kb (Kleerebezem *et al.*, 2003).

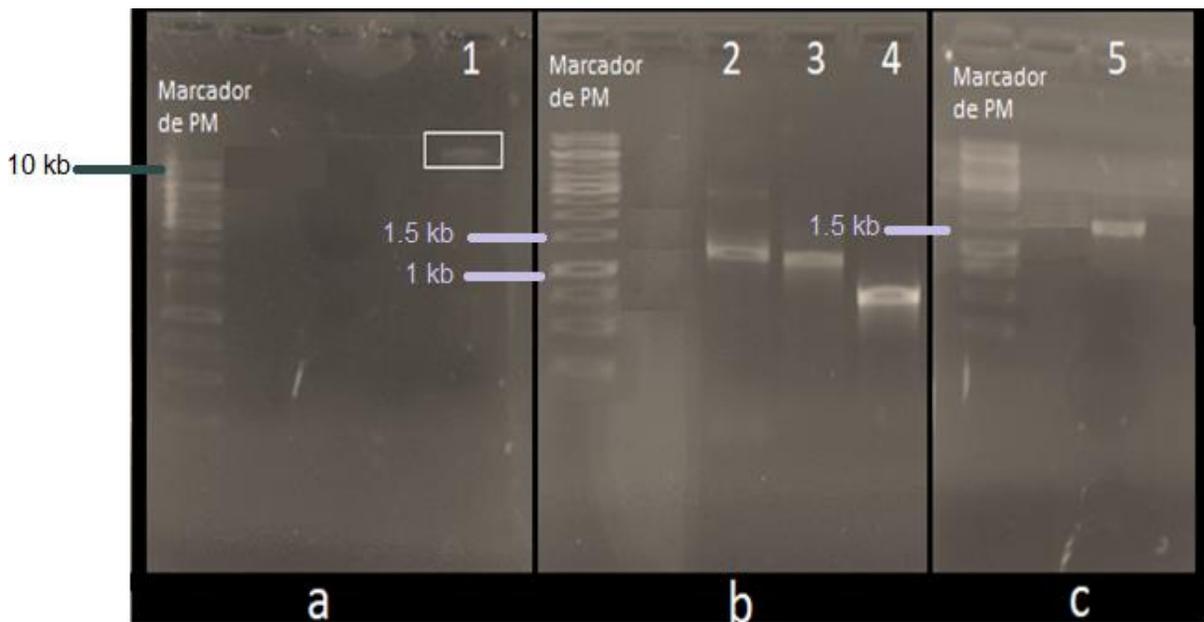


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la extracción de ADN cromosomal de la cepa P46 y sus amplicones. PM marcador de peso molecular. a) carril 1: ADN de la cepa P46, b) 2-4 productos de PCR de los pares de primers 2, 3 y 4, c) 5 producto de PCR del par de primers 1.

Se corroboró la amplificación al igual que la extracción por electroforesis en gel de agarosa, en donde tres de las bandas de los amplicones obtenidos, se encuentran por arriba del marcador de peso molecular de 1 Kb y una banda por debajo de este marcador, el operón ribosomal de *L. plantarum* es de alrededor de 4,5 Kb, por lo que el tamaño de las bandas obtenidas corroboró una correcta amplificación al ser los productos de los pesos esperados (inciso 7.6.3).

De acuerdo con la unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del IBT (UNAM) la concentración mínima requerida para la secuenciación de un producto de PCR es de 6.75-7.5 ng/μL por lo que se determinó la concentración de los productos obtenidos (Tabla 9), en donde se observó que todos los amplicones presentaron la concentración suficiente para su secuenciación, lo cual permitió obtener resultados adecuados.

Tabla 9. Concentración de DNA de los productos de PCR.

Fragmento	Concentración (ng/μL)	Relación A_{260nm/280nm}
F1	27.5	1.89
F2	28.6	1,95
F3	50.2	1.91
F4	37.4	2.04

La relación 260/280 nm es empleada para evaluar la pureza de las muestras en donde valores de entre 1.6-1.8 indican un DNA de pureza aceptable, mientras que resultados superiores a 1.8 señalan un DNA de pureza óptima (Díaz-Alonso *et al.*, 2013).

8.4.2 Secuenciación del operón ribosomal.

Los estudios metagenómicos con técnicas de secuenciación han permitido estudiar la diversidad de microorganismos en una amplia variedad de ambientes, sin embargo, presentan el gran reto de identificar las regiones mínimas que permitan distinguir entre bacterias, por ello la secuenciación del operón ribosomal de la cepa P46, permite confirmar o refutar la identidad antes dada a esta cepa. La secuencia consenso se comparó en la base de datos del GeneBank, mediante el programa BLAST, en donde el porcentaje de identidad obtenido fue del 99% con varias cepas de *Lactobacillus plantarum* de la base de datos (En el Anexo III, se presenta el alineamiento).

En el alineamiento de las secuencias se observó la existencia de una inserción de 26 pb (1554-1579), dos deleciones, una de 84 pb (2658-2742) y otra de 8 pb (2877-2885), así como dos regiones variables de 22 pb (1580-1601) y de 57 pb (2819-2876), dichas diferencias indican que es probable que esta cepa pertenezca a otra subespecie.

En la Tabla 10 se presentan los resultados de la identificación, así como el porcentaje de identidad obtenido y el número de acceso (Genbank) de las secuencias empleadas para la elaboración del árbol filogenético, de la Figura 12.

Tabla 10. Identidad de la cepa P46 con base en el análisis de secuencias (BLAST).

Cepa	Identidad (%)	Valor de expectancia	de QC (%)	No. Acceso
<i>L. plantarum</i> ATG-K2	99	0.0	100	CP032460.1
<i>L. plantarum</i> DSM 16365	99	0.0	100	CP032751.1
<i>L. plantarum</i> ZFM55	99	0.0	100	CP032359.1
<i>L. plantarum</i> WLPL04	99	0.0	100	CP023771.1
<i>L. plantarum</i> ZFM9	99	0.0	100	CP032642.1
<i>L. plantarum</i> ATG-K6	99	0.0	100	CP032464.1
<i>L. plantarum</i> ATG-K8	99	0.0	100	CP032466.1
<i>L. plantarum</i> E1	99	0.0	100	CP031771.1
<i>L. plantarum</i> LQ80	99	0.0	100	CP028977.1
<i>L. plantarum</i> IDCC3501	99	0.0	100	CP031702.1
<i>L. plantarum</i> b-2	99	0.0	100	CP027349.1
<i>L. plantarum</i> ZFM4	99	0.0	100	CP032648.1
<i>L. plantarum</i> SN35N	99	0.0	100	AP018405.1
<i>L. plantarum</i> SK151	99	0.0	100	CP030105.1
<i>L. plantarum</i> HAC01	99	0.0	100	CP029349.1
<i>L. plantarum</i> DSM 10667	98	0.0	100	CP032744.1
<i>L. plantarum</i> ZFM9	97	0.0	100	CP032642.1

Se realizó un árbol filogenético, (Figura 12), tomando como referencia diversas secuencias de cepas de *Lactobacillus plantarum*, obtenidas de la base de datos del NCBI. La agrupación observada en el árbol, debido a la posición de la cepa P46 respecto a las secuencias utilizadas como grupos externos, permite confirmar la identificación de la cepa P46, así mismo el valor del Bootstrap de 90 otorgó robustez al análisis.

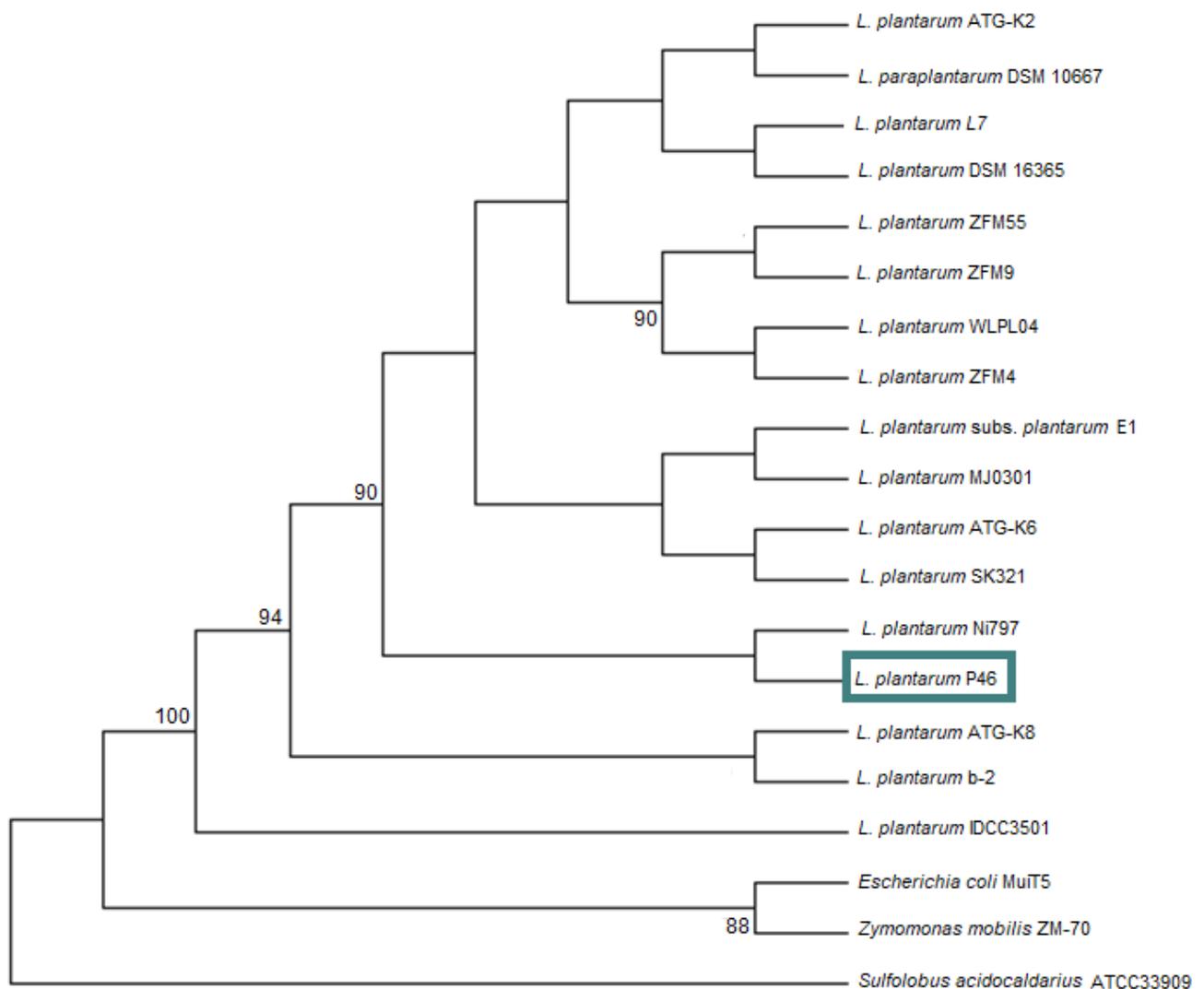


Figura 12. Árbol filogenético elaborado a partir de la secuenciación del operón ribosomal de la cepa P46 por Neighbor-Joining, las secuencias de referencia *Escherichia coli* MuiT5 (KJ660337.1), *Zymomonas mobilis* ZM-70(KC243981.1) y *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 (NR_043400.1).

8.5 Evaluación cualitativa de resistencia a medio ácido pH 3.5 y sales biliares

Estudios previos reportan una alta resistencia por parte de los microorganismos de estudio a condiciones gastrointestinales *in vitro*, en presencia de sales biliares y pH 3.5 a la par, incubados a 37°C/24h (Gutiérrez, 2015), por lo que se realizó dicho ensayo para confirmar estas características en las cepas a pesar del periodo de conservación en el que se sometieron. Adicionalmente, se realizó el ensayo con las condiciones de estrés por separado y su contraste respecto a *L. casei* Shirota, como control positivo probiótico.

Las condiciones establecidas se encuentran acorde a las presentes en el tracto gastrointestinal, el pH en el estómago se encuentra entre 2.5-3.5 y la concentración de sales biliares en el intestino es aproximadamente 0.3% (Cástulo *et al.*, 2008). En la Tabla 11, se presentan los resultados de intensidad de desarrollo por turbidez y verificando la viabilidad de las células mediante su desarrollo en agar MRS, posterior al tiempo de incubación en los medios de estrés.

Tabla 11. Resultados cualitativos de resistencia a condiciones gastrointestinales *in vitro* de *L. plantarum* P46, *L. brevis* P47 y *L. casei* Shirota.

Microorganismo	Resistencia a medio de estrés			
	pH 3.5	Sales biliares 0.3%	pH 3.5 y sales biliares 0.3%	pH 3.5 y sales biliares 0.3% (Gutiérrez, 2015)
<i>L. brevis</i> P47	++++	++++	++++	+++
<i>L. plantarum</i> P46	++++	++	+++	+++
<i>L. casei</i> Shirota	++++	++++	++	NR

desarrollo abundante (++++), desarrollo medio (+++), desarrollo bajo (++) y desarrollo escaso o nulo (+), **NR**: no realizado.

Gutiérrez (2015), reportó un desarrollo abundante, denotado por la presencia de turbidez y posterior crecimiento en agar MRS o APT por parte de ambas cepas de estudio, en los resultados obtenidos en este trabajo, se observó abundante desarrollo por parte de *L. brevis* P47 en las condiciones de estrés por separado, así mismo *L. casei* Shirota presentó un desarrollo similar en estas condiciones.

Por otro lado, *L. plantarum* P46 presentó mayor inhibición frente a las sales biliares en concentración de 0.3%, pero un desarrollo superior al de la cepa *L. casei* Shirota en el ensayo frente a pH 3.5 y sales biliares 0.3% al mismo tiempo, con lo cual se corroboró la capacidad de ambas cepas de sobrevivir a pH 3.5 y sales biliares 0.3% a pesar del periodo prologado de conservación presentado.

Los tiempos de estudio empleados son prolongados, puesto que este tipo de estudios suelen realizarse durante 4 horas aproximadamente, para simular el tiempo en el que se produce la digestión, (Alvarado-Rivas *et al.*, 2009; Argyri *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2013), al haber empleado condiciones extremas y tiempos prolongados en este estudio, aseguró que las cepas evaluadas presentan alta resistencia a las condiciones gastrointestinales.

8.6 Evaluación cuantitativa de resistencia a medio ácido pH 3.5 y sales biliares

Una vez realizados los ensayos cualitativos, se demostró la sobrevivencia de las cepas P46 y P47 de forma cualitativa al pH ácido (3.5) y a la presencia de sales biliares (0.3%), por ello se preparó nuevamente el ensayo de manera más precisa, por lo que se ajustó la concentración del inóculo a D.O._{600nm} 0.2 de cada bacteria ácido-láctica, tomando como control positivo a *L. casei* Shirota como cepa caracterizada como probiótico.

En la Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* realizados por duplicado al enfrentar cada lactobacilo a las condiciones similares al proceso de digestión (pH 3.5 y sales biliares al 0.3%), se monitoreó su sobrevivencia y posible desarrollo a las 4 y 24 horas posteriores a la inoculación, a la par se observó el desarrollo en medio MRS sin factores de estrés de las tres cepas lácticas y la cuenta en placa tras 4 y 24 horas de incubación, como control de desarrollo.

Cabe aclarar que se presentan porcentajes de sobrevivencia superiores al cien por ciento debido a que los microorganismos de estudio no solo fueron capaces de sobrevivir en las condiciones de estudio, sino que también se desarrollaron más que la concentración inicial durante el tiempo de ensayo.

Se encontró que, a 4 horas de incubación en los medios de estrés, *Lactobacillus brevis* P47 fue altamente resistente al mantenerse en una concentración del orden de 10^6 UFC/mL, conservándose el 37.2% de las células inoculadas en medio con pH 3.5 y además de sobrevivir, fue capaz de desarrollarse en presencia de sales biliares 0.3% a 12×10^7 UFC/mL, además de los ensayos individuales de las condiciones de estrés, se realizaron ensayos con ambos factores gastrointestinales a la par (pH y sales biliares 0.3%), los cuales se han encontrado con regularidad en la literatura con el fin de demostrar la capacidad probiótica de diferentes microorganismos (Rubio *et al.*, 2008; Ryu *et al.*, 2013), en el cual la cepa P47 sobrevivió y creció a 36×10^7 UFC/mL, siendo este desarrollo dos órdenes de magnitud superior al mostrado por parte de *L. casei* Shirota.

En los ensayos realizados con 24 horas de incubación en los medios de estrés *L. brevis* P47 sobrevivió y se desarrolló en presencia de sales biliares 0.3% y pH 3.5, con una concentración de 36×10^7 UFC/mL en el reto con ambas condiciones de estrés al mismo tiempo, mientras que *Lactobacillus casei* Shirota se encontró a 52×10^4 UFC/mL presentando un desarrollo de tres órdenes de magnitud mayor al de la cepa control. Los resultados presentados indican que *L. brevis* P47 fue inhibido inicialmente por las condiciones de pH ácido, no obstante, es capaz de crecer en tiempo posterior, lo que señala una adaptación a las condiciones de estrés de este ensayo.

Tabla 12. Resultados del monitoreo a las 4 y 24 horas de ensayo de las bacterias ácido-lácticas de estudio en el medio de estrés en incubación a 37 °C en condiciones reducidas de oxígeno.

	Microorganismo	<i>L. brevis</i> P47		<i>L. plantarum</i> P46		<i>L. casei</i> Shirota	
		UFC/mL	%S*	UFC/mL	%S*	UFC/mL	%S*
	Conc. inicial D.O. _{600nm} 0.2	78x10 ⁶ ± 0.021		53x10 ⁶ ± 0.022		92 x10 ⁶ ± 0.031	
Monitoreo a 4 horas	Control	46x10 ⁷ ± 0.055		39x10 ⁷ ± 0.018		18 x10 ⁷ ± 0.016	
	pH 3.5	29x10 ⁶ ± 0.021	37.2%	55x10 ⁶ ± 0.027	103.8%	14 x10 ⁷ ± 0.022	152.2%
	Sales biliares 0.3%	12x10 ⁷ ± 0.021	153.8%	89x10 ⁵ ± 0.043	16.8%	81 x10 ⁶ ± 0.036	88%
	pH 3.5 y sales biliares 0.3%	14x10 ⁷ ± 0.100	179.5%	96x10 ⁶ ± 0.019	181.1%	12 x10 ⁵ ± 0.098	1.3%
Monitoreo a 24 horas	Control	21x10 ⁸ ± 0.014		12x10 ⁸ ± 0.094		47x10 ⁸ ± 0.074	
	pH 3.5	66x10 ⁷ ± 0.013	846.1%	21x10 ⁶ ± 0.090	39.6%	32x10 ⁷ ± 0.092	347.8%
	Sales biliares 0.3%	13x10 ⁸ ± 0.070	1666%	33x10 ⁵ ± 0.012	6.22%	12x10 ⁸ ± 0.022	1304%
	pH 3.5 y sales biliares 0.3%	36x10 ⁷ ± 0.012	461.5%	29x10 ³ ± 0.023	0.05%	52x10 ⁴ ± 0.079	0.56%

* %S = porcentaje de sobrevivencia reportado respecto a la concentración inicial D.O._{600nm} 0.2 previo al reto de cada microorganismo de ensayo.

Por otro lado, la cepa P46 sobrevivió a un pH de 3.5 durante 4 horas en el orden de 10^6 UFC/mL, al igual que en el ensayo con sales biliares 0.3% y pH de 3.5 en conjunto durante el mismo tiempo de monitoreo, y presentó una sobrevivencia del 16.8% a sales biliares 0.3% tras 4 horas de incubación, por lo que *Lactobacillus plantarum* P46 fue mayormente inhibido por la presencia de sales biliares a ambos tiempos de monitoreo. En el reto con pH 3.5 y sales biliares 0.3% al mismo tiempo sobrevivió a 29×10^3 UFC/mL después de 24 horas de tratamiento, lo que se observa como 0.05% de sobrevivencia, esto acorde a los resultados previos, es debido a la presencia de sales biliares, esta concentración fue de un orden de magnitud inferior al de *L. casei* Shirota sin embargo, se sabe que algunos microorganismos probióticos son capaces de adaptarse fácilmente a altas concentraciones de ácidos y sales biliares por exposición progresiva a concentraciones subletales de estos compuestos debido a que se provoca la expresión de genes de respuesta adaptativa al estrés, lo cual los hace más resistentes a estas condiciones (Stanton *et al.*, 2005; Margolles *et al.*, 2008).

La diferencia en la resistencia a las sales biliares presentada entre las tres especies de lactobacilos puede ser debida que algunas cepas presentan capacidad hidrolítica sobre las sales biliares como *L. fermentum* KC5b, *L. acidophilus* ATCC 4962 y *L. casei* ATCC 292 (González *et al.*, 2006; Mejía *et al.*, 2007).

No obstante la resistencia observada por las cepas de *Lactobacillus* aislados del pulque coincide con lo reportado en investigaciones previas con microorganismos pertenecientes a este género (Argyri *et al.*, 2013), debido a que se ha demostrado la correlación entre las pruebas *in vitro* de resistencia a retos de pH ácido y sales biliares con la sobrevivencia de las bacterias en el tracto gastrointestinal (Sánchez *et al.*, 2011; Cueto *et al.*, 2012), permite considerar a las cepas P46 y P47 como posibles probióticos y como se mencionó con anterioridad, el realizar ensayos en condiciones extremas permite comprobar la obtención de cepas altamente resistentes.

8.7 Ensayos de antibiosis

Gutiérrez (2015), realizó un ensayo preliminar para determinar la posible actividad antimicrobiana de BAL aisladas del pulque de manera cualitativa frente a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 9992, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *L. monocytogenes* (CFQ), por lo que se realizó un ensayo más preciso mediante la estandarización de la concentración de las cepas P46 y P47 y una mayor variedad de microorganismos como modelo patógeno, siendo 10 bacterias, entre las que se enlistan tanto Gram-positivos como Gram-negativos cuya selección es debido a su asociación con las enfermedades de transmisión alimentaria.

Se realizó el ajuste de concentración de las cepas P46 y P47 a una D.O._{600nm} 0.2, que al tomar en cuenta el volumen de inóculo se emplearon las cepas en concentraciones del orden de 10⁴ UFC (en 3 µL), además se tomó a *L. casei* Shirota como control.

En la Tabla 13 se reporta el halo de inhibición obtenido, en donde *Lactobacillus plantarum* P46 fue la cepa que presentó mejores resultados, al generar un halo de inhibición de 12 mm sobre *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepa ATCC14028, mientras que, *L. casei* Shirota generó un halo translucido de 8 mm, sin embargo, en la Figura 13, adicionalmente se observa un halo de 11 mm con colonias intrahalo en 3mm, generando un halo opaco en la circunferencia lo cual indica un efecto bacteriostático producido por *L. casei* Shirota frente a *S. enterica* Typhimurium.

Las cepas probióticas producen una gran variedad de compuestos, no necesariamente con propósito bactericida, algunos de ellos son ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y ácidos grasos, que en conjunto provocan una disminución en el pH del medio, lo cual a su vez genera un efecto antimicrobiano sobre bacterias entéricas (O'hara *et.al.*, 2007), lo cual puede explicar la inhibición en el desarrollo de *S. enterica* serovar Typhimurium por parte de *L. plantarum* P46, ya que el pH del medio después del crecimiento de 24 h esta cepa es de 3.85.

Tabla 13. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas de estudio sobre diversos patógenos mediante ensayos de antibiosis.

Patógeno	Halo de inhibición (mm)		
	<i>L. casei</i> Shirota [28x10 ⁴]*	<i>L. plantarum</i> P46 [16X10 ⁴]*	<i>L. brevis</i> P47 [23X10 ⁴]*
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium cepa ATCC14028	8	12	7 ^{eb}
<i>E. coli</i> ATCC11229	7	7	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	9	9	-
<i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	9	12	10
<i>S. pyogenes</i> CFQ-B-218	7	8	6 ^{eb}
<i>S. aureus</i> ATCC6538	10	11	6 ^{eb}
<i>E. faecalis</i> CFQ	9	10	-
<i>B. cereus</i> CFQ-B-230	9	9	-
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	-	-	-

(*) concentración de UFC en los 3µL de inóculo; (**eb**) efecto bacteriostático; (-) sin inhibición.

En las placas con *Lactobacillus plantarum* P46 con una concentración del orden de 10⁴ UFC se observaron halos de inhibición sobre *Listeria monocytogenes*, *S. pyogenes*, *S. aureus* y *E. faecalis*, lo cual coincide con la literatura ya que se ha demostrado un mayor efecto de inhibición cuando se trata de bacterias con el mismo Gram (López *et al.*, 2008).

El efecto de inhibición sobre las bacterias Gram positivas, fue mayor por parte de la cepa P46 respecto a *L. casei* Shirota, como se mencionó anteriormente, el espectro de acción antibacteriano de las bacterias Gram positivas es este mismo grupo, debido principalmente a la producción de bacteriocinas cuyos blancos de acción son la membrana y pared celular, así como algunas enzimas de importancia para el metabolismo celular.

En los ensayos con *E. coli* y *P. aeruginosa*, la cepa P46 presentó un halo de inhibición del mismo tamaño al generado por la cepa control, se ha documentado que las bacterias ácido lácticas tienen poco potencial antimicrobiano hacia bacterias Gram negativo (Vanegas *et al.*, 2012), sin embargo, como se mencionó con

anterioridad la cepa P46 generó una inhibición superior a la cepa control sobre *S. enterica* serovar Typhimurium, lo cual coincide con lo obtenido en algunos estudios previos (Vanegas *et al.*, 2012; Garcez *et al.*, 2014).

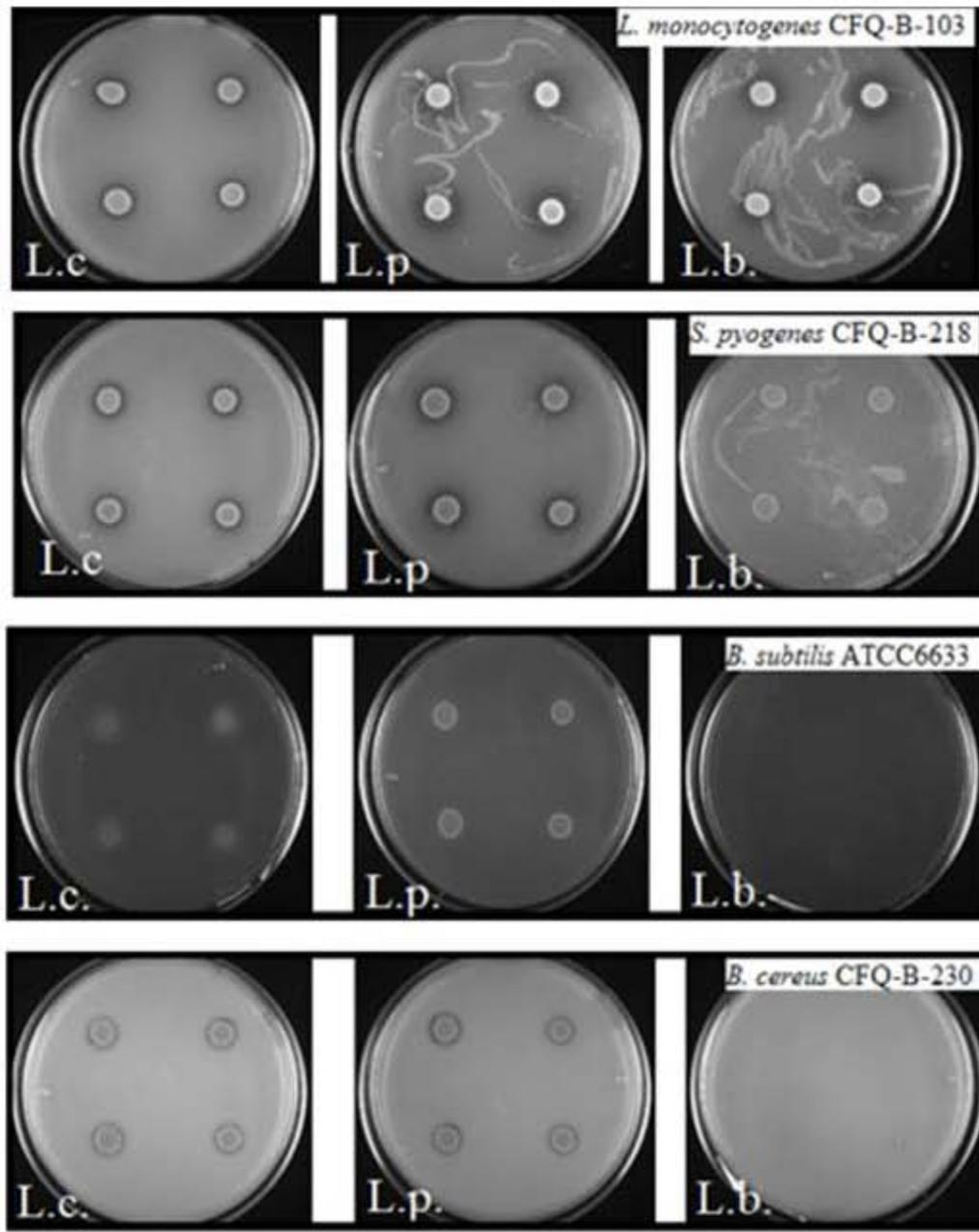


Figura 13. Ensayo de antibiosis sobre el desarrollo de los patógenos empleados por: **L.c.:** *L. casei* Shirota; **L.p.:** *L. plantarum* P46; **L.b.:** *L. brevis* P47.

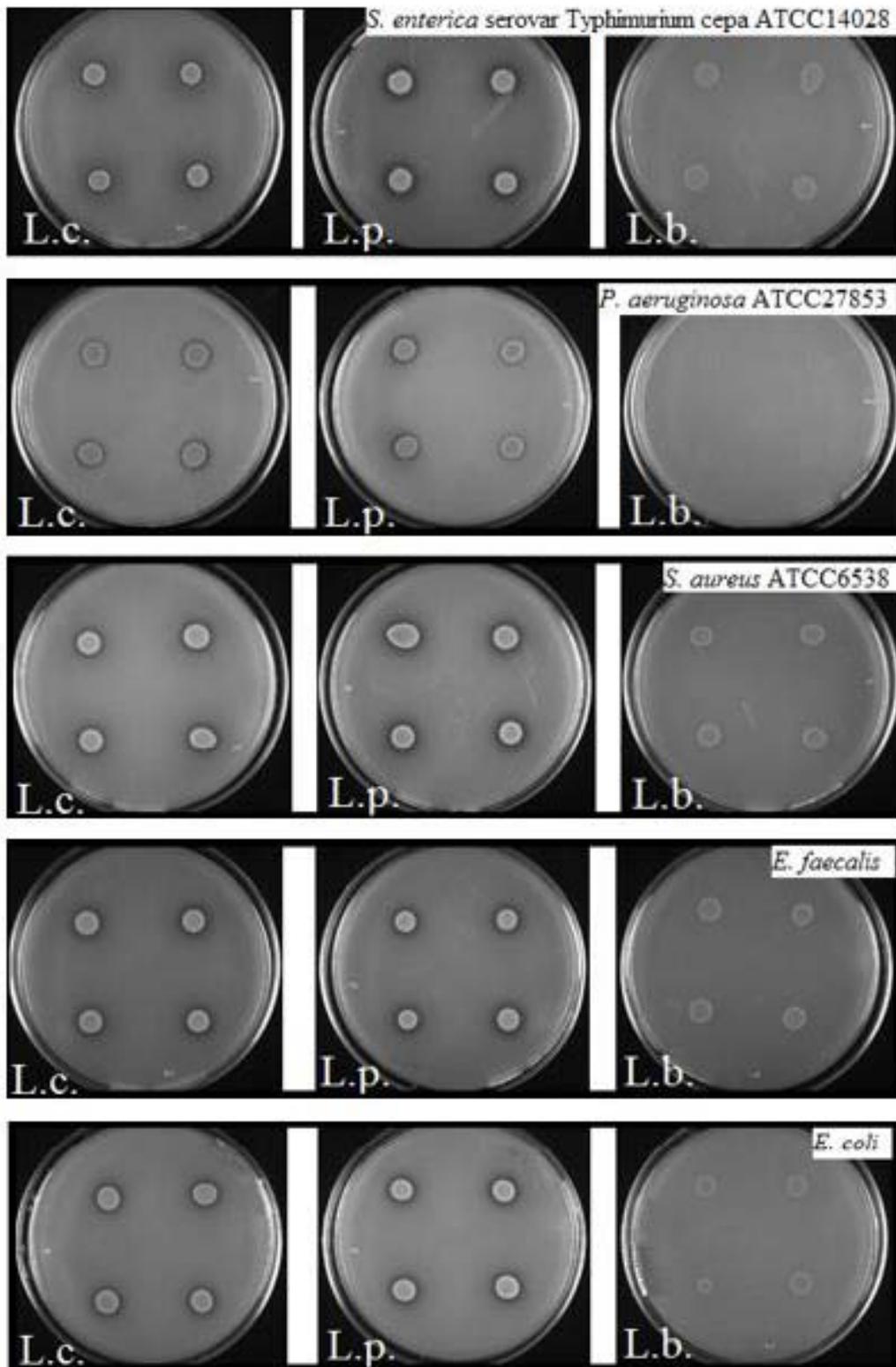


Figura 13. Ensayo de antibiosis sobre el desarrollo de los patógenos empleados por: **L.c.:** *L. casei* Shirota; **L.p.:** *L. plantarum* P46; **L.b.:** *L. brevis* P47 (Continuación).

En cuanto a los ensayos realizados con la cepa P47 no se observó halo de inhibición en las placas con *P. aeruginosa* y *E. coli*, generó un efecto bacteriostático hacia *S. enterica* serovar Typhimurium al producir un halo de 7 mm con colonias aisladas en su interior, lo que indicó una baja capacidad para inhibir a bacterias Gram-negativas, mientras que dentro de las bacterias patógenas Gram-positivas empleadas, nuevamente se presentó un efecto bacteriostático frente a *S. pyogenes* CFQ-B-103 y *S. aureus* ATCC6538.

La cepa P47 únicamente presenta actividad antimicrobiana tipo bactericida hacia *L. monocytogenes* CFQ-B-103, al producir un halo de 10 mm, lo cual puede estar asociado a la producción de ácidos orgánicos, no obstante, se sabe que las bacteriocinas de microorganismos Gram positivos actúan sobre bacterias de este mismo grupo, lo cual puede indicar el porqué de la acción antibacteriana de la cepa P47 hacia *Listeria monocytogenes* CFQ-B-103, para asegurar esto, se deben realizar otras pruebas con el fin de determinar el tipo de metabolitos generados por esta cepa.

En el caso de *Bacillus subtilis* no se observó inhibición del crecimiento por las cepas P46 y P47 ni con *L. casei* Shirota mientras que los ensayos frente a *B. cereus* se observó una ligera inhibición por *L. plantarum* P46 y la cepa control, las especies del género *Bacillus* en estado vegetativo son sensibles a la disminución del pH, efecto que provoca el cese del crecimiento y la formación de la endospora (Pérez *et al.*, 2011) lo cual pudo desencadenarse al entrar en contacto con el inóculo de BAL ya que esta genera ácidos durante su desarrollo.

Los resultados obtenidos de la cepa P46 confirman los reportados por Gutiérrez (2015) al ser la BAL con mejores resultados antimicrobianos, por otra parte, se indicó un efecto inhibitorio de aproximadamente 3 mm mayor al halo obtenido en este trabajo con *L. brevis* P47 frente a *S. enterica* serovar Tiphya ATCC 9992, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *Listeria monocytogenes*, la diferencia en el nivel de efecto inhibitorio puede estar relacionado a una concentración de células mayor a la actualmente empleada (D.O. 600nm 0.2), así como a la metodología de inoculación y por ende el grado de efecto bacteriostático producido por la cepa P47.

La capacidad de las especies del género *Lactobacillus* sp. para inhibir microorganismos patógenos permite evidenciar su contribución al efecto barrera, debido a la segregación de compuestos antimicrobianos de diferente naturaleza o a un efecto similar a la exclusión competitiva, de acuerdo con la FAO/OMS (2006) los posibles mecanismos probióticos que intervienen en el control de patógenos intestinales son la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas o ácidos orgánicos), la exclusión competitiva de la fijación de patógenos, al evitar la adhesión de los patógenos a los enterocitos, así como la competencia por nutrientes y la modulación del sistema inmunitario.

8.8 Ensayos de inhibición competitiva entre cepas aisladas del pulque

A la par de los ensayos de actividad antimicrobiana sobre patógenos, se realizaron pruebas de inhibición entre los lactobacilos de estudio y *L. mesenteroides* P45, ya que se podría presentar competencia entre la comunidad microbiana del pulque, debido a las modificaciones en la composición bacteriana durante el proceso de fermentación, además del efecto de las bacterias Gram positivas sobre este mismo grupo, en la Tabla 14 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 14. Halo de inhibición producido entre cepas aisladas del pulque.

Cepa	Halo de inhibición (mm)		
	<i>L. mesenteroides</i> P45 [78x10 ³]*	<i>L. plantarum</i> P46 [16x10 ⁴]*	<i>L. brevis</i> P47 [23x10 ⁴]*
<i>L. mesenteroides</i> P45		12	-
<i>L. plantarum</i> P46	6 ^{eb}		-
<i>L. brevis</i> P47	6 ^{eb}	6 ^{eb}	

(*) concentración de UFC en los 3µL de inóculo; (-) sin inhibición; (**eb**) efecto bacteriostático.

En la Figura 14, se presentan los resultados de los ensayos realizados, en donde se observó un halo de inhibición de 12 mm generado por *L. plantarum* P46 sobre *L. mesenteroides* P45 y un efecto bacteriostático sobre *L. brevis* P47. Por su parte, la cepa P45 presentó efecto bacteriostático frente ambas cepas de lactobacilos, al ser bacterias ácido lácticas, esta inhibición de desarrollo puede ser debida a una competencia de nutrientes ya que finalmente presentan altos requerimientos nutricionales.

Los resultados obtenidos pueden indicar que al ingresar al tracto gastrointestinal es posible que se generen cambios en la microbiota del individuo, dependiendo del tipo de bacterias que presente puesto que no se observó inhibición por parte de *Lactobacillus brevis* P47 pero si de las cepas P45 y P46.

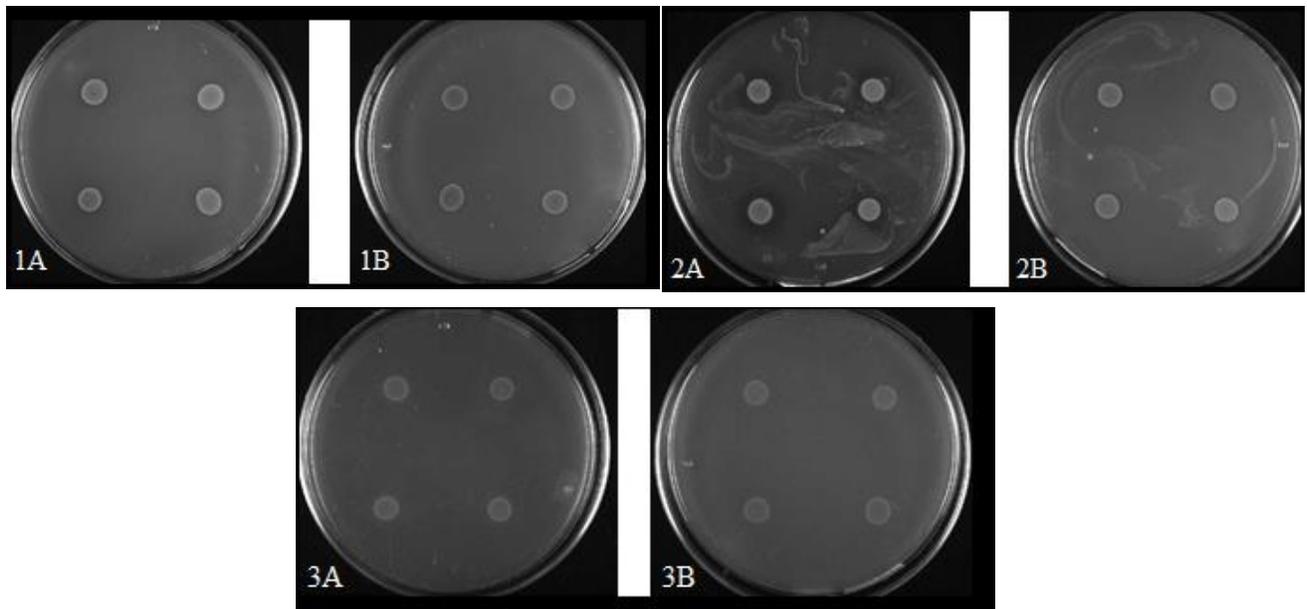


Figura 14. Halos de inhibición generados por cepas aisladas a partir del pulque. 1A) Inhibición generada por *L. mesenteroides* P45 sobre *L. plantarum* P46; 1B) Inhibición generada por *L. m* P45 sobre *L. brevis* P47; 2A) Inhibición generada por *Lactobacillus plantarum* P46 sobre la cepa P45; 2B) Inhibición generada por *L. p* P46 sobre *L.b* P47; 3A) Ensayo de inhibición de *Lactobacillus brevis* P47 sobre *L. p* P46; 3B) Ensayo de inhibición de *L. brevis* P47 sobre la cepa P45.

8.9 Obtención de la curva de crecimiento de *L. plantarum* P46

Se realizó la curva de crecimiento (Figura 15) de la cepa P46 para encontrar el punto de su crecimiento en donde hay un mayor efecto antimicrobiano, el monitoreo se efectuó cada 2 horas durante un lapso de 12 horas y un último muestreo a las 24 horas de crecimiento, dicho ensayo se realizó por triplicado. El margen de error obtenido fue del 0.6% (tratamiento estadístico en el anexo IV).

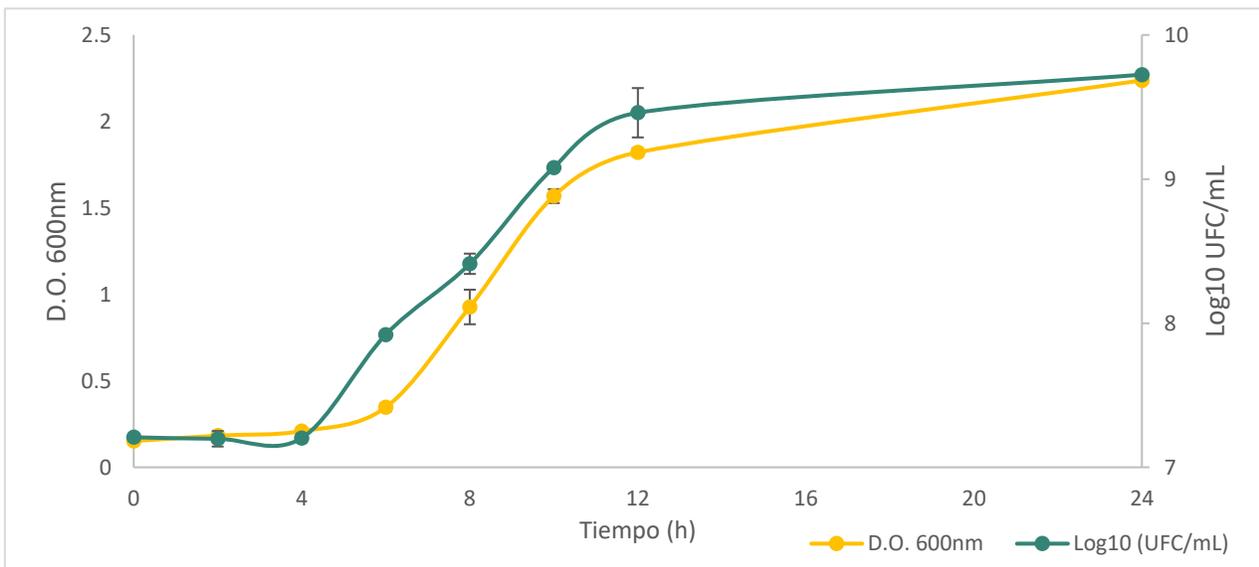


Figura 15. Curva de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* P46 a 35°C en caldo APT en condiciones de microaerofilia.

A las 6 h de monitoreo se observó el inicio de la fase exponencial y el inicio de la fase estacionaria a las 10 h de crecimiento mediante la medición de densidad óptica a una longitud de 600nm. De igual modo se presenta el promedio de la cuenta en placa asociada al monitoreo de la curva de crecimiento, realizado con el fin de corroborar que la densidad óptica que se observó está ligada al crecimiento bacteriano y la viabilidad posterior del mismo, la concentración final de la cepa fue del orden de magnitud de 10^9 UFC/mL.

8.10 Efecto antimicrobiano del extracto crudo y concentrado de *L. plantarum* P46

Al ser *Lactobacillus plantarum* P46 la cepa con mejores resultados de inhibición a patógenos, se realizaron ensayos con sobrenadantes para discernir el tipo de productos generados por las BAL que producen actividad antimicrobiana, por lo que se determinó si estos factores se encuentran asociados a la pared celular o bien son productos extracelulares y por lo tanto secretados al medio (sobrenadante).

Se realizaron ensayos de antibiosis con sobrenadantes de la bacteria ácido láctica con crecimiento de 24 h únicamente con 4 patógenos de los 10 empleados en las pruebas previas, los cuales fueron seleccionados al ser frente a los que se generó mayor halo de inhibición en los ensayos con *L. plantarum* P46.

Se observó un resultado antimicrobiano menor al obtenido en ensayos célula-célula frente a los cuatro patógenos, con el extracto crudo se obtuvo un efecto bacteriostático, por lo que se procedió a realizar los ensayos con sobrenadantes concentrados 1.5 veces para así descartar el hecho de que la falta de inhibición fuera debido a que los agentes antimicrobianos se encontraran en concentraciones inferiores a la necesaria para producir el efecto de inhibición y no por que estos se encontraran asociados a la pared celular de *L. plantarum* P46 (Tabla 15).

Tabla 15. Resultados del efecto antimicrobiano del sobrenadante crudo y extracto concentrado de *L. plantarum* P46.

Cepa	Halo de inhibición (mm)*	
	Extracto crudo	Extracto concentrado
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	7	8
<i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	5	5
<i>S. pyogenes</i> CFQ-B-218	6	6
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	9	9

*Todos los resultados presentaron colonias intrahalo.

Se utilizó como control caldo APT concentrado 1.5 veces., para corroborar que la inhibición observada no fuese causada por la concentración de los componentes del medio de cultivo y el efecto procediera de los compuestos producidos por la cepa P46. Nuevamente el efecto inhibitorio que se observó fue inferior al generado en los ensayos con las bacterias *in situ*, para todos los patógenos, en donde se observó colonias dentro de los halos lo cual indica un efecto bacteriostático.

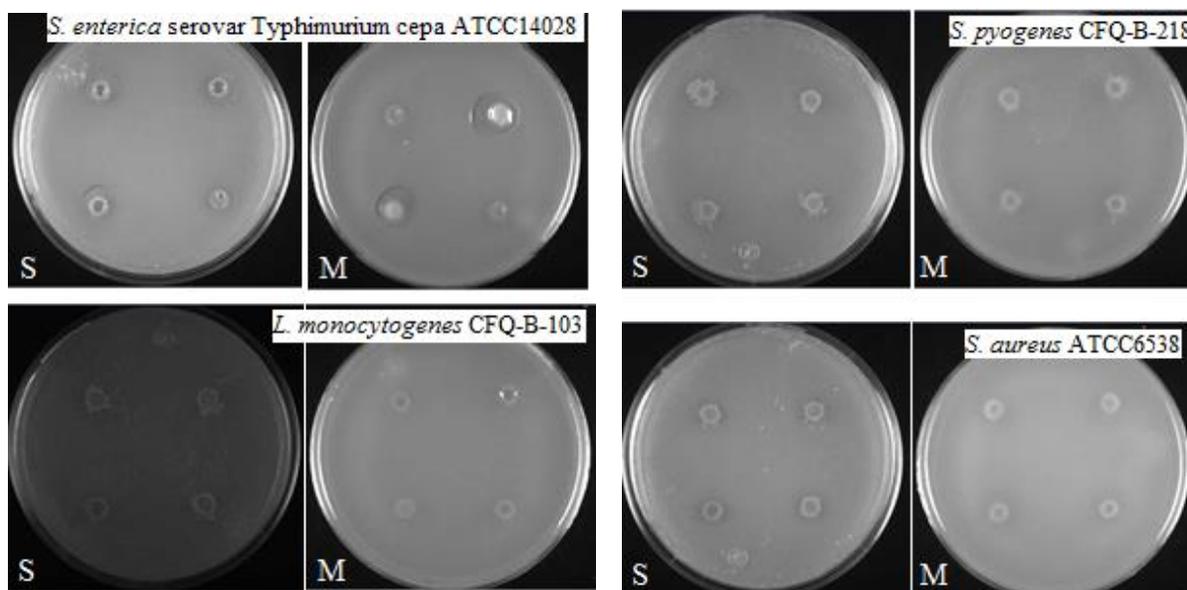


Figura 16. Ensayos de antibiosis con sobrenadantes concentrados.

S: sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* P46 concentrado; **M:** medio APT (caldo).

En la Figura 16 se presentan halos en estos ensayos, lo cual puede estar asociado a la concentración de otros productos de la fermentación de *L. plantarum* P46 como el ácido láctico y acético (Jurado-Gómez *et al.*, 2013) dado que el sobrenadante no fue neutralizado previamente ya que las BAL producen ácidos orgánicos, los cuales al penetrar la pared celular mientras la molécula de ácido se encuentre en forma no disociada y una vez que estos ácidos traspasan esta barrera se disocian en sus dos componentes, el anión, que modifica el material genético de la célula y el catión, que acidifica el citoplasma, lo que somete a la bacteria a un alto desgaste energético para neutralizarlo (Pérez *et al.*, 2011).

Dentro de los agentes microbianos producidos por cepas de *Lactobacillus plantarum* destaca la plantaricina, la cual presenta su actividad mediante permeabilidad de membrana, esta actividad es dependiente de la composición lipídica de la membrana (Todorov, 2009), por lo que es probable que *Lactobacillus plantarum* P46 presente uno o más agentes antimicrobianos asociados a su pared celular, para corroborar esto es necesaria la realización de ensayos con mayor concentración de sobrenadante y ruptura de célula.

8.11 Evaluación *in vivo* de *L. plantarum* P46 en ratones Balb/c

Con base a los resultados obtenidos durante el presente trabajo, *Lactobacillus plantarum* P46 presentó el mejor rendimiento en cuanto a su potencial probiótico, por ello, se realizó un ensayo *in vivo* con la finalidad de evaluar el efecto de esta cepa frente a una invasión de *Salmonella* en ratones Balb/c de 8-9 semanas de edad.

El uso de estos ratones es debido a que son de una cepa congénita, lo cual disminuye la variabilidad de la respuesta, permitiendo obtener una respuesta concreta a la invasión de un microorganismo en específico. Las cepas empleadas como control fueron *L. mesenteroides* P45 como control positivo aislado del pulque y *L. casei* Shirota como probiótico comercial, la cepa patógena empleada fue *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Str^r.

Durante el ensayo se realizó el pesaje de los animales (Anexo VI), y se encontró que no existe diferencia significativa entre el peso de los ratones, al inicio, durante y al finalizar el tiempo de ensayo, por lo cual la administración con las BAL empleadas no influyó en el peso corporal de los roedores, ya que estudios indican la posible relación entre el consumo de probióticos y la modificación del peso del huésped debido a que estos microorganismos pueden influir en funciones metabólicas y en la modulación de la microbiota intestinal (Angelakis *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013; Prados-bo *et al.*, 2015; Drissi *et al.*, 2017).

Por otro lado, se observó el comportamiento y modificaciones visuales en el pelaje de los animales durante el tiempo de ensayo, ya que se han realizado estudios en donde se ha demostrado que al incluir en la dieta ciertos probióticos, estos activan el sistema inmune y el metabolismo mediante vía que restauran la homeostasis de tejidos y promueven la salud, demostrándose visualmente mediante la mejoría del pelo de modelos animales (Fujimura *et al.*, 2010; Levkovich, *et al.*, 2013; Erdman *et al.*, 2014).

En la Figura 17, se presenta el consenso de los resultados obtenidos de ambos lotes, acorde con la concentración de patógeno sobreviviente en los órganos diana, en donde se indica una disminución en la infección de *Salmonella* debido a la administración de las bacterias ácido-lácticas respecto al grupo control, sin embargo, existen diferencias entre el efecto presentado entre los órganos de análisis y la bacteria ácido-láctica empleada (análisis estadístico en el anexo VI).

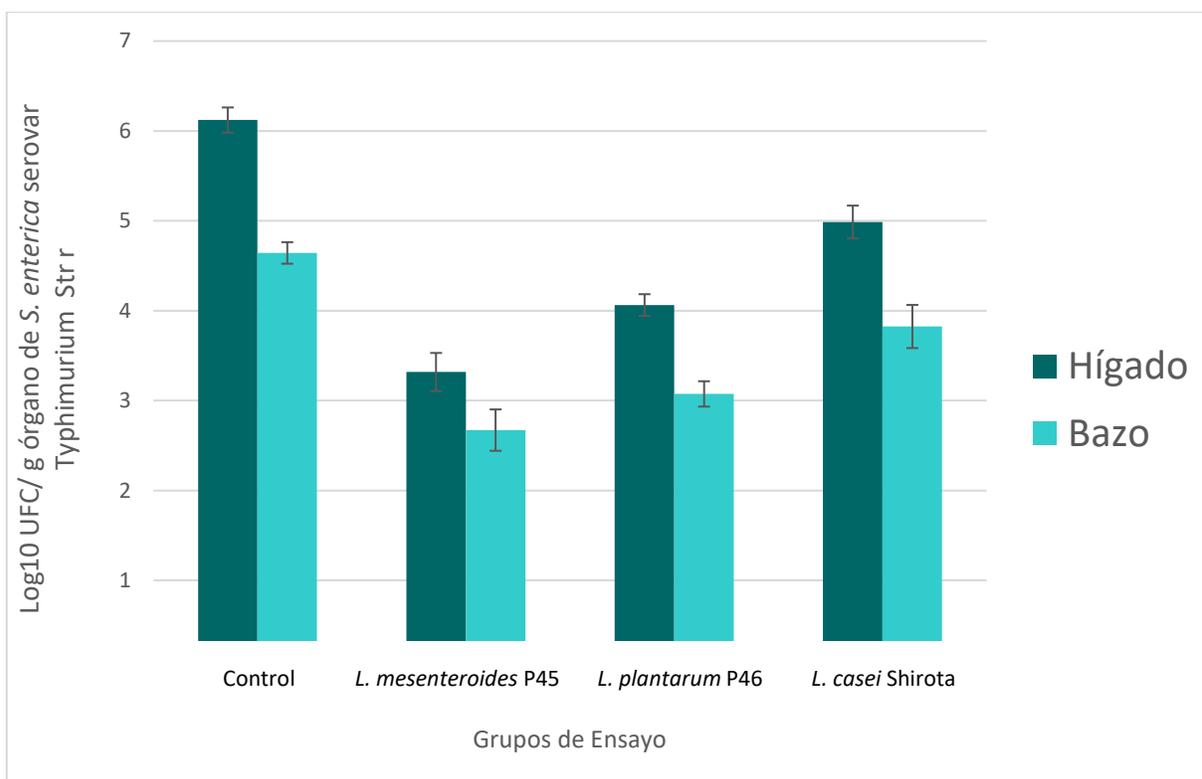


Figura 17. Concentración de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Str^r sobreviviente en bazo e hígado de ratones Balb/c.

En los estudios realizados con la cepa P45 se observó una mayor inhibición de *Salmonella* serovar Typhimurium L1334 Str^r tanto en hígado como bazo, ya que el grupo control presentó una concentración de 1×10^6 y 7×10^4 UFC/g respectivamente, estos resultados difieren en una unidad logarítmica en hígado, respecto a los ensayos previos con esta cepa en donde el microorganismo fue administrado por bebederos, en donde se encontró 7×10^3 UFC/ mL en bazo y 1×10^4 UFC/mL en hígado (Giles-Gómez *et. al.*, 2016) dicha diferencia puede ser dada a la administración mediante sonda esofagástrica, lo cual permite asegurar la llegada de la dosis total administrada al estómago.

Lactobacillus plantarum P46, por su parte, disminuyó la carga bacteriana en dos unidades logarítmicas en el caso del hígado (1×10^4 UFC/g) y una unidad en bazo (1×10^3 UFC/g), este resultado indica que la administración de *L. plantarum* P46 presenta la capacidad para inhibir la infección de la cepa L1334 Str^r, al igual que la cepa P45. Dentro de los mecanismos para inhibir el desarrollo de patógenos se encuentra el efecto barrera, a partir de la habilidad para adherirse al epitelio intestinal (Singhi *et al.*, 2008; Ramakrishna, 2009), por lo que se deben realizar ensayos adicionales para poder conocer cuáles son los mecanismos que siguen las cepas P45 y P46 para producir este efecto antagonista.

En cuanto a los resultados obtenidos por la cepa *L. casei* Shirota, se obtuvo una concentración en hígado de 1×10^5 UFC/g y 8×10^3 UFC/g en bazo de *Salmonella* serovar Typhimurium L1334 Str^r, estos resultados demuestran una capacidad inferior de la cepa Shirota respecto a las bacterias aisladas del pulque, al disminuir la infección en una unidad logarítmica, si bien si presenta un efecto antagónico hacia el patógeno, la magnitud de este puede estar mermada a su poca adhesión al intestino, por lo cual la cantidad de probiótico sería baja y su efecto insuficiente, como se indicó en el protocolo experimental, pasó un periodo de 24 h previo a la infección sin administración de BAL, periodo en el cual, la carga bacteriana presente disminuyó puesto que en la literatura se indica que tras seis horas después de la ingesta, se disminuye considerablemente la concentración de *L. casei* Shirota en el intestino (Ohashi *et al.*, 2004; Tuohy *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015).

En la Figura 20, se muestran ejemplares representativos de cada grupo, acorde a la etapa del desarrollo experimental, siendo la apariencia muy similar en los cuatro conjuntos entre el día inicial de administración de las bacterias ácido láctica y el séptimo y último día de dosis de estas bacterias.

Como se mencionó con anterioridad, algunas cepas de probióticos son capaces de generar beneficios al hospedero no solo a nivel gastrointestinal, si no, que al generar efectos sobre la respuesta inmune, estos favorecen a la salud en general del huésped, por lo cual no se observó esta característica en los ratones tras la ingesta de los lactobacilos y la cepa de *Leuconostoc*, no obstante, los estudios en donde se ha demostrado estos efectos reporta un periodo de ensayo de entre 20 y 24 semanas, tras el cual se observa la modificación en las características físicas del pelaje (Levkovich *et al.*, 2013), por lo que se requiere de un mayor tiempo de ensayo para corroborar si las BAL de estudio pueden o no presentar este tipo de características.

Los síntomas de infección en estos roedores se visualizan en el pelo erizado y escasos del mismo, así como la falta de actividad y en el caso de enfermedades gastrointestinales, la generación de heces fecales de consistencia semi-sólida, estas características fueron evidentes en el lote control, lo que corrobora el estadio infeccioso provocado por *Salmonella* serovar Typhimurium L1334 Str^r. Los ratones tratados con *L. casei* Shirota presentaron comportamiento aletargado, pero en menor medida en relación con el control, lo que a su vez se relaciona con los resultados obtenidos de la cuenta en placa del patógeno hallado en sus órganos.

Como se observa en la Figura 18, no se presentaron de manera aparente las características asociadas a la infección inducida en el ensayo con la cepa L1334 str^r, en las agrupaciones tratadas con las cepas P45 y P46, por el contrario, ambos grupos de ratones presentaban características amigables hacia el contacto humano sin presentar temor o reticencia durante el ensayo, esto puede ser no solo a la regulación de la respuesta inmune como ya se ha mencionado, sino también a la producción de otros compuestos asociados a la regulación del estrés.

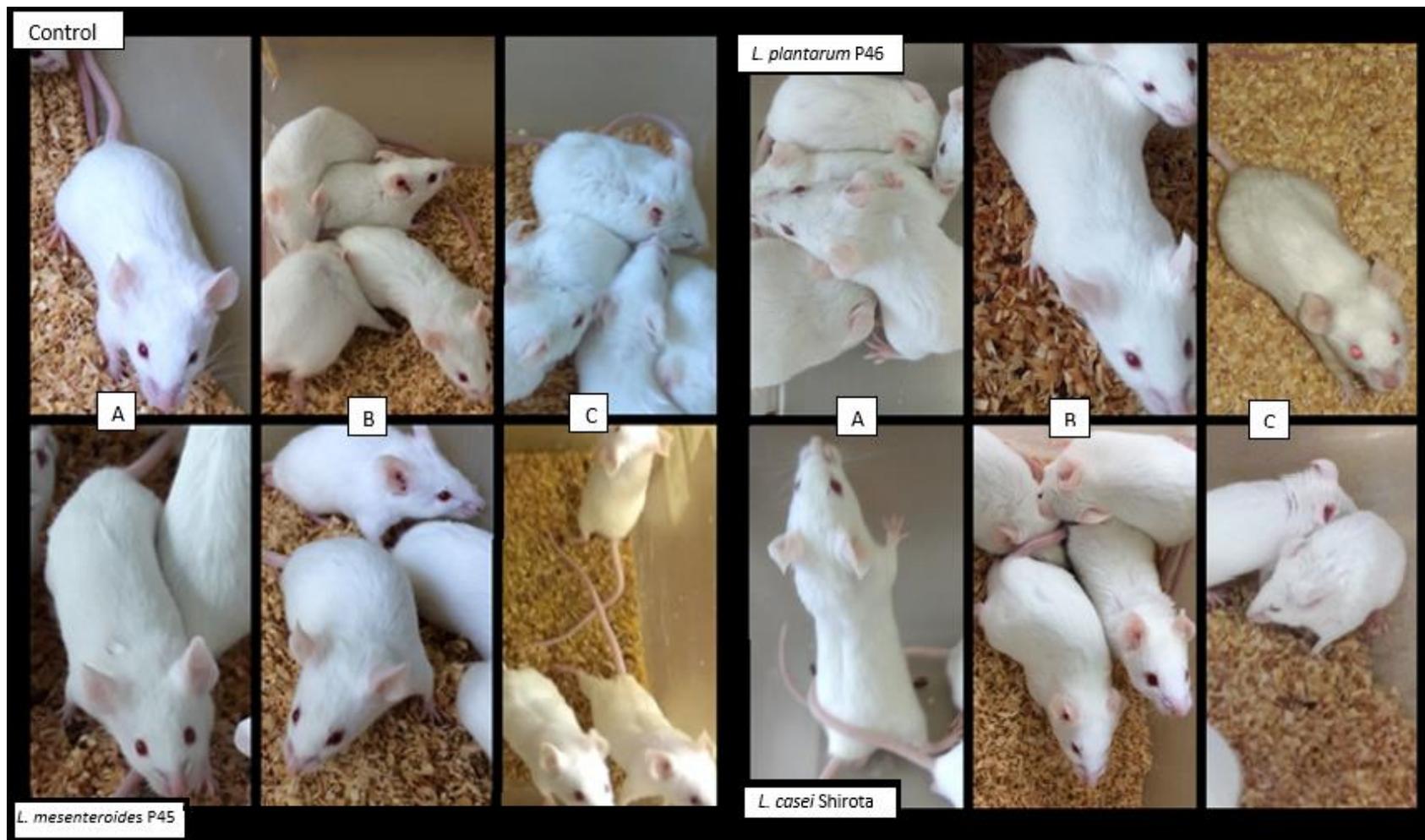


Figura 18. Ejemplares representativos de cada lote de ensayo.

A previo a la primera ingesta de BAL, **B** séptima dosis de probióticos, **C** 48 h de infección de la cepa L1334 str'

Se ha encontrado que cepas del género *Lactobacillus* pueden producir otros metabolitos como lo es el ácido γ -aminobutírico (GABA), este compuesto funciona como neurotransmisor, el cual afecta directamente la personalidad y el manejo del estrés (Bravo *et al.*, 2011; Dhakal *et al.*, 2012).

Este compuesto no solo ha sido asociado a su utilidad como neurotransmisor, estudios indican que también puede inducir la secreción de insulina y prevenir la diabetes (Hagiwara *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2007) por lo cual, es de relevancia el conocer la capacidad de bacterias ácido-lácticas para generar otros metabolitos que sean de interés para su uso en humanos y a la vez seguros, gracias a su amplia distribución en alimentos.

9. Conclusiones

Las cepas P46 y P47 presentaron una excelente capacidad para sobrevivir a pH ácido (3.5) y a la presencia de sales biliares (0.3%) al ser sometidas durante 24 horas en concentraciones estandarizadas, demostrando así ser cepas altamente resistentes.

A partir de los resultados obtenidos en ensayos de antibiosis con concentraciones estandarizadas de cultivo y posterior evaluación del extracto crudo de la cepa P46 se logró demostrar su capacidad antimicrobiana *in vitro* frente a microorganismos patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos.

Se obtuvo el perfil de resistencia a antibióticos de las cepas P46 y P47, la cual se presentó frente a tetraciclina y vancomicina, comportamiento reportado en la literatura para especies de *Lactobacillus*.

Mediante la secuenciación del operón ribosomal, se logró un 99% de identificación de la cepa P46 como *Lactobacillus plantarum*, en donde las regiones variables halladas permiten suponer que pertenece a una subespecie.

Se logró caracterizar el potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* P46 mediante ensayos *in vitro* y se evaluó su efecto antimicrobiano *in vivo* frente a una infección de *S. enterica* serovar Typhimurium str^r al eliminar más del 95% de la carga infecciosa en ratones Balb/c machos.

10. Perspectivas

Obtener la secuenciación completa del genoma de *Lactobacillus plantarum* P46.

Corroborar el antibiograma de las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 mediante el método de Kirby-Bauer, así como la determinación del origen de la posible resistencia a algunos antibióticos.

Determinar si *Lactobacillus plantarum* P46 presenta capacidad de adherencia a células epiteliales y los mecanismos de modulación de la respuesta inmune de manera *in vitro* e *in vivo*.

Caracterizar el origen de la capacidad bactericida de *L. brevis* P47 hacia *Listeria monocytogenes*.

Caracterizar los compuestos que puedan generar neurotransmisores.

Es necesario realizar más ensayos enfocados hacia el conocimiento de los compuestos microbianos generados por la cepa P46, ensayos mediante la ruptura de célula, así como el análisis por HPLC de su sobrenadante, con la finalidad de desarrollar nuevos ensayos de mayor tiempo en modelo animal con el fin de corroborar otros efectos asociados a su ingesta y los posibles usos terapéuticos de esta cepa.

11. Bibliografía

- Alvarado-Rivas, C. & Díaz-Rivero, C., (2009). Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Revista de la Facultad de Farmacia, Universidad de los Andes*, Vol. 51, pp: 8-14.
- Andrade, C., Soza, M., Penna, C., Acurcio, L., Sant'Anna, F., Castro, R. & Oliveira, D., (2014). Propiedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. Isolados de queijosminas artesanais da Serra da Canastra- MG, *Brazilian journal of veterinary and animal sciences*, Vol. 66, No.5, pp: 1592-1600. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-6781>.
- Angelakis, E., Merhej, V. & Raoult, D. (2013). Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification, *The Lancet Infectious Diseases*, Vol. 13, No. 10, pp:889-899. <http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099>.
- Argyri, A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K., Tsakalidou, E., Nychas, G., Panagou, Z. & Tassou C., (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests, *Food Microbiology*, vol. 33, pp: 282-291. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>.
- Arribas M. (2009). Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune. (tesis de doctorado). Universidad de Granada. pp. totales: 213. [En línea, Fecha de consulta: 24 enero 2018]. Disponible en: < <http://0-hera.ugr.es/adrastea.ugr.es/tesisugr/17820467.pdf>>
- Banna, G., Torino, F., Marletta, F., Santagati, M. & Salemi R. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* GG, an overview to explore the rationale of its use in cancer, *Frontiers in pharmacology*, Vol. 8, No. 603. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00603>.
- Brunser (2017). Inocuidad, prevención y riesgos de los probióticos, *Revista chilena de pediatría*, Vol. 88, No.4, pp: 534-540. <http://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062017000400015>.
- Cabrera, J., Moreno, E., Miranda, C. & Dolores, M. (2010). Endocarditis por *Lactobacillus casei/paracasei*, *Carta científica, Elsevier*, Vol. 28, No. 7, pp:407-484. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.09.013>.
- Calva, E., Zaidi, M. & López, C. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Vol. 48, No. 2, pp: 121-125. En línea, [Fecha de consulta: 28 marzo 2018] disponible en: < <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062l.pdf>>
- Campos, I. (2010). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica, [tesis de licenciatura], Facultad de Química UNAM. pp. totales: 90 Disponible en Tesiunam en: <http://132.248.9.195/ptb2010/junio/0658491/Index.html>
- Cardona-Castro, N. & Sánchez-Jiménez M. (2003). Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio: Asociación colombiana de infectología*. Vol. 7, No. 7, pp:22-29.

Carasi, P. (2014). Potencialidad probiótica de lactobacilos con capa S. Estudios sobre la inocuidad, efecto antimicrobiano y capacidad inmunomoduladora de *Lactobacillus kefir*, [tesis de doctorado], Facultad de ciencias exactas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina. [En línea, Fecha de consulta: 25 septiembre 2018]. Disponible en: < <http://hdl.handle.net/10915/43573>>

Castro, D., Hernández, H. & Yáñez, J., (2015). Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*, Springer: Probiotics & antimicrobial proteins, vol. 7, pp:107-117.

Cástulo, I., Del campo, M., Gómez, H. & Alaníz, R., (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocigénica aisladas de quesos frescos. e-Gnosis-Universidad de Guadalajara, vol. 6, pp: 10-17.

Cho, Y., Chang, j. & Chan, H. (2007). Production of γ -aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells, Journal of microbiology biotechnology, vol. 17, No.1 pp:104-109.

Collado, M., Meriluoto J. & Salminen S. (2007). Role of comercial probiotic strains against human pathogen adhesión to intestinal mucus. Letters in applied microbiology. Vol. 45. pp: 454-460.

Cueto, C. & Aragón S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. Scientia agropecuaria. Vol 1. pp:45-50

Díaz-Alonso, C., Garrote-Santana H., Amor-Vigil, A., Suárez-González, Y. & Mugica R. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. Instituto de hematología e inmunología. Vol. 29 No. 3

De Vries, M. (2006). Analyzing global gene expression of *Lactobacillus plantarum* in the human gastrointestinal tract, [Tesis de doctorado], Universidad Wageningen. En línea, [Fecha de consulta: 8 septiembre 2018] disponible en: < <http://edepot.wur.nl/33094>>.

Dhakal, R., Vivek, B. & Kwang, HB. (2012). Production of gaba (γ - Aminobutyric acid) by microorganism: a review, Brazilian journal of microbiology, Vol 43, No.4, pp: 1230-1241.

Drissi, F., Raoult, D., Merhej, V. (2017). Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. Microbial pathogenesis. Vol.106, pp: 182-194.

Erdman S. & Poutahidis, T., (2014). Probiotic 'glow of health': it's more than skin deep. Beneficial microbes, Vol. 5, No.2, pp: 109-119.

Escalante, A. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. International journal of food microbiology, vol. 124, pp: 126-134.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Esquivel, G., Matus, V., Moreno, R., López, A. Lappe P., (2012). Pulque fermentation. **En:** Handbook of plant-based fermented food and beverage technology, Boca ratón, CRC press, pp: 691-706.

Escalante, A., López-Soto, D., Velázquez-Gutiérrez, J., Giles-Gómez, M., Bolívar, F. & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological and technical aspects. *Frontiers in microbiology*, Vol 7 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>.

FAO/OMS (2006). *Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*, Roma, pp:1,4-13

FAO/WHO (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London-Ontario, pp:2-8.

Feichtinger, M., Mayrhofer, S., Kneifel, W. & Doming, K. (2016). Tetracycline resistance patterns of *Lactobacillus buchneri* Group Strains. *Journal of food protection*. Vol. 79, No. 10, pp:1741-1747. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-577.

Figuroa, I. & Verdugo, A., (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp., *Revista latinoamericana de microbiología*, Vol. 47, No. 1-2, pp. 25-42.

Flores, A. (2007). Perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos en bacterias del ácido láctico y bifidobacterias. Caracterización molecular de genes de resistencia. [tesis de doctorado]. Universidad de Oviedo, España. [En línea, consultado el 29 de octubre 2018] Disponible en < <http://hdl.handle.net/10261/5384>>

Forouhandeh, H Zununi, S., Hejazi, M., Nahaei, M. & Akbari D. (2010). Isolation and phenotypic characterization of *Lactobacillus* species from various dairy products. *Current research in bacteriology*, vol.3, pp: 84-88.

Fournier, G. & Mondragón L. (2012). "Las bebidas mexicanas. Pulque, mezcal y tesgüino. *Arqueología mexicana*. No. 114. pp:52-59.

Freitas, M. (2017). The benefits of yogurt, cultures, and fermentation, capítulo 24, **En: The microbiota in gastrointestinal pathophysiology**, editorial: Academic press, pp: 209-223.

Fujimura, K., Slusher, A., Cabana, D. & Lynch, V. (2010). Role of the gut microbiota in defining human health. Expert review of anti-infective therapy, microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, Vol.136, pp: 65–80.

Gaik, L. & Liang M. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of *in vivo* and *in vitro* findings, *International journal Mol. Sci.*, Vol. 11, pp: 2499-2522.

Garcez, D., (2014). La *Salmonella* bajo control: el uso de probióticos como herramienta adicional a la vacunación, *Revista de ciencias veterinarias.*, Vol. 30 N° 5, pp:16-19.

García, M., López, A. & Quintero R. (2004). Bebidas alcohólicas no destiladas. En: *Biocología alimentaria*. México, LIMUSA, D.F. pp.262-309.

García-Cano, I., Velasco-Pérez, P., Rodríguez-Sanoja, S., Sánchez, S. & Mendoza-Hernández J. (2011). Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, *Journal of applied microbiology*, vol. 111, pp: 607-615.

Giannella, A. (1996). *Salmonella*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; Capítulo 21, En línea, [Fecha de consulta: 8 septiembre 2018] disponible en: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>>

Giles-Gómez, M., Sandoval, J., Matus, V., Campos, I., Bolívar, F., Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage, Springer Plus, 5:708 doi: 10.1186/s40064-016-2370-7

Giok, F. (2016). Antimicrobial resistance in direct-fed microbial preparations used in cattle, [tesis de maestría]. College of veterinary medicine, Kansas state university. [En línea, consultado el 4 de septiembre 2018] Disponible en < <http://krex.k-state.edu/dspace/handle/2097/32859>>

Godínez-Oviedo, A. (2017). Prevalencia y causas de enfermedades gastrointestinales en niños del estado de Hidalgo, México, Salud pública de México, en línea] 2017, 59 (Marzo-Abril): [Fecha de consulta: 13 de enero de 2018] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10650931002>> ISSN 0036-3634

Gómez-Aldapa, C., Díaz-Cruz, C., Villarruel-López, A., Torres-Vitela, M., Añorve, J., Rangel-Vargas, E. & Castro-Rosas, J. (2011). Behavior of *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* during production of pulque, a traditional mexican beverage. Journal of food protection, Vol. 4, pp: 580-587.

González, F. & González-Martínez, B. (2006). Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos, Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición UANL, vol. 7 no. 1 [En línea, consultado el 3 de octubre 2018] Disponible en < <http://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/162>>

Gutiérrez, E. (2015). Detección de Lactobacilos aislados del pulque con capacidad probiótica [tesis de licenciatura], Facultad de Química UNAM, Ciudad de México. Pp:97.

Hagiwara, H., Seki T., Ariga, T. (2004). The effect of pre-germinated brown rice intake on blood glucose and PAI1 levels in streptozotocin-induced diabetic rats. Biosci. biotechnol. iochem. Vo. 68 pp: 444-447.

Haraga, A., Ohlson, M. & Miller, S. (2008). *Salmonella* interplay with host cells. Natural review microbiology. Vol. 6 pp:53-66.

Hernández, C., Aguilera, G. & Castro G. (2011). Enfermedades infecciosas y microbiología, vol. 31, No. 4, pp:137-151

Hernani, C., Flórez, M. & Huapaya J. (2007). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Horizonte médico. Vol. 7 No.1 pp:16-22.

Hudault, S., Liévin, V., Nernet-Camard, M. & Servin, A. (1997). Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella* Typhimurium C5 infection, Vol. 63, No. 2, pp: 513-518.

Hurtado, M. (2015). INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA La salud ambiental en México, situación actual y perspectivas futuras [en línea] (actualizado febrero 2015) Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/eventos/2015/Poblacion/doc/p-MagaliHurtado.pdf>

Iñiguez-Palomares, C., Bolado-Martínez, E. & Acedo-Félix, E. (2014). Probióticos: principios y aplicaciones prácticas. capítulo 10. **En:** González-Aguilar A., Los alimentos funcionales- un nuevo reto para la industria de alimentos, editorial: AGT Editor, S.A.

ISO-IDF, (2006). Milk products- enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective médium- colony- count technique at 37°C. ISO 20128:2006 IDF 192:2006(E.)

Jain, K., McNaught, E., Anderson, A., MacFie, J., Mitchell, J., (2004). Influence of synbiotic containing *L. acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial, Clinical nutrition. Vol.23, No.4 pp:467-475.

Jay, J., Loessner, M., Golden, D. (2009). Microbiología moderna de los alimentos, España, Editorial Acribia S. A., pp: 106-110, 401-408, 481-493.

Jiménez, R., González, N., Magaña, A. & Corona A. (2010). Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*), Revista venezolana de ciencia y tecnología en alimentos, Vol. 1, No. 1, pp:70-80.

Jurado-Gámez, H., Ramírez, C. & Aguirre D. (2013). Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. Veterinaria y zootecnia. Vol. 7 No. 2 pp: 37-53.

Jurado-Gámez, H., Orbes-Villacorte A. & Mesías-Pantoja L. (2017). Evaluación *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas mediante química sanguínea, inmunohistoquímica y microscopía electrónica en *Cavia porcellus*. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. Vol. 15 No. 2 pp:11-21.

Kafsi, H., Binesse, J., Loux, V., Buratti, J., Boudebouze, S., Dervyn, R., Kennedy, S., Galleron, N. & Quinqui B., (2014). *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* and ssp. *bulgaricus*; a chronicle of evolution in action, BMC genomics, vol. 15, No.1, pp:407-417.

Kerry, R., Kumar, J., Gouda, S., Park, Y., Shin, H. & Das G. (2018). Benefaction of probiotics for human health:A review. Journal of food and drug analysis, Vol. 26, pp: 927-939.

Kleerebezem, M., Boekhrst, J., Van-Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O., Leer, R., Tarchino, R., Peters, S., Sandbrink, H., Fiers, W. & Stiekema W., (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1, PNAS, vol. 100 No.4, pp: 1990-1995.

Lasserrot, M. (2015). Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Lactobacillus* con potencial probiótico. [tesis de doctorado]. Facultad de farmacia. Universidad de Granada.

España. [En línea, consultado el 3 de octubre 2018] Disponible en: <<https://hera.ugr.es/tesisugr/26082354.pdf>>

Laurencio-Silva, M., Arteaga, F., Rondon-Castillo, A., Ormanza, J., Pinto, J., Pazmiño, D. & Maciád, I. (2017). In vitro probiotic potential of *Lactobacillus* spp. strains from the vagina of dairy cows, Pastos y forrajes, Vol. 40, No. 3, pp:192-201.

Levkovich, T., Poutahidis, T., Smillie, C., Varian, B., Ibraim, Y., Lakritz, J., Alm, E. & Erdman S. (2013). Probiotic bacteria induce a 'glow of health', PLoS ONE vol. 8 No. 1 doi:10.1371/doi:10.1371/journal.pone.0053867

López, J., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, J., Medina, E., Martínez, M. & Loeza, P. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos, Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, vol. 39, núm. 3, pp. 49-57.

Lloyd-Price J., Abu-Ali G., Huttenhower C., (2016). The healthy human microbiome. Genome med, vol. 8 pp:1-11.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl D. (2015). Brock biology of microorganisms, 14^o Edición, Illinois, PearsonEducation, pp: 170,171,402-408.

Madry, E., Krasin, B., Drzyrna, S., Sands, D., Lisowska, A., Grebowiec, P., Minarowska, A., Oralewska, B., Mankowski, P. & Moczko, J. (2012). Lactose malabsorption is a risk factor for decreased bone mineral density in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients. European journal of human genetics, Vol. 20, pp: 1092-1095.

Maldonado, C., Aristimuño, C., Mansilla, F., Melián, C., Hébert, E. & Vignolo G. (2018). Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle, Livestock science, Vol. 212, pp: 99-110.

Manichanh, C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, k., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, I., Jarrin, J., Chardon, P., Marteau, P., Roca, J. & Dore J. (2006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. GUT. Vol., 55, pp: 205-211. doi: 10.1136/gut.2005.073817

Marciano, J., De-Sa F., Del-Fiol, F., Marciano, C. & Tardelli F. (2017). Changes in weight and body fat after use of tetracycline and *Lactobacillus gasseri* in rats. Brazilian journal pharmacy science. Vol. 53, No.1.

Margolles, A., Ruas, P.&, C. (2008). Propiedades beneficiosas para la salud relacionadas con la resistencia a sales biliares y con la producción de exopolisacáridos en microorganismos probióticos y bacterias lácticas. **En:** Rodríguez J. ed. microorganismos y salud: bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas. Madrid. Editorial Complutense. cap 8, pp:52- 60.

Marteau, P., Vesa, T. & Rambaud, J. (1997). Lactose maldigestion. **En:** Fuller R. (eds) probiotics 2. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-5860-2_4

- Martín, R., Sánchez, B., Suárez, J. & Urdaci M. (2012). Characterization of the adherence properties of human *Lactobacilli* strains to be used as vaginal probiotics, FEMS microbiology letters, Vol. 328, pp:166-173. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02495.x>
- Matus, V. (2011). Caracterización de la capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas del pulque. [Tesis de licenciatura], Facultad de Química, UNAM. pp:104.
- Maurad, K. & Meriem, K. (2008). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria, Revista grasas y aceites, Vol. 59, No.3. pp: 28-224.
- Medina, E., Espinosa, A., Camacho, L. & Carvajal K. (2014). El uso de probióticos y los beneficios sobre el sistema inmune, REB, Vol. 33, No. 3, pp: 77-85
- Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y. & Hernández, H. (2012). *Lactobacillus plantarum*: an overview with emphasis in biochemical and healthy properties en el libro: *Lactobacillus*: classification, uses and health implications, México D.F., Nova Publishing.
- Melkumyan, A., Priputnevich, A., Ankirskaya, A., Muravéva, A. & Lubasovskaya, L. (2015). Effects of antibiotic treatment on the *Lactobacillus* composition of vaginal microbiota., Bulletin of experimental biology and medicine, Vo. 158, No.6.
- Menconi, A., Kallapura, G., Latorre, J., Morgan, M., Pumford, N., Hargis, B. & Tellez, G. (2014). Identification and characterization of lactic acid bacteria in a commercial probiotic culture. Biosci microbiota food health, 33, pp:25-30.
- Moctezuma, C. & Aguirre, J. (2016). Enfermedades gastrointestinales y hepáticas, Gaceta medica de México, Vol. 152, suppl 1, pp: 74-83.
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M. & Ferrero M. (2012). *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin, Journal of functional foods, Vol. 4, pp: 431-541.
- Montiel, A. (2010). Evaluación *in vitro* de acción de cultivos probióticos (bifidobacteria) sobre cepas de enterobacterias (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter*) nosocomiales con resistencia microbiana. [Tesis de doctorado]. Facultad de ciencias. Universidad de Colombia.
- Morales, Y., Herrera, C., Muñoz, J., (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente, Redalyc, Vol. 38, No. 1.
- Muñoz, E. (2015). Caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas de origen acuático como probióticos para el cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus*). (tesis de doctorado). Facultad de veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Mussaret, B., López, C. & Calva E. (2006). Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. Revista latinoamericana de microbiología. Vol. 48 No. 2 pp: 121-125.

Nannini E. & Casellas M., (2004). Reflexiones y nuevos hallazgos en resistencia a vancomicina, Anuario fundación Dr. J. R. Villavicencio, Vol. 12, pp: 55-60.

O'hara, M. & Shanahan, F. (2007). Gut microbiota: mining for therapeutic potential, Clinical gastroenterology and hepatology vol.5, pp:274 –284.

Ohashi, Y. Umezaki, Y. & Ushida, K. (2004). Transition of the probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract of a pig, International journal of food microbiology, vol.96, pp:61-66.

Ortiz-Basurto, O. (2008). Presence of rhamnogalacturonan II in the juices produced by enzymatic liquefaction of agave pulquero stem (*Agave mapisaga*), Journal of agricultural and food chemistry, vol. 77, pp:870–875.

Paniagua, G., Monroy, E., García-González, O., Alonso, J., Negrete, E. & Vaca, S. (2007). Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in mexican children, annals of clinical microbiology and antimicrobials, 6, (17). <https://doi.org/10.1186/1476-0711-6-17>

Paramithiotis, F. (2017). Lactic acid fermentation of fruits and vegetables: an overview, En: Lactic acid fermentation of fruits and vegetables, editorial CRC Press pp: 5-22.

Parra, M., Durango, J. & Máttar S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*, MVZ-CORDOVA, vol. 7, No. 2, pp:187-200.

Pérez, M., Laurencio, M., Rondón, A., Milian, G., Bocourt, R. & Arteaga F. (2011). Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo, Revista de salud animal Vol. 33, No. 3, pp: 147-153.

Portillo, A., Lantero, M., Zarazaga, M., Gastañares, M., Olarte, I., Undabeitia, E., Ruíz-Larrea, F. & Torres C. (2000). Resistencia a antibióticos macrólidos-lincosamida-estreptograminas y mecanismos implicados en cepas clínicas de *Streptococcus* spp., Zubia monográfico, Vol. 12, pp:11-26.

Prados-bo, A., Gómez-Martínez, S., Nova, E. & Marcos, A. (2015). El papel de los probióticos en el manejo de la obesidad, Nutrición hospitalaria, vol. 31, No. 1, pp: 10-18.

Pundir, R. & Jain P. (2010). Screening for antifungal activity of commercially available chemical food preservatives. International journal of pharmaceutical sciences review and research, vol. 5, No. 2 pp: 25-27.

Ramakrishna, S. (2009). Probiotic-induced changes in the intestinal epithelium: implications in gastrointestinal disease, trop gastroenterol, vol. 30 No. 2 p:76-85.

Restrepo, S., Ramírez, M., López, M. & Varela, L., (2006). Los hábitos alimentarios en el adulto mayor y su relación con los procesos protectores y deteriorantes en salud, Revista chilena de nutrición, Vol. 33, No. 3.

Robledo, A. (2015). Investigación de *Salmonella* spp en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos. [tesis de grado]. Universidad Politécnica de Cataluña. Pp:77.

Rodríguez, J., Sobrino, O., Marcos, A., Collado, M., Pérez-Martínez, M., Martínez-Cuesta, C., Peláez, C., Requena, T. (2013). ¿Existe una relación entre la microbiota intestinal, el consumo de probióticos y la modulación del peso corporal? *Nutrición hospitalaria*, 28 (1).

Rosado, J. (2016). Intolerancia a la lactosa, *gaceta medica de México*. 152 (1), pp:67-73.

Rubio, A., Hernández, C., Aguirre, A. & Poutou, R. (2008). Identificación preliminar *in vitro* de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Rev MVZ Córdoba*, 13 (1), pp: 1157-1169.

Ryu, E. & Chang, H. (2013). *In vitro* study of potentially probiotic LAB strains isolated from kimchi, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: *ann microbiology*, 63, pp:1387-1395.

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. & Bresollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food science and technology*. 50, pp: 1-16.

Saarela, M., Alakomi, H., Puhakka, A. & Matto, J. (2009). Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of *in vitro* analyses of cell physiological functions to predict it., *Appl Microbiol*, Vol.106, pp: 1204-1212.

Salveti, E., Torriani, S. & Felis, G. (2012). The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*. Vol. 4

Sánchez, L., Vichi, J., Llanes, M., Castro, E., Soler, D. & Espinosa, I. (2011). Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus spp.* como candidatos a probióticas. *Revista de Salud Animal*, Vol. 33, No. 3, pp: 154-160.

Savadogo, A., Ouattara, C., Bassole, I. & Traore, S. (2006). Bacteriocins and lactic bacteria- a minireview, *african journal of biotechnology*, Vol. 5, No. 9, pp: 678-683.

Savaiano, D., Ritter, A., Klaenhammer, T., James, G., Longcore, A., Chandler, J., Walker, A. & Foyt, H. (2013). Improving lactose digestion and symptoms of lactose intolerance with a novel galacto-oligosaccharide (RP-G28): a randomized, double-blind clinical trial, *Nutrition journal*, Vol. 12, No. 160

Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, C., McNabb, C., Moughan, J. & Roy C. (2013). The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation*, doi:10.1155/2013/237921

Sierra, M. (2005). El maguey, el pulque y sus deidades, [Tesis de maestría]. Facultad de filosofía y letras, UNAM. Disponible en línea: 132.248.9.195/ptd2014/enero/0707278/0707278.pdf

Singhi, S. & Baranwal, A. (2008). Probiotic use in the critically ill., *Indian journal pediatric*, vol.75 No. 6 pp:621-627.

Silva, A. (2008). Efeito da levofloxacina na microbiota intestinal de pacientes com pneumonia adquirida na comunidade, (Tesis de posgrado). Facultad de medicina de Botucatu UNESP. Pp: 83. Disponible en línea: <<http://cort.as/-Dx6B>>

Steinkrasus (2002). Fermentations in world food processing, comprehensive reviews in food science and food safety, vol. 1. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00004.x>

Su, Y., Chen, X., Liu, N. & Guo, X., (2017). Effect of three lactobacilli with strain-specific activities on the growth performance, faecal microbiota and ileum mucosa proteomies of piglets. *Journal of animal science and biotechnology*, Vol.8, No.52. doi: 10.1186/s40104-017-0183-3

Sylvester (2011). Enfermedad inflamatoria. **En:** Larrosa-Haro A., Vásquez-Garibay E., Nutrición y enfermedades del aparato digestivo en niños, Nestlé nutrition institute workshop Vol 2, Cap 9, pp: 165-208.

Tamang, J. & Kailasapathy, K. (2010). *Fermented foods and beverages of the world*, editorial: CRC Press, pp: 3-41.

Tamariz, H., Cruz, J., Atencia, A., Figueroa, J., Horna, G. & Guerra, H. (2009). Resistencia a clindamicina inducida por eritromicina en *Staphylococcus aureus* aislados de tres hospitales de Lima, Perú., *Acta medica de Perú*, Vol. 26, No.1, pp:12-16.

Terrés, A. & Casas, L. (2002). Enfermedad diarreica e intolerancia a la lactosa en México. *Revista médica IMSS*. Vol 40 No. 4 pp:329-341.

Todorov, S. (2009). Bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* - producción, organización genética y modo de acción. *Brazilian journal of microbiology*. Vol. 40 No. 2 pp:209-221.

Turpin, W., Humblot, C., Noordine, M., Thomas, M. & Guyot, J. (2012) Lactobacillaceae and cell adhesion: genomic and functional screening, *Journal of microbiology*, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038034>

Turrone, F., Serafini, F., Foroni, E., Duranti, S., O'Connell, M., Taverniti, V. & Ventura, M. (2013). Role of sortase-dependent pili of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 in modulating bacterium-host interactions. *proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, Vol.110 No. 27, pp: 1151–1156. doi:10.1073/pnas.1303897110

Tuohy, K., Pinart-Gilberga, M., Jones, M., Hoyles, L., McCartney, A. & Gibson, G. (2007). survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora. *Journal of applied microbiology*. Vol 102, No. 4, pp:1026-1032.

Usman, P., Yusmarini, Y. & Evy, R. (2017). Quality of probiotic fermented milk using *Lactobacillus casei* subsp. *casei* R-68 as a starter with the variation of skim milk and sucrose, *International journal of agricultural technology*, vol. 13, No. 1, pp:37-46.

Valdivia-Anistro, J., Eguiarte-Frutos, E., Delgado-Sapien, G., Márquez-Zacarias, P., Gasca-Pineda, J., Learned, J., Elser, J., Olmedo-Alvarez, G. & Souza, V. (2016). Variability of rRNA

operon copy number and growth rate dynamics of *Bacillus* isolated from an extremely oligotrophic aquatic ecosystem, *Frontiers in microbiology*, Vol. 6, artículo: 1486.

Vanegas, M., González, L., Arévalo, S. & Villanueva, C. (2012). Evaluación del potencial probiótico de cepas *Lactobacillus* colombianas aisladas de leche materna, *Revista alimentos hoy*, Vol 21, No 26, pp; 7-17.

Vasiee, A., Tabatabaei, Y., Mortazavi, A. & Edalatian, M. (2014). Isolation, identification and characterization of probiotic *Lactobacilli* spp. from Tarkhineh, *International food research journal*, Vol. 21 No. 6 pp: 2487-2492.

Vela, E. (2014). El maguey, *Revista Arqueología Mexicana*, Especial 57 [en línea] Editorial Raíces S.A. de C.V. [consultado el 9 de enero de 2018] Disponible en: <<https://arqueologiamexicana.mx/mexico-antiguo/el-mito-del-origen-del-maguey>>

Vila, J., Álvarez-Martínez, F., Buesa, J. & Castillo, J. (2009). Diagnostico microbiológico de las infecciones gastrointestinales, *Enfermedades infecciosas y microbiología*, vol. 27, No. 7, pp: 406-411.

Wacher, C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitaria*, Vol. 15 No. 8 pp:1-14.

Wang, R., Chen, S., Jin, J., Ren, F., Li, Y., Quiao, Z., Wang, Y. & Zhao, L. (2015). Survival of *Lactobacillus casei* strain Shirota in the intestines of healthy Chinese adults, *Microbiol Immunol*, Vol.59 No, 5pp: 268-276.

Wang, L., Guo, M., Gao, Q., Yang, L., Pang, X. & Jiang, X. (2018). The effects of probiotics on total cholesterol: A meta-analysis of randomized controlled trials, *Medicine (Baltimore)*, Vol. 97, No.5. doi: 10.1097/MD.00000000000009679De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K. & Whitman W. (2009) *Bergey's Manual Trust*, USA, Springer pp:465-467.

WHO (2018). Fact Sheets details of *Salmonella* (non-typhoidal), Consultado el 4 de marzo de 2018 en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

Wohlgemuth, S., Loh, G. & Blaut, M. (2010). Recent developments in the investigation of probiotic effects. *revista internacional de microbiología médica*.300, pp: 3-10.

Yamamoto, J., Bosques, F., De-Paula, J., Galiano, M., Ibañez, P., Juliao, F., Kotze, P., Rocha, J., Steinwurz, F., Veitia, G. & Zaltman, C. (2017). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la organización de Crohn y Colitis, *Revista de gastroenterología de México*, Vol. 82, No. 1, pp: 46-84.

Yuki, N., Watanabe, K., Tagami, Y., Takana, R. & Ohwaki, M. (1999). Survival of probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies, *Revista internacional de microbiología de alimentos*, vol. 48, No.1, pp:51-57.

Zhang, Z., Lv, J., Pan, L. & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains, *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 102, pp: 8135-8143.

12. Anexos

Anexo I

Ajuste de concentración de cepas a D.O._{600 nm} 0.2

Se reactivó a las cepas de bacterias ácido lácticas o patógenos (inciso 7.2 y 7.3.1) y a partir de cultivos puros en caldo (APT, BHI o Luria según corresponda) se midió la densidad óptica a 600 nm con el espectrofotómetro UV/visible Ultrospec 2000 (Pharmacia-Biotech), en absorbancias menores de 1, se empleó dicho cultivo y en valores superiores se realizó una dilución 1/10. Se ajustó la concentración de los cultivos partiendo de la densidad óptica (600 nm) registrada mediante el algoritmo siguiente:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \therefore \quad V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

En donde C_1 es la densidad óptica registrada y C_2 es la densidad óptica a la cual desea ser ajustada la concentración (0.2), mientras que V_2 es el volumen de medio de cultivo que se requiere con concentración estandarizada de microorganismo y V_1 es el volumen del cultivo inicial requerido.

Anexos II

I.I Extracción de DNA por kit Microbial DNA Isolation (MOBIO Laboratories, Inc.)

UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit

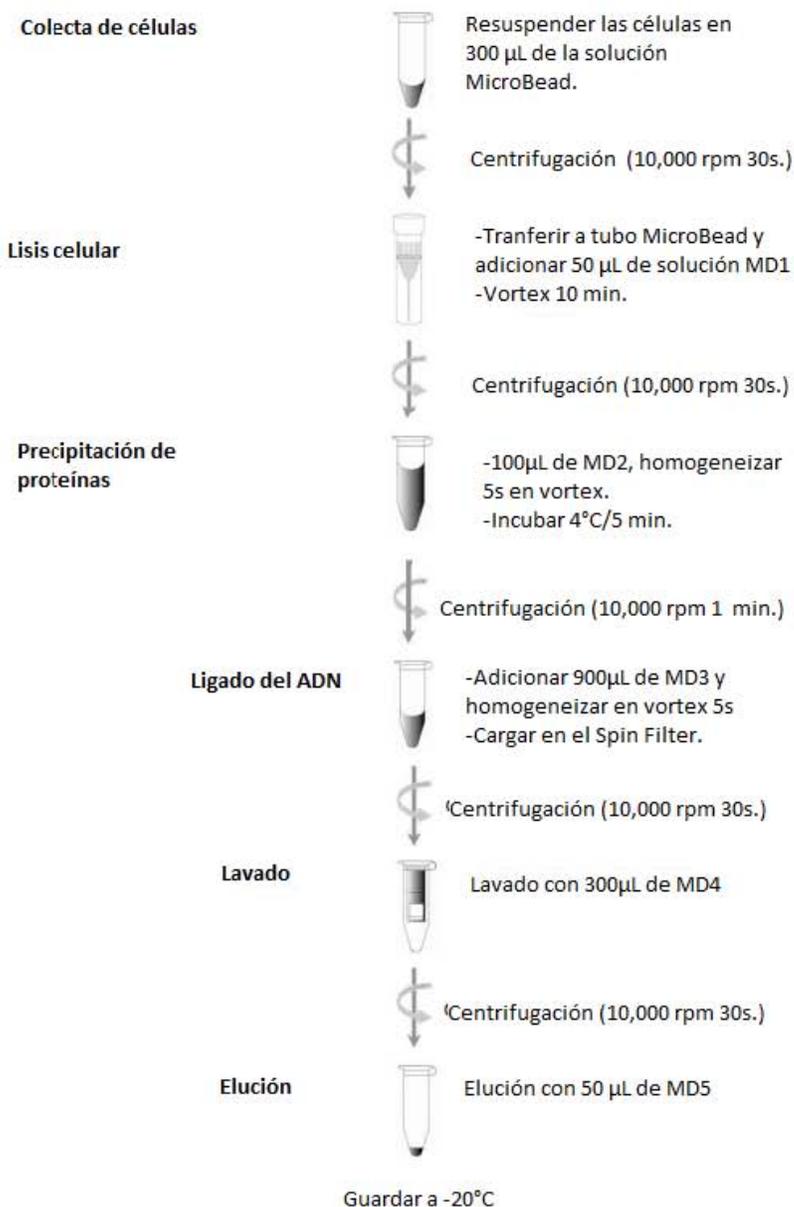


Figura I. Procedimiento empleado para la extracción de ADN de la cepa P46. (Adaptado de: <https://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12224.pdf>) [Fecha de consulta: 28 marzo 2018]

El procedimiento seguido fue acorde a las indicaciones del proveedor MOBIO con excepción de la colecta inicial de células en donde se empleó el doble del volumen sugerido con la finalidad de asegurar la extracción de una cantidad adecuada de ADN.

Tabla I.I Mezclas de reacción para la amplificación del operón ribosomal de la cepa P46.

Componentes	F1 (μL)	F2(μL)	F3(μL)	F4(μL)
buffer	5	5	5	5
MgCl ₂	5	5	5	5
Dntp	1	1	1	1
Fw(1/10)	2.04	2.19	1.36	1.93
Rv (1/10)	2.02	2.13	2.65	2.25
Enzima	1.25	1.25	1.25	1.25
Templado	1	1	1	1
H ₂ O	32.7	32.43	32.74	32.57

El volumen final de todas las mezclas de reacción fue de 50 μL.

Una vez comprobados los productos obtenidos por PCR, se purificaron como se muestra en la Figura II.

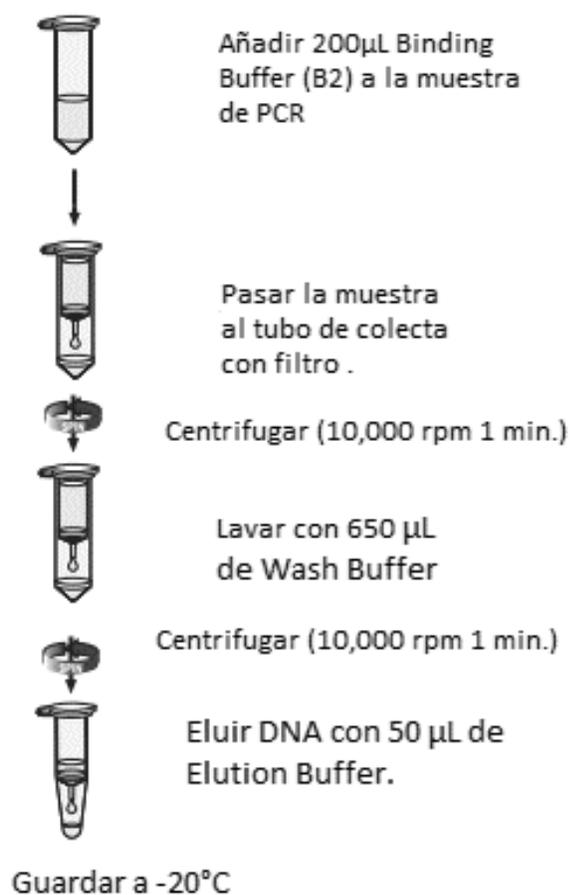


Figura II. Diagrama de purificación de producto de PCR PureLink (Adaptado de: <http://hpc.ilri.cgiar.org/becca/training/IMBB/course/Msds%20reagents/Pure%20link%20kit.pdf>)
Fecha de consulta: 30 marzo 2018]

Anexo III

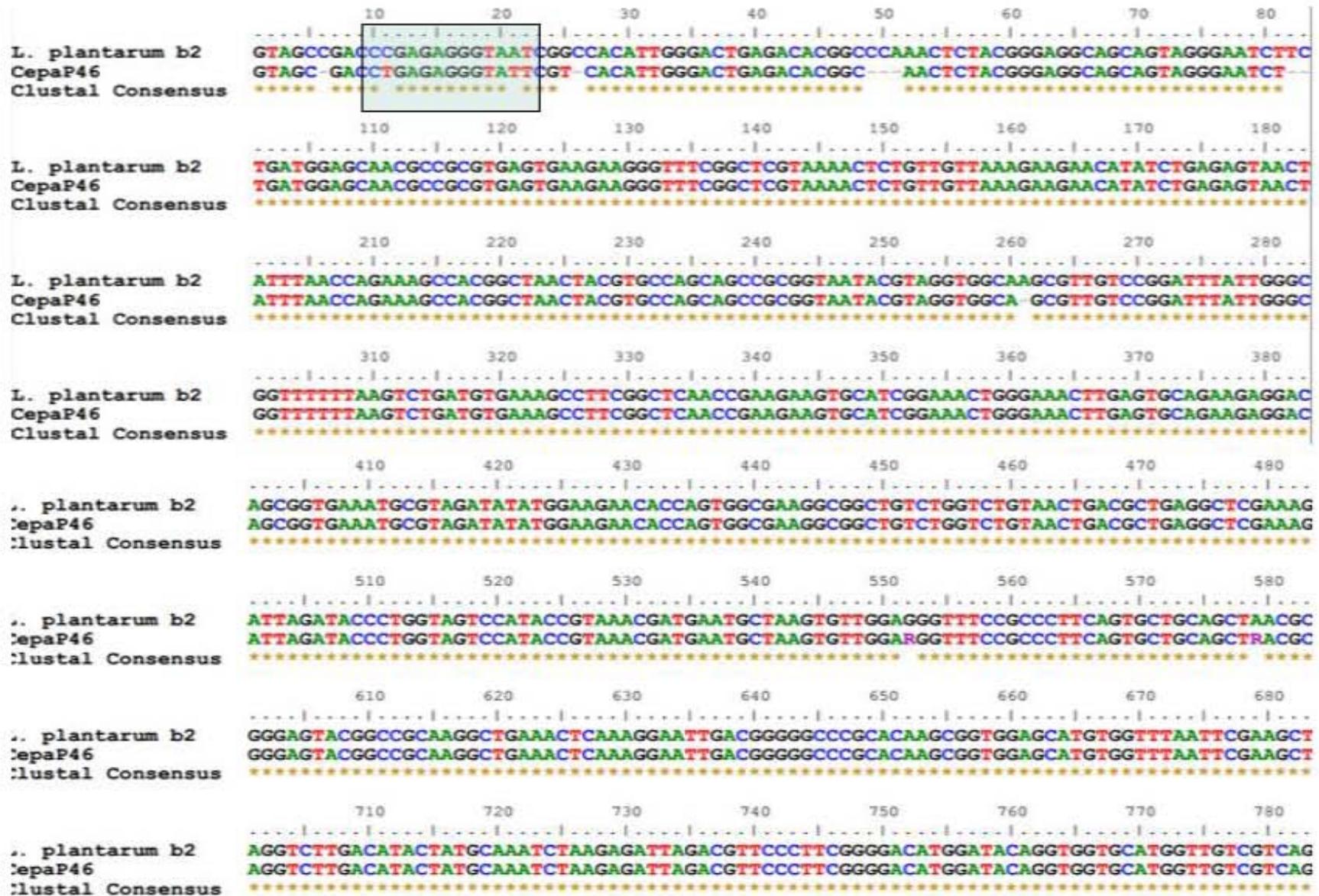


Figura III. Alineamiento de la secuencia del operón ribosomal de *Lactobacillus plantarum* P46.



Figura III. Alineamiento de la secuencia del operón ribosomal de *Lactobacillus plantarum* P46 (continuación).

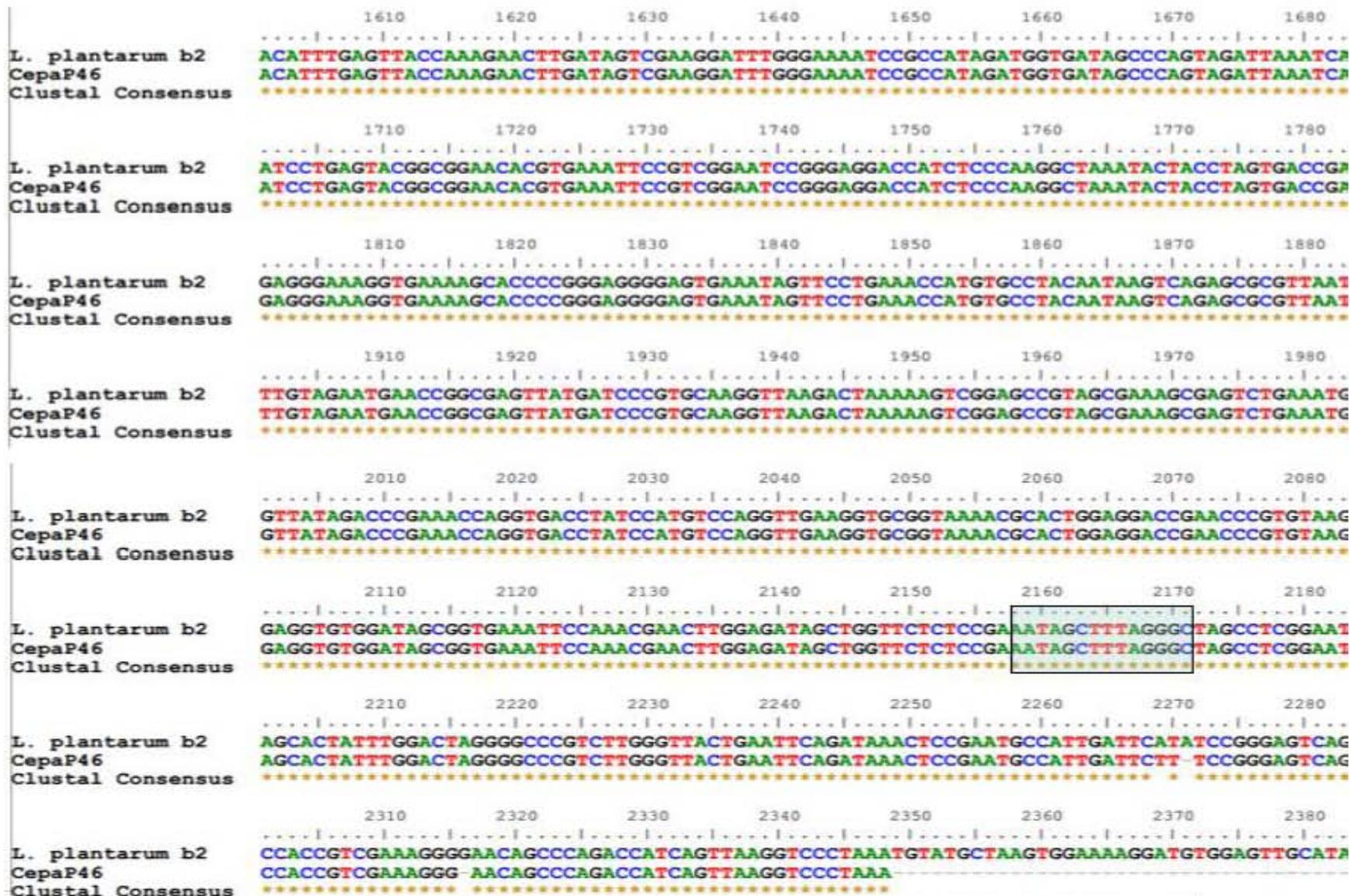


Figura III. Alineamiento de la secuencia del operón ribosomal de *Lactobacillus plantarum* P46 (continuación).

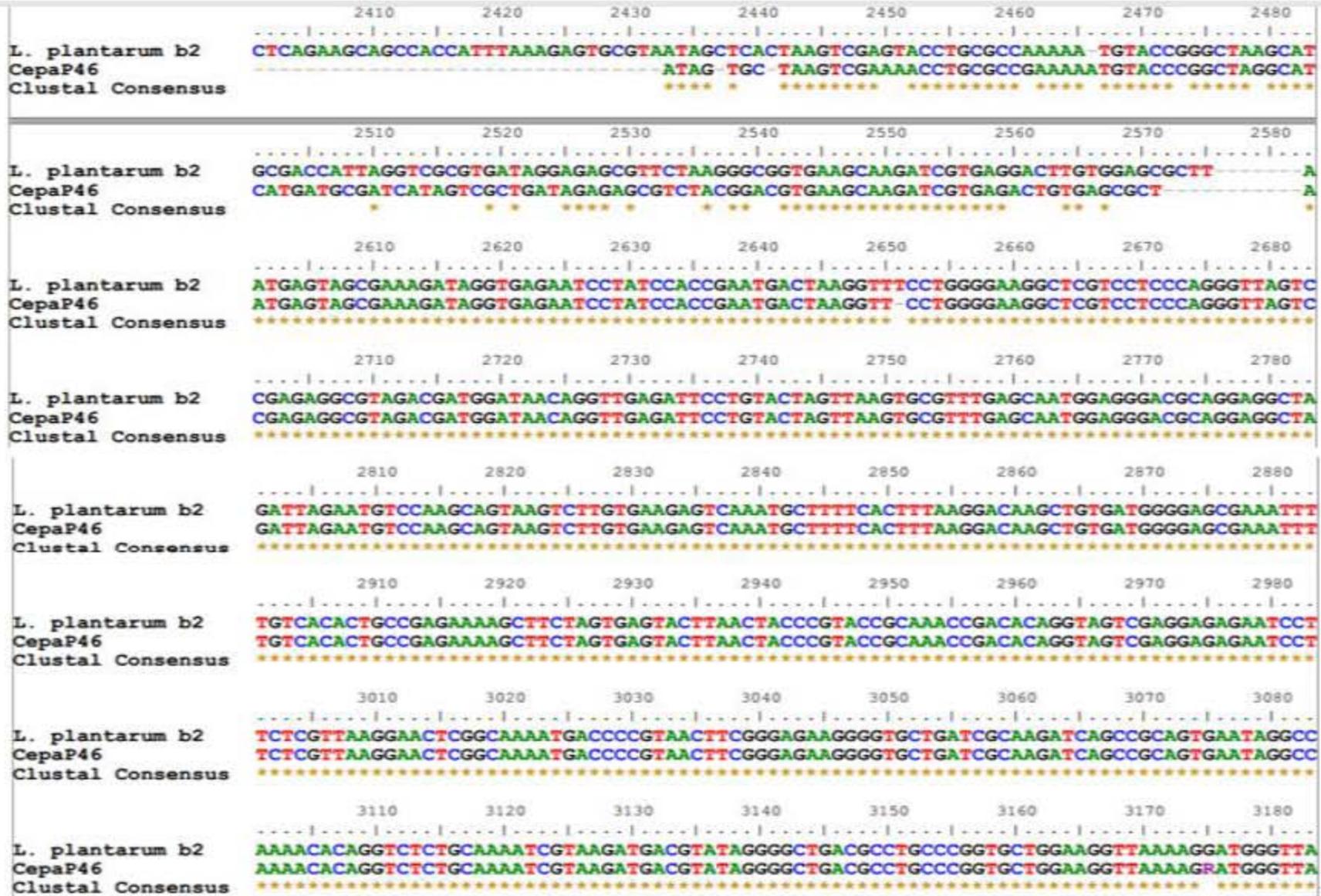
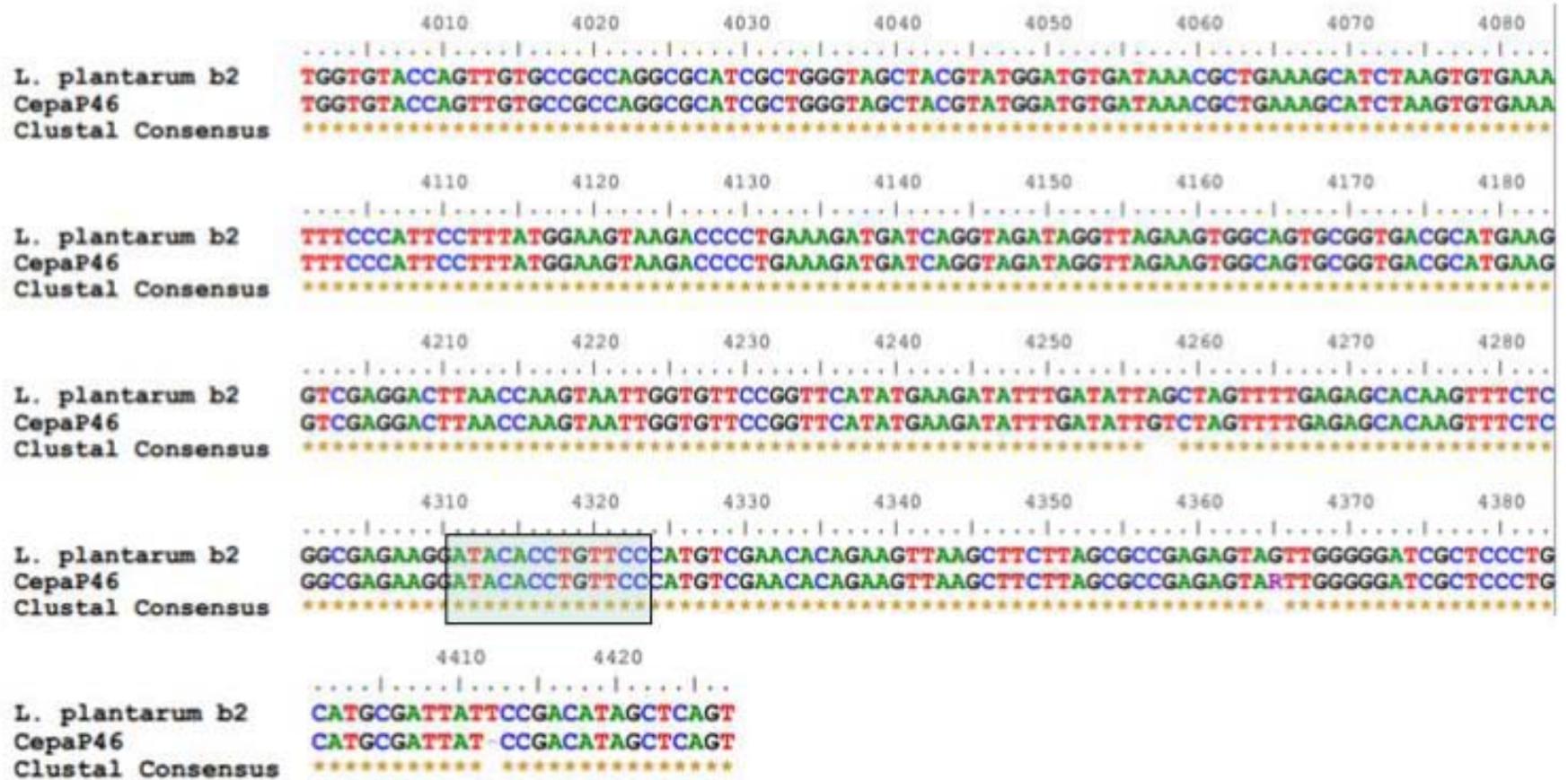


Figura III. Alineamiento de la secuencia del operón ribosomal de *Lactobacillus plantarum* P46 (continuación).



Figura III. Alineamiento de la secuencia del operón ribosomal de *Lactobacillus plantarum* P46 (continuación).



 Señalización de área de unión de primers.

Figura III. Alineamiento de la secuencia del operón ribosomal de *Lactobacillus plantarum* P46 (continuación).

Anexos IV

Análisis estadístico de los ensayos

Para el cálculo de parámetros estadísticos de unidades formadoras de colonias (UFC/mL), los resultados se expresan en logaritmos base 10 para normalizar la distribución.

Cuantificación de crecimiento de *L. brevis* P47 y *L. plantarum* P46 a 28 y 37 °C durante 24 horas.

Tabla A1. Resultados de la cuenta en placa del crecimiento de *L. plantarum* P46 a 28°C.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻⁶	>300	>300						
10 ⁻⁷	2.316	2.334	2.325	0.0131	95%	2	5%	0.018
10 ⁻⁸	1.322	1.398	1.360	0.053	95%	2	5%	0.074
10 ⁻⁹	<30	<30						

Tabla A2. Resultados de la cuenta en placa del crecimiento de *L. plantarum* P46 a 35°C.

Dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻⁶	>300	>300						
10 ⁻⁷	2.425	2.382	2.403	0.030	95%	2	5%	0.042
10 ⁻⁸	1.724	1.690	1.707	0.024	95%	2	5%	0.033
10 ⁻⁹	<30	<30						

Tabla A3. Resultados de la cuenta en placa del crecimiento de *L. brevis* P47 a 28°C.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. b P47 1	L. b P47 2						
10 ⁻⁶	>300	>300						
10 ⁻⁷	2.430	2.427	2.428	0.002	95%	2	5%	0.003
10 ⁻⁸	1.447	1.3424	1.395	0.074	95%	2	5%	0.103
10 ⁻⁹	<30	<30						

Tabla A4. Resultados de la cuenta en placa del crecimiento de *L. brevis* P47 a 35°C.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	Confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻⁶	>300	>300						
10 ⁻⁷	2.384	2.413	2.398	0.021	95%	2	5%	0.029
10 ⁻⁸	1.342	1.362	1.352	0.014	95%	2	5%	0.019
10 ⁻⁹	<30	<30						

Cuantificación del desarrollo de las BAL en condiciones gastrointestinales *in vitro*.

Tabla A5. Cuenta en placa de la concentración D.O._{600nm} 0.2 de *L.plantarum* P46.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	2.316	2.300	2.306	0.014	95%	2	5%	0.019
10 ⁻⁵	1.531	1.505	1.518	0.019	95%	2	5%	0.026
10 ⁻⁶	<30	<30						

Tabla A6. Cuenta en placa de la concentración D.O._{600nm} 0.2 de *L.brevis* P47.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	2.473	2.461	2.467	0.008	95%	2	5%	0.012
10 ⁻⁵	2.086	2.117	2.102	0.022	95%	2	5%	0.030
10 ⁻⁶	<30	<30						

Tabla A7. Supervivencia de *L. plantarum* P46 a medio con pH ácido a 4h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	2.303	2.283	2.293	0.014	95%	2	5%	0.019
10 ⁻⁵	1.568	1.531	1.550	0.026	95%	2	5%	0.036
10 ⁻⁶	<30	<30						

Tabla A8. Supervivencia de *L. plantarum* P46 a medio con pH ácido a 24h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	Confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	2.320	2.332	2.326	0.009	95%	2	5%	0.012
10 ⁻⁵	1.380	1.301	1.340	0.056	95%	2	5%	0.078
10 ⁻⁶	<30	<30						

Tabla A9. Supervivencia de *L. plantarum* P46 a medio con sales biliares a 4h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	Confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	1.929	1.973	1.951	0.031	95%	2	5%	0.043
10 ⁻⁵	<30	<30						

Tabla A10. Supervivencia de *L. plantarum* P46 a medio con sales biliares a 24h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	2.449	2.436	2.442	0.009	95%	2	5%	0.012
10 ⁻⁵	1.568	1.580	1.574	0.008	95%	2	5%	0.011
10 ⁻⁶	<30	<30						

Tabla A11. Supervivencia de *L. brevis* P47 a medio con pH ácido a 4h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. b P47 1	L. b P47 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	2.009	1.987	1.998	0.015	95%	2	5%	0.021
10 ⁻⁵	<30	<30						

Tabla A12. Supervivencia de *L. brevis* P47 a medio con pH ácido a 24h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. b P47 1	L. b P47 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	1.826	1.813	1.820	0.009	95%	2	5%	0.013
10 ⁻⁵	<30	<30						

Tabla A13. Supervivencia de *L. brevis* P47 a medio con sales biliares a 4h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. b P47 1	L. b P47 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	2.009	1.987	1.998	0.015	95%	2	5%	0.021
10 ⁻⁵	<30	<30						

Tabla A14. Supervivencia de *L. brevis* P47 a medio con sales biliares a 24h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. b P47 1	L. b P47 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	2.075	2.146	2.111	0.050	95%	2	5%	0.070
10 ⁻⁵	<30	<30						

Tabla A15. Supervivencia de *L. brevis* P47 a medio con pH ácido y sales biliares a 4h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. b P47 1	L. b P47 2						
10 ⁻⁴	>300	>300						
10 ⁻⁵	2.093	2.196	2.145	0.072	95%	2	5%	0.100
10 ⁻⁶	<30	<30						

Tabla A16. Supervivencia de *L. brevis* P47 a medio con pH ácido y sales biliares a 24h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. b P47 1	L. b P47 2						
10 ⁻³	>300	>300						
10 ⁻⁴	2.606	2.635	2.621	0.020	95%	2	5%	0.028
10 ⁻⁵	1.653	1.431	1.542	0.157	95%	2	5%	0.217

Tabla A17. Supervivencia de *L. plantarum* P46 a medio con pH ácido y sales biliares a 4h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻⁴	>300	>300						
10 ⁻⁵	2.405	2.433	2.421	0.016	95%	2	5%	0.022
10 ⁻⁶	0.903	1.279	1.091	0.266	95%	2	5%	0.368
10 ⁻⁷	<30	<30						

Tabla A18. Supervivencia de *L. plantarum* P46 a medio con pH ácido y sales biliares a 24h de incubación.

dilución	Log ₁₀ (UFC/mL)		X̄	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	L. p P46 1	L. p P46 2						
10 ⁻⁴	>300	>300						
10 ⁻⁵	2.467	2.498	2.482	0.022	95%	2	5%	0.031
10 ⁻⁶	2.104	2.120	2.112	0.012	95%	2	5%	0.016
10 ⁻⁷	<30	<30						

- Curva de crecimiento de *L. plantarum* P46

Tabla A19. Promedio de los resultados del monitoreo de la concentración de la cepa P46 expresada en densidad óptica y UFC/mL respecto al tiempo.

Tiempo de monitoreo	D.O. _{600nm}	Concentración (UFC/mL)
0 h	0.152	16x10 ⁶
2 h	0.183	16x10 ⁶
4 h	0.209	23x10 ⁶
6 h	0.347	83x10 ⁶
8 h	0.927	26x10 ⁷
10 h	1.568	12x10 ⁸
12 h	1.821	30x10 ⁸
24 h	2.237	51x10 ⁸

Tabla A20. Resultados del monitoreo de la concentración de la cepa P46 expresada en densidad óptica respecto al tiempo.

t (h)	D.O. _{600nm} de <i>L. plantarum</i> P46			\bar{X}	desviación std	confianza	tamaño de muestra	α	IC
	1	2	3						
0	0.134	0.162	0.159	0.15	0.015	95%	3	5%	0.017
2	0.168	0.191	0.191	0.18	0.013	95%	3	5%	0.015
4	0.209	0.227	0.192	0.20	0.017	95%	3	5%	0.02
6	0.324	0.361	0.357	0.34	0.020	95%	3	5%	0.023
8	0.832	0.965	0.985	0.92	0.083	95%	3	5%	0.094
10	1.528	1.586	1.59	1.56	0.035	95%	3	5%	0.04
12	1.797	1.831	1.836	1.82	0.021	95%	3	5%	0.024
24	2.239	2.238	2.233	2.23	0.003	95%	3	5%	0.004

Tabla A21. Resultados del monitoreo de la concentración de la cepa P46 expresada en log₁₀ de UFC/mL respecto al tiempo.

t (h)	Log ₁₀ (UFC/mL)			\bar{X}	desviación std	confianza	Tamaño de muestra	α	IC
	1	2	3						
0	7.196	7.196	7.233	7.208	0.021	95%	3	5%	0.024
2	7.225	7.143	7.225	7.198	0.047	95%	3	5%	0.054
4	7.324	6.367	7.371	7.021	0.566	95%	3	5%	0.641
6	7.908	7.944	7.908	7.920	0.021	95%	3	5%	0.023
8	8.342	8.462	8.431	8.412	0.062	95%	3	5%	0.070
10	9.072	9.093	9.072	9.079	0.012	95%	3	5%	0.014
12	9.602	9.477	9.301	9.460	0.151	95%	3	5%	0.171
24	9.724	9.716	9.732	9.724	0.008	95%	3	5%	0.009

Anexo V



Figura I.III. Ensayo de antibiosis por el Sistema ATB STREP 5 empleado en bacterias ácido-lácticas, incubado a 37°C/24 h.

Anexo VI

Resultados generales de la sobrevivencia de *Salmonella* Typhimurium Str^r en los cuatro grupos de ensayo.

Tabla III.1. Resultado conjunto de ensayo en Ratones. UFC/ g de órgano de *S. Typhimurium* Str^r.

Grupo de ensayo	UFC/ g Hígado	DV _{std} Hígado	UFC/ g Bazo	DV _{std} Bazo
Control (PBS)	1x10 ⁶	0.20	5x10 ⁴	0.31
<i>L. mesenteroides</i> P45	3x10 ³	0.29	6x10 ²	0.28
<i>L. plantarum</i> P46	1x10 ⁴	0.11	1x10 ³	0.16
<i>L. casei</i> Shirota	1x10 ⁵	0.14	8x10 ³	0.24

Resultados por ratón de la sobrevivencia de *Salmonella* Typhimurium Str^r en los cuatro grupos de ensayo.

Tabla III.2. *Salmonella* Typhimurium Str^r sobreviviente en hígado de ratones tratados con PBS (grupo control).

Ratón	UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	UFC/ g órgano	Log ₁₀ (UFC/g)	DV _{std}
1	16X10 ⁵	6.38	16x10 ⁵	5.97	0.017
2	16X10 ⁵	6.45	16x10 ⁵	6.02	0.003
3	19X10 ⁵	6.36	19x10 ⁵	6.06	0.019
4	16X10 ⁵	6.28	16x10 ⁵	6.01	0.062
5	12X10 ⁵	6.40	12x10 ⁵	5.97	0.043
6	24X10 ⁵	6.20	15X10 ⁵	6.20	0.014
7	28X10 ⁵	6.21	20X10 ⁵	6.03	0.008
8	22X10 ⁵	6.29	36X10 ⁵	6.16	0.006
9	19X10 ⁵	6.19	16X10 ⁵	6.02	0.027
10	25X10 ⁵	6.08	19X10 ⁵	6.19	0.023

Tabla III.3. *Salmonella* Typhimurium Str^r sobreviviente en bazo de ratones tratados con PBS (grupo control).

Ratón	UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	UFC/ g órgano	Log ₁₀ (UFC/g)	DV _{std}
1	90X10 ³	4.95	92X10 ³	4.96	0.010
2	52X10 ³	4.72	52X10 ³	4.72	0.069
3	96X10 ³	4.98	10X10 ⁴	5.02	0.003
4	85X10 ³	4.93	84X10 ³	4.92	0.090
5	92X10 ³	4.97	91X10 ³	4.95	0.043
6	22X10 ³	4.35	24X10 ³	4.82	0.016
7	27X10 ³	4.43	27X10 ³	4.67	0.006
8	23X10 ³	4.36	24X10 ³	4.79	0.031
9	14X10 ³	4.15	14X10 ³	4.82	0.113
10	23X10 ³	4.36	28X10 ³	4.96	0.017

Tabla III.4. *Salmonella* Typhimurium Str^r sobreviviente en hígado de ratones tratados con *L. mesenteroides* P45.

Ratón	UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	UFC/ g órgano	Log ₁₀ (UFC/g)	DV _{std}
1	19x10 ²	3.29	16 x10 ²	3.02	0.015
2	18 x10 ²	3.25	10 x10 ²	3.50	0.034
3	24 x10 ²	3.38	23 x10 ²	3.92	0.025
4	13 x10 ²	3.11	82 x10 ¹	2.98	0
5	13 x10 ²	3.13	97 x10 ¹	3.20	0.068
6	33 x10 ²	3.53	22 x10 ²	3.35	0.011
7	45 x10 ²	3.65	38 x10 ²	3.58	0.026
8	25 x10 ²	3.39	17 x10 ²	3.23	0.024
9	43 x10 ²	3.76	44 x10 ²	3.64	0.024
10	34 x10 ²	3.52	25 x10 ²	3.40	0.051

Tabla III.5. *Salmonella* Typhimurium Str^r sobreviviente en bazo de ratones tratados con *L. mesenteroides* P45.

Ratón	UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	UFC/ g órgano	Log ₁₀ (UFC/g)	DV _{std}
1	40 x10 ¹	2.60	50x10 ¹	2.70	0.156
2	40 x10 ¹	2.60	39x10 ¹	2.60	0
3	41 x10 ¹	2.62	38 x10 ¹	2.59	0.156
4	35 x10 ¹	2.54	43 x10 ¹	2.63	0.088
5	45 x10 ¹	2.65	45 x10 ¹	2.65	0.068
6	30 x10 ¹	2.48	33 x10 ¹	2.52	0.212
7	11 x10 ²	3.06	13 x10 ²	2.85	0.135
8	20 x10 ¹	2.30	20 x10 ¹	2.28	0
9	15 x10 ²	3.17	16 x10 ²	2.88	0.041
10	25 x10 ¹	2.40	27 x10 ¹	2.43	0.043

Tabla III.6. *Salmonella* Typhimurium Str^r sobreviviente en hígado de ratones tratados con *L. plantarum* P46.

Ratón	UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	UFC/ g órgano	Log ₁₀ (UFC/g)	DV _{std}
1	17x10 ³	4.22	11 x10 ³	4.04	0.022
2	17x10 ³	4.23	10 x10 ³	4.02	0.001
3	16 x10 ³	4.21	11 x10 ³	3.04	0.003
4	18 x10 ³	4.26	12 x10 ³	3.08	0.010
5	14 x10 ³	4.15	86 x10 ²	3.93	0.110
6	17 x10 ³	4.23	17 x10 ³	4.22	0.033
7	24 x10 ³	4.38	18 x10 ³	4.25	0.027
8	17 x10 ³	4.23	12 x10 ³	4.07	0.078
9	11 x10 ³	4.04	83 x10 ²	3.92	0.013
10	19 x10 ³	4.28	11 x10 ³	4.04	0.028

Tabla III.7. *Salmonella* Typhimurium Str^r sobreviviente en bazo de ratones tratados con *L. plantarum* P46.

Ratón	UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	UFC/ g órgano	Log ₁₀ (UFC/g)	DV _{std}
1	85 x10 ¹	2.93	81 x10 ¹	2.91	0.036
2	75x10 ¹	2.87	78x10 ¹	2.89	0.041
3	85 x10 ¹	2.93	81 x10 ¹	2.91	0.036
4	95 x10 ¹	2.97	10 x10 ²	3.02	0.032
5	12 x10 ²	3.09	17 x10 ²	3.23	0.024
6	19 x10 ²	3.27	22 x10 ²	3.34	0.064
7	11 x10 ²	3.06	14 x10 ²	3.13	0.027
8	12 x10 ²	3.08	13 x10 ²	3.12	0.051
9	13 x10 ²	3.11	16 x10 ²	3.20	0.014
10	80 x10 ¹	2.90	93 x10 ¹	2.96	0.157

Tabla III.8. *Salmonella* Typhimurium Str^r sobreviviente en hígado de ratones tratados con *L. casei* Shirota

Ratón	UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	UFC/ g órgano	Log ₁₀ (UFC/g)	DV _{std}
1	17x10 ⁴	5.24	62 x10 ³	4.79	0.017
2	19 x10 ⁴	5.29	91 x10 ³	4.96	0.015
3	14 x10 ⁴	5.13	91 x10 ³	5.16	0.068
4	11 x10 ⁴	5.02	75 x10 ³	4.88	0.029
5	12 x10 ⁴	5.09	95 x10 ³	4.98	0.115
6	15 x10 ⁴	5.19	10 x10 ⁴	4.88	0.006
7	11 x10 ⁴	5.02	76 x10 ³	5.01	0.055
8	14 x10 ⁴	5.16	93 x10 ³	4.97	0.013
9	13 x10 ⁴	5.11	16 x10 ⁴	5.21	0.045

Tabla III.9. *Salmonella* Typhimurium Str^r sobreviviente en bazo de ratones tratados con *L. casei* Shirota

Ratón	UFC/mL	Log ₁₀ (UFC/mL)	UFC/ g órgano	Log ₁₀ (UFC/g)	DV _{std}
1	50 x10 ²	3.70	51 x10 ²	3.71	0
2	70 x10 ²	3.84	78 x10 ²	3.89	0.180
3	11 x10 ³	4.06	12 x10 ³	4.09	0.027
4	65 x10 ²	3.81	60 x10 ²	3.78	0.047
5	66 x10 ²	3.82	65 x10 ²	3.81	0.023
6	13 x10 ³	4.14	85 x10 ²	3.93	0.031
7	75 x10 ²	3.90	80 x10 ²	3.90	0.012
8	64 x10 ²	3.81	20 x10 ²	3.30	0.038
9	61 x10 ²	3.78	80 x10 ²	3.90	0.040

Análisis Estadístico

Para el cálculo de parámetros estadísticos de unidades formadoras de colonias (UFC/mL), los resultados se expresan en logaritmos base 10 para normalizar la distribución.

HÍGADO

Tabla III.10. Resultados de la cuenta en placa de *Salmonella* Typhimurium Str^r sobreviviente en hígado expresada en Log 10 de UFC/ g órgano de los diferentes grupos de ensayo.

Control (PBS)		<i>L. mesenteroides</i> P45		<i>L. plantarum</i> P46		<i>L. casei</i> Shirota	
Lote A	Lote B	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B
5.968	6.174	3.020	3.35	4.044	4.221	4.789	4.985
6.022	6.031	3.472	3.58	4.020	4.250	4.960	4.883
6.056	6.16	2.920	3.23	3.043	4.068	5.167	5.015
6.012	6.02	2.98	3.64	4.081	3.923	4.883	4.973
5.970	6.19	3.20	3.40	3.934	4.039	---	5.218

Tabla III.11. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en hígado de ambos lotes de ensayo del grupo control.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	5	30.028	6.0056	0.0013828		
Columna 2	5	30.575	6.115	0.006803		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0299209	1	0.0299209	7.31044003	0.02691593	5.31765507
Dentro de los grupos	0.0327432	8	0.0040929			
Total	0.0626641	9				

Tabla III.12. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en hígado de ambos lotes de ensayo del grupo tratado con *Leuconostoc mesenteroides* P45

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	5	15.5962737	3.11925473	0.04996168		
Columna 2	5	17.2101743	3.44203486	0.02859551		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.26046753	1	0.26046753	6.63128403	0.03286439	5.31765507
Dentro de los grupos	0.31422877	8	0.0392786			
Total	0.5746963	9				

Tabla III.13. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en hígado de ambos lotes de ensayo del grupo tratado con *Lactobacillus plantarum* P46

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	20.122	4.0244	0.0030313
Columna 2	5	20.501	4.1002	0.0183037

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0143641	1	0.0143641	1.34652918	0.27934093	5.31765507
Dentro de g.	0.08534	8	0.0106675			
Total	0.0997041	9				

Tabla III.14. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en hígado de ambos lotes de ensayo del grupo tratado con *Lactobacillus casei* Shirota.

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	4	19.7996676	4.9499169	0.02571853
Columna 2	4	19.857766	4.96444151	0.00324545

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00042193	1	0.00042193	0.02913472	0.87007884	5.98737761
Dentro de g	0.08689194	6	0.01448199			
Total	0.08731387	7				

BAZO

Tabla III.15. Resultados de la cuenta en placa de *Salmonella* Typhimurium Str^f sobreviviente en bazo expresada en Log 10 de UFC/ g órgano de los diferentes grupos de ensayo.

Control (PBS)		<i>L. mesenteroides</i> P45		<i>L. plantarum</i> P46		<i>L. casei</i> Shirota	
Lote A	Lote B	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B
4.965	4.825	2.698	2.518	2.908	3.349	3.707	3.814
4.720	4.676	2.589	2.856	2.892	3.136	3.895	3.936
5.025	4.797	2.580	2.283	2.908	3.120	4.092	3.905
4.923	4.823	2.635	2.881	3.020	3.200	3.770	3.3363
4.957	4.959	2.653	2.438	3.233	2.968	---	3.904

Tabla III.16. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en bazo de ensayo control.

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	24.59	4.918	0.013602
Columna 2	5	24.08	4.816	0.010135

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.02601	1	0.02601	2.19151536	0.17704331	5.31765507
Dentro de g.	0.094948	8	0.0118685			
Total	0.120958	9				

Tabla III.17. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en bazo de ambos lotes de ensayo del grupo tratado con *Leuconostoc mesenteroides* P45.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	5	13.158	2.631	0.0024		
Columna 2	5	12.980	2.596	0.0696		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.003129	1	0.00313	0.08696	0.7755	5.3176
Dentro de los grupos	0.287887	8	0.03598			
Total	0.291016	9				

Tabla III.18. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en bazo de ambos lotes de ensayo del grupo tratado con *Lactobacillus plantarum* P46.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	5	14.96631	2.9932	0.020806		
Columna 2	5	15.77461	3.1549	0.019027		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.06533	1	0.065334	3.280325	0.10769819	5.31765507
Dentro de los grupos	0.15933	8	0.019917			
Total	0.22467	9				

Tabla III.19. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en bazo de ambos lotes de ensayo del grupo tratado con *Lactobacillus casei* Shiota.

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	4	15.195	3.79875	0.00610		
Columna 2	4	15.08	3.77	0.08394		

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.001653	1	0.001653	0.0367186	0.8543594	5.98737761
Dentro de los grupos	0.270128	6	0.045021			
Total	0.271781	7				