



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LACTOBACILOS DEL
TRACTO DIGESTIVO DEL LECHÓN (*Sus scrofa domesticus*),
SUS BACTERIOCINAS Y SU EFECTO EN LA ACTIVIDAD
ANTIBIÓTICA - UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES 2015**

HÉCTOR ALFREDO SÁNCHEZ SUÁREZ

TUMBES, PERÚ

2016



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO**

TESIS DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LACTOBACILOS DEL
TRACTO DIGESTIVO DEL LECHÓN (*Sus scrofa domesticus*),
SUS BACTERIOCINAS Y SU EFECTO EN LA ACTIVIDAD
ANTIBIÓTICA - UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES 2015**

HÉCTOR ALFREDO SÁNCHEZ SUÁREZ

TUMBES, PERÚ

2016

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Héctor Alfredo Sánchez Suárez, declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mi asesor de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

Héctor Alfredo Sánchez Suárez

ACTA DE SUSTENTACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

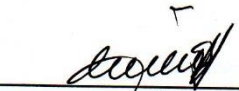
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los veinte días del mes de enero del año dos mil diecisiete, a las 07.00 horas, en SALON DE DOCTOS - ESCUELA DE POSGRADO se reunieron los miembros del Jurado designados con Resolución Directoral N° 0134-2015/UNT-EPG, Dr. NAPOLEON PUÑO LECARNAQUE - Presidente; Dr. JESÚS MERINO VELÁSQUEZ Secretario; Dr. ADAN ALVARADO BERNUY, Dr. DAVID EDILBERTO SALDARRIAGA YACILA y Dr. LEOCADIO MALCA ACUÑA – Miembros; y con Resolución Directoral N° 017-2017/UNT-EPG-D se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis doctoral: IDENTIFICACION MOLECULAR DE LACTOBACILOS DEL TRACTO DIGESTIVO DEL LECHON (*Sus scrofa domesticus*) SUS BACTERIOCINAS Y SU EFECTO EN LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA – UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES - 2015; presentado por el egresado del Programa de Doctorado en Ciencias Ambientales Mg. HECTOR ALFREDO SANCHEZ SUAREZ, asesorado por el Dr. FRANCISCO ALBURQUEQUE VIERA.

Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: APROBADO POR UNANIMIDAD, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 09.15 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 20 de enero de 2017



Dr. NAPOLEON PUÑO LECARNAQUE
Presidente



Dr. JESÚS MERINO VELÁSQUEZ
Secretario



Dr. ADAN ALVARADO BERNUY
Miembro



Dr. DAVID EDILBERTO SALDARRIAGA YACILA
Miembro



Dr. LEOCADIO MALCA ACUÑA
Miembro

C.c. Jurado de Proyecto de Tesis (5), Asesor (1), sustentante (1), UI (2)

RESPONSABLES

HÉCTOR ALFREDO SÁNCHEZ SUÁREZ

EJECUTOR

Dr. FRANCISCO ALBURQUEQUE VIERA

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. NAPOLEÓN PUÑO LECARNAQUÉ

PRESIDENTE

Dr. JESÚS MERINO VELÁSQUEZ

SECRETARIO

Dr. ADÁN ALVARADO BERNUY

MIEMBRO

Dr. DAVID EDILBERTO SALDARRIAGA YACILA

MIEMBRO

Dr. LEOCADIO MALCA ACUÑA

MIEMBRO

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.	x
ABSTRACT.	xi
RESUMO.	xii
1. INTRODUCCIÓN.	13
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.	15
2.1. Antecedentes.	15
2.2. Bases teórico-científicas.	19
2.2.1. Microbiota del tracto intestinal de los animales.	19
2.2.2. Microbiota intestinal del cerdo.	19
2.2.3. Modificación de la microbiota nativa en cerdos.	20
2.2.4. Empleo y contaminación por antibióticos.	21
2.2.5. Microorganismos benéficos.	22
2.2.6. Características de bacterias ácido lácticas (BAL).	22
2.2.7. Actividad antibiótica de microorganismos.	23
2.2.8. Características de las bacteriocinas.	23
2.2.9. Probióticos en cerdos.	24
2.2.10. Efectos adversos provocados por el uso de probióticos.	25
2.2.11. Patógenos en cerdos.	25
2.2.12. Secuenciación de ADN.	26
2.2.13. Técnicas basadas en la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).	27
2.3. Definición de términos básicos.	28
2.3.1. Biotecnología molecular.	28
2.3.2. Aislamiento bacteriano.	28
2.3.3. Proteómica.	28
2.3.4. Probiótico.	28
2.3.5. Bacterias ácido lácticas.	29
2.3.6. Bacteriocinas.	29

	Página
2.3.7. Antagonismo.	29
2.3.8. Halos de inhibición.	29
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	30
3.1. Localidad y periodo de ejecución.	30
3.2. Tipo de estudio y diseño de investigación.	31
3.3. Población, muestra y muestreo.	31
3.3.1. Población.	31
3.3.2. Muestra.	32
3.3.3. Muestreo.	32
3.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.	32
3.4.1. Fase de campo.	32
Toma de muestras para obtención de bacterias nativas.	32
3.4.2. Fase de laboratorio.	33
a. Aislamiento de cepas bacterianas del lechón sano.	33
b. Identificación morfológica de BAL.	34
c. Caracterización bioquímica de BAL.	35
d. Aislamiento e identificación de cepas patógenas.	36
e. Extracción, amplificación, verificación de ADN e identificación molecular mediante secuenciación del gen 16S ARNr.	38
f. Actividad antibiótica de las bacterias según los métodos de inhibición utilizados.	40
g. Pruebas de inhibición bacteriana por el método de enfrentamiento directo.	41
h. Pruebas de inhibición bacteriana por el método de difusión en pocillo con extracto bacteriano. - extracto bacteriano sin neutralizar (acción ácida). - extracto bacteriano neutralizado (acción bactericinas)	42

	Página
i. Extracción de proteínas bacterianas.	43
3.5. Procesamiento y análisis de datos.	47
4. RESULTADOS.	48
4.1. Aislamiento, identificación morfológica y caracterización bioquímica de BAL cultivables asociadas al tracto digestivo de lechón.	48
4.2. Identificación molecular de bacterias cultivables asociada al tracto digestivo de lechón.	50
4.2.1. Identificación molecular de las bacterias BAL.	50
4.2.2. Identificación molecular de bacterias patógenas.	53
4.3. Actividad antimicrobiana de las bacterias según métodos de inhibición utilizados.	54
4.4. Pruebas de antagonismo entre las BAL frente <i>Escherichia fergusonii</i> y <i>Shigella sonnei</i> .	57
4.4.1. Método directo.	57
a. Cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactococcus lactis</i> frente a <i>Escherichia fergusonii</i> .	59
b. Cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactococcus lactis</i> frente a <i>Shigella sonnei</i> .	59
4.4.2. Método de difusión en pocillo.	60
a. Utilizando extracto bacteriano sin neutralizar (acción ácida).	
- Cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactococcus lactis</i> frente a <i>Escherichia</i>	60
- Cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactococcus lactis</i> frente a <i>Shigella sonnei</i> .	62
b. Utilización del extracto bacteriano neutralizado (acción de bacteriocinas).	63

	Página
- Cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactococcus lactis</i> frente a <i>Escherichia</i>	63
- Cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactococcus lactis</i> frente a <i>Shigella sonnei</i> .	65
4.5. Identificación molecular de proteínas obtenidas de las cepas <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactococcus lactis</i> , asociadas al tracto digestivo de lechón, mediante proteómica.	67
5. DISCUSIÓN.	70
6. CONCLUSIONES.	74
7. RECOMENDACIONES.	76
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	77
9. ANEXOS.	92

RESUMEN

Una de las actividades más comunes en la alimentación porcina es el uso de antibióticos como aditivo, dañinos para la salud animal y salud pública. Considerando que los animales van adquiriendo microorganismos de su entorno, los cuales colonizan las diferentes regiones del tracto digestivo, logran ser parte de la flora natural y algunas tienen actividad antibiótica. Con la finalidad de identificar y estudiar la actividad antibacteriana de bacterias ácido lácticas (BAL) del tracto digestivo del *Sus scrofa domesticus* (lechón), se extrajeron muestras mediante laparoscopia, por hisopado del estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon, a las cuales se les realizó la caracterización morfológica y bioquímica según el método agar caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) con azul de anilina (Yimin et al. 2005). Se evaluó el efecto bactericida y antibiótico de las bacteriocinas en patógenos de esta misma especie, mediante pruebas de antagonismo utilizando tres métodos: el directo y de pocillo, para este se usó extracto bacteriano sin neutralizar (acción ácida) y extracto bacteriano neutralizado (acción bacteriocina). Realizando pruebas estadísticas como ANVA ($\alpha = 0,05$) y prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$), se determinó que *Escherichia fergusonii* fue el patógeno más susceptible a ellos. La identificación de la bacteriocina en estudio, se realizó mediante la digestión bacteriana directa y proteómica según la técnica de espectrofotometría de masa por el método de desorción/ionización por láser asistida por la matriz, doble vuelo, con equipo MALDI TOF TOF. Se obtuvieron del tracto digestivo del lechón, nueve BAL identificadas molecularmente según el gen 16S ARNr y *primer* universales, ocho cepas de *Lactobacillus fermentus* y una cepa de *Lactococcus lactis*, a la vez se encontraron *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei* (patógenos en diarrea de varios lechones) utilizadas para realizar las pruebas de antagonismo, donde el extracto bacteriano sin neutralizar de *Lactococcus lactis* frente a *Escherichia fergusonii* produjo los mayores halos de inhibición. Las BAL que se encontraron y se identificaron, fueron consideradas como probióticos, con valor bactericida y antibiótico por segregación de proteínas encontradas llamadas bacteriocinas activas: ornithine monooxygenase del organismo *Bacillus firmus* y RNase J family beta-CASP ribonuclease del *Lactobacillus saerimneri*.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, halos de inhibición, microbiología molecular, bacteriocina

ABSTRACT

One of the most common activities in pig feed is the use of antibiotics in food, harmful to animal health and public health. Considering that the animals are acquiring microorganisms of their surroundings, which colonize the different regions of the digestive tract, they become part of the natural flora and some have antibiotic activity. In order to identify and study the antibacterial activity of lactic acid bacteria (BAL) in the digestive tract of the *Sus scrofa domesticus* (suckling pig), samples were extracted by laparoscopy, by swab of the stomach, duodenum, jejunum, ileum, Which were submitted to morphological and biochemical characterization according to the Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar method with aniline blue (Yimin et al. 2005). The bactericidal and antibiotic effect of bacteriocins in pathogens of the same species was evaluated by antagonistic tests using three methods, the direct one, of well using neutralized bacterial extract (acid action) and neutralized bacterial extract (bacteriocin action), Performing statistical tests such as ANVA ($\alpha = 0.05$) and Duncan's test ($\alpha = 0.05$), where it was determined that *Escherichia fergusonii* was the most susceptible pathogen to them. The identification of the bacteriocin under study was performed by direct bacterial digestion and proteomics according to the mass spectrophotometry technique by the matrix assisted laser desorption / ionization, double flight, with MALDI TOF TOF equipment. Nine molecularly identified BALs according to the 16S rRNA and first universal gene, eight strains of *Lactobacillus fermentus* and one strain of *Lactococcus lactis* were obtained from the digestive tract of the piglet, while *Escherichia fergusonii* and *Shigella sonnei* (pathogens in diarrhea of several piglets) Used to perform the inhibition tests, where the unnatural bacterial extract of *Lactococcus lactis* against *Escherichia fergusonii* produced the major inhibition halos. BALs that were found and identified are considered as probiotics, with bactericidal and antibiotic value by segregation of proteins found called active bacteriocins: ornithine monooxygenase from *Bacillus firmus* and RNase J family beta-CASP ribonuclease from *Lactobacillus saerimneri*.

Key words: Bacteria, lactic acid, inhibition halos, molecular microbiology, bacteriocin.

RESUMO

Uma das atividades mais comuns na alimentação de suínos é o uso de antibióticos em alimentos, prejudiciais à saúde animal e saúde pública. Considerando que os animais são adquiridos microrganismos em seu ambiente, que colonizam diferentes regiões do trato digestivo, eles conseguem fazer parte da flora natural e alguns têm actividade antibiótica. A fim de identificar e estudar a actividade anti-bacteriana das bactérias do ácido láctico (BAL) do tracto digestivo de *Sus scrofa domesticus* (sugador), as amostras foram removidas por laparoscopia limpando o estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e no cólon, a o qual foi submetido ao método de caracterização morfológica e bioquímica de acordo com o Homem caldo de agar, Rogosa e Sharpe (MRS) anilina azul (Yimin et al., 2005). as bacteriocinas bactericidas e antibióticos em patógenos da mesma espécie foi avaliada por testes de antagonismo utilizando três métodos: directa e bem, para este extracto bacteriano foi usada (acção ácido) não neutralizada e neutralizada extracto bacteriano (acção bacteriocina). Realização de testes estatísticos e análise de variância ($\alpha = 0,05$) e o teste de Duncan ($\alpha = 0,05$), onde foi determinado que a *Escherichia fergusonii* foi o patógeno mais susceptíveis a elas. Identificando o estudo bacteriocina foi realizada por digestão directa bacteriana e proteómica de acordo com a técnica de espectrometria de massa pelo modo de matriz de dessoro / ionização a laser assistida, voo dupla, com o equipamento de MALDI TOF TOF. foram obtidos a partir do tracto digestivo do porco, nove BAL identificado molecularmente acordo gene 16S rRNA e primeiros universais, oito estirpes de *Lactobacillus fermentus* e *Lactococcus lactis*, enquanto *Escherichia fergusonii* e *Shigella sonnei* encontrado (patógenos em diarreia de várias leitões) utilizado para testes de inibição em que o extracto bacteriana de *Lactococcus lactis* não neutralizado contra *Escherichia fergusonii* produzidos os halos de inibição maiores. LABs encontrados e identificados, são considerados como probióticos, valor bactericida e bacteriocinas segregação antibióticas denominadas proteínas activas encontradas: Bacillus firmus ornitina corpo mono-oxigenase e da família de RNase J beta-CASP ribonuclease Lactobacillus saerimneri.

Palavras-chave: bactérias, ácido láctico, halos de inibição, microbiologia molecular, bacteriocina

1. INTRODUCCIÓN.

La demanda de carne como fuente proteica crece conforme se incrementa la población, donde la cría intensiva de cerdos es una alternativa para obtener proteína animal; la fase de lechón es la etapa más crítica en este proceso productivo por lo que se emplean antibióticos y otros compuestos sintéticos como promotores de crecimiento, sustancias que aumentan el riesgo sanitario contaminante, también aumentan los costos de producción (Cadillo 2008, Del Coco 2015 y Zapata et al. 2009).

La mayoría de los promotores de crecimiento utilizados perjudican la salud animal, siendo los más comunes aquellos que contienen antibióticos, que fueron retirados para su uso de la UE desde enero de 2006, ya que reducen la población microbiana intestinal y generan la resistencia a los antibióticos (Jurado-Gómez, Ramírez y Martínez 2013, Pluske 2013, Bhandari et al. 2010 y Metzler-Zebeli et al. 2010).

Existen microorganismos que producen proteínas extracelulares que son utilizadas como alternativas potenciales para mejorar el desempeño y la salud de los cerdos, debido al efecto bactericida que poseen, eficiencia del uso de alimento y los cuales pueden ser utilizados como probiótico con efecto antibiótico (Meng et al. 2010, Rebolledo 2014, Macouzet 2014 y García et al. 2012).

La mayoría de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) del género *Lactobacillus*, producen sustancias extracelulares, utilizadas para mejorar la eficiencia productiva del lechón y que pueden sustituir a los antibióticos en la producción de cerdos (Leroy y De Vuyst 2004, Kumar et al. 2014, Cueto-Vigil, Acuña-Monsalve y Valenzuela-Riaño 2010 y Kim et al. 2012) actuando contra patógenos gracias al ácido láctico y compuestos proteicos generados por ellas (Metzler-Zebeli et al. 2010), siendo atractivos en un mundo en el que la resistencia a los antimicrobianos constituye un problema global de gran relevancia para la salud pública (Del Coco 2015 y Zapata et al. 2009).

A fin de solucionar la problemática formulada, se planteó la siguiente hipótesis: es posible la identificación y caracterización de BAL aisladas del tracto digestivo del lechón así como sus bacteriocinas y la determinación de la acción antimicrobiana frente a patógenos del lechón. En este contexto para los objetivos de la investigación se realizaron aislamientos, caracterización bioquímica e identificación molecular de Lactobacilos extraídos de diferentes regiones del tracto digestivo del lechón, así como también se determinó la actividad antimicrobiana de bacteriocinas, mediante pruebas de antagonismo para el control de patógenos como *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*.

2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.

2.1. Antecedentes.

Los sustratos en los cuales se han aislado bacterias ácido lácticas (BAL) con actividad antibiótica son variados: excretas de neonatos alimentados con leche materna, alimentos fermentados, intestinos de animales, donde se conoce que los animales tienen como hospederos naturales a microorganismos propios, los cuales producen unas sustancias llamadas, bacteriocinas, con acción antibiótica que forman barreras antimicrobianas y ayudan a reducir los niveles de microorganismos patógenos (Amado et al. 2012, López-Álvarez 1976, Gatti 2013, García et al. 2012 y Guerra et al. 2007).

La mayoría de microorganismos benéficos del tracto digestivo producen ácidos orgánicos, estos y sus sales han recibido mucha atención como alternativas potenciales para mejorar el desempeño y la salud de cerdos, esto es debido al efecto bactericida y eficiencia de uso en el estómago, regulando el pH gástrico (Metzler-Zebeli et al. 2010), en los lechones recién nacidos se encuentran *Lactobacillus rhamnosus* y *L. acidophilus* como los más frecuentes (Kumar et al. 2014).

La población más importante pertenece a las bacterias Gram positivas anaerobias productoras de ácido láctico (BAL), controlan la colonización de las bacterias patógenas (Looft et al. 2014, Collado y Sanz 2007, Deusch et al. 2015 y Lamendela et al. 2011), crecen en varios sustratos y a diversas condiciones biológicas, pertenecen a los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Agudelo 2014).

Las BAL, por su actividad antibiótica han sido caracterizadas como probióticas y son consideradas generalmente como no dañinos (Leroy y De Vuyst 2004 y García et al. 2012), no forman esporas, no tienen motilidad y

son carentes de catalasa, son cocos o bacilos de longitud variable de 0,5 a 0,8 μm . Son anaeróbicos facultativos y catalasa negativa, degradan la glucosa en ácido láctico (Parra 2010) generan halo de inhibición que determinan las características de resistencia específica para ser usado como probiótico (Klose et al. 2010 y Venegas et al. 2012).

Existen sustancias producidas por bacterias que frenan el crecimiento de organismos patógenos en el tracto gastrointestinal, funcionan como probiótico, antibiótico, previenen y tratan enfermedades infecciosas y no producen efectos adversos de ningún tipo (Jurado-Gómez, Ramírez and Martínez 2013, Macouzet 2014, García et al. 2012 y Jiménez 2010), son llamados bacteriocinas, sustancias eficaces en el control de diversos microorganismos así como de los extractos y metabolitos producidos por ellas y han tenido exitosa aplicación en los alimentos (Vásquez et al. 2009) tienen especificidad natural por el hospedero (Bhandari et al. 2010 y Klose et al. 2010) y la alimentación (Pedersen et al. 2005).

La eficacia antimicrobiana de las bacteriocinas de BAL resultan atractivos para el reemplazo de antibióticos (Karpinski y Szkaaradkiewicz 2015, Del Coco 2015 y Zapata et al. 2009), el estudio de estas las harán cada vez más efectivas y más específicas en cuanto a los beneficios en la producción animal (Macouzet 2014).

En los reportes para cerdos indican que la suplementación con *Lactobacillus sobrius* mejora la producción (Konstantinov et al. 2006), alimentados con una mezcla de probióticos de *Bacillus subtilis* y endoesporas de *Clostridium butyricum*, mostraron una mayor digestibilidad (Meng et al. 2010 y Rebolledo 2014), siendo más eficientes en cerdos jóvenes ya que controlan problemas digestivos (Metzler-Zebeli et al. 2010, Blajman et al. 2015 y Pluske 2013).

En lechones se comprobó que el *Lactobacillus rhamnosus* controló la diarrea provocada por *Escherichia coli* en lechones destetados, así como la suplementación con *B. licheniformis* y *B. subtilis* mejoró el peso de los

lechones durante el periodo de amamantamiento (Guerra et al. 2007, Guerra et al. 2005).

La alimentación con la inclusión de *Enterococcus faecium* y con una dieta baja en proteínas del 17%, aumentó el rendimiento de los cerdos destetados (Mallo et al. 2010), así el uso del *Lactobacillus fermentum* en pollos como aditivo mostró buenos resultados (Reque et al. 2000), utilizando *Bacillus subtilis* CH16 de origen intestinal en el engorde se obtuvo un mejor incremento de peso (Nguyen et al. 2015).

Se ha comprobado queEl *Lactobacillus saerimneri* y *L. ruminis* tienen actividad inhibidora, son especies indígenas, en humanos sugieren el uso potencial de estas dos cepas como candidatos inmunoprobóticos (Taweechoatipatr et al. 2009), también *Lactobacillus* y *Pediococcus* aislados del calostro del cerdo pueden mostrar resultados como probiótico (Vélez 2014).

Existen exudados no ácidos, que son considerados como proteínas con acción bactericida (Rogne et al. 2007, Mora et al. 2011 y Newman et al. 2011), encontradas en organismos como *Bacillus firmus*, y *Lactobacillus saerimneri* llamadas bacteriocinas, las cuales fueron identificadas molecularmente y son de gran interés en la industria de producción de alimento reportadas por (Zohra et al. 2016, Torres 2002, García et al. 2012 y NCBI 2015).

Ornithine monooxygenase actúa como Sideróforo A (SidA), es una monooxigenasa dependiente de flavina en la biosíntesis de sideróforos, que posteriormente generan quelantes de hierro y limitan el uso de estos metales en la alimentación de la *Escherichia* produciendo la muerte de la bacteria, interviene en el metabolismo al condicionar varios metales sobre la actividad enzimática y aumenta en presencia de Ca^{2+} , K^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} , es utilizado por su efecto fungicida, larvicida (Zohra et al. 2016, Geng et al. 2016, Cechova et al. 2013, Xiong 2015, Lusiasuti, Sumiati y Hadie 2013, Romero et al. 2012 y Shirey et al. 2013).

RNase J family beta-CASP ribonuclease actúa como proteasa específica que causa destrucción celular de patógenos por su acción antibiótica, donde la acción de los iones magnesio indican resultados de la mutagénesis, también se ha reportado en presencia dos iones catalíticos de zinc, con capacidad para catalizar la degradación endo y exo-ribonucleolítica. (Destrucción enzimática de material genético) (Monrroy et al. 2009, Xue-Yuan et al. 2015, Newman et al. 2011 y Pedersen 2005).

2.2. Bases teórico-científicas.

2.2.1. Microbiota del tracto intestinal de los animales.

Kurzak et al. (1998), Pieper et al. (2006) y Mallo et al. (2010), observaron que en pollos, en las zonas del intestino y del ciego, la especie dominante es *Lactobacillus salivarius*, en cambio, en los patos predominan cinco géneros diferentes: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Weissella*. En terneros criados en condiciones artificiales, se pueden encontrar *Pediococcus acidilactis*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. En los corderos jóvenes, el intestino es colonizado por los microorganismos que existen en el ambiente.

Nguyen et al. (2015) y Acero y Gómez (2011), manifiestan que la composición microbiana es diferente en cada especie animal. Varía en especie y número, en las diferentes zonas del tubo digestivo; en la región del duodeno se encuentra el menor contenido de unidades formadoras de colonias por gramo (U.F.C./g), le sigue el yeyuno, el estómago y las de mayor contenido son el íleon, el ciego y el recto.

Monrroy et al. (2009), reportan que existen microorganismos no patógenos, que producen antibióticos (bacteriocinas), ácidos orgánicos (acético, fórmico y láctico) y enzimas digestivas que impiden la adherencia de bacterias entero-patógenos al intestino.

2.2.2. Microbiota intestinal del cerdo.

Konstantinov et al. (2006), Deusch et al. (2015) y Lamendela et al. (2011), refieren que en el caso de los lechones se destaca una flora subdominante compuesta por *Enterobacterias*, *Eenterococos*, *Escherichia coli*, gérmenes oportunistas y microorganismos

fluctuantes con poder patógeno potencial constituidos por *Clostridium sp.*, *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *Pseudomonas sp.*

Looft et al. (2014), Deusch et al. (2015), Collado y Sanz (2007) y Lamendela et al. (2011), reportan que la microbiota natural del intestino ejerce una gran influencia sobre el hospedero. Se han aislado los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* de las partes proximales del intestino y a medida que se avanza en el sistema gastrointestinal van apareciendo otros géneros como *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Selenomonas*, *Clostridium*, *Butirovibrio* y *Escherichia*.

Deusch et al. (2015), señalan que las técnicas modernas y clásicas pueden encontrar BAL capaces de controlar la colonización de las bacterias patógenas.

2.2.3. Modificación de la microbiota nativa en cerdos.

Hong et al. (2011) y Kumar et al. (2014), mencionan que la microbiota nativa favorece a la salud, es influida por un gran número de factores del huésped como son: pH, secreciones, sales, enzimas, fisiología, propiedades microbianas como la adhesión, motilidad, resistencia, tiempo de generación y otros requisitos nutricionales; existiendo un equilibrio (eubiosis) entre los componentes vivos y los abióticos, las interacciones microbiana (sinérgicas o antagónicas), la dieta, ambiente, el estrés que modifica el equilibrio homeostático y facilita el desarrollo de los patógenos especialmente en individuos de crianza intensiva.

Estrada et al. (2005), concluyeron que en casos de disbiosis (desequilibrio), los microorganismos patógenos como *Candida sp.* y *Clostridium sp.*, empiezan a colonizar hasta el punto de causar daños al huésped, tolerados en bajas concentraciones donde las bacterias benéficas empiezan a disminuir.

2.2.4. Empleo y contaminación por antibióticos.

Bavera et al. (2002), Carro y Ranillas (2002), Borrueal (2007) y Gatti (2013), refieren que el empleo de los antibióticos aumenta la ganancia de peso y eficiencia de conversión, se agregan al alimento para minimizar las infecciones bacterianas secundarias y el control de abscesos hepáticos, comunes en engorde a corral. Los antibióticos como: clortetraciclina, oxitetraciclina, bacitracina y tilosina, bacitracina metil disalicilato y la colistina, son utilizados para promover el crecimiento y para la prevención de enfermedades en pollos de engorda y en cerdos.

Torres (2002), García et al. (2012), Martínez (2010), SENASA (2015) y Caja et al. (2003), mencionan que los antibióticos como promotores de crecimiento se emplean en dosis subterapéuticas durante largos períodos de la vida del animal.

Según la Federación Europea para la Salud Animal es utilizada el 6% de antibióticos como promotor de crecimiento que producen una ganancia de peso estimada alrededor del 5% (Carro y Ranilla 2002).

Martínez (2010) y Caja et al. (2003), básicamente dicen que los antibióticos como promotores, actúan modificando cuantitativa y cualitativamente la flora microbiana intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas. Actúan también reduciendo la flora normal que compete con el huésped por los nutrientes. Todo ello conduce a una mejora en la productividad, reduce la mortalidad de los animales pero los residuos son eliminados al medio.

Pluske (2013), menciona que los promotores de crecimiento a base de fármacos, ZnO y CuSO₄, nucleótidos y glutamina, tienen ventajas y desventajas, también acción microbicida sobre la flora microbiana.

intestinal benéfica; produciendo metales pesados, los nucleótidos y glutamina, de reciente investigación, tienen costos elevados.

FAO (2006) y Steven (1998), refieren que la resistencia bacteriana sigue al uso de antibióticos y que estos últimos son los que seleccionan los microorganismos resistentes y probablemente les permiten sobrevivir.

2.2.5. Microorganismos benéficos.

Steven (1998), Leroy y De Vuyst (2004), Agudelo (2014), Parra (2010), Meng et al. (2010) y Rebolledo (2014), coinciden en reportar que las bacterias ácido lácticas mejoran el balance microbiano intestinal y son utilizados como probióticos, las más comúnmente utilizadas son *Lactobacillus*, *Streptococcus* y levaduras.

2.2.6. Características de bacterias ácido lácticas (BAL).

Guerra et al. (2007), Samaniego y Sosa (2000), Kim et al. (2012), Kurzak et al. (1998), Isakow et al. (2007) y Champagne et al. (2005), refieren, que las BAL son grupos de cepas que pueden ser autóctonas o alóctonas, cada una tiene características particulares y con diferente potencial beneficioso para la salud, los géneros más relevantes son: *Streptococcus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus sp.* y *Bifidobacterium sp.*

Samaniego y Sosa (2000), Rebolledo (2014) y Guerra et al. (2007), mencionan que se encuentran otros géneros como *Enterococcus* y *Saccharomyces* pero la respuesta a la dosis suministrada aún no está claramente definida.

Agudelo (2014) y Parra (2010), indican que estas bacterias viven en lugares restringidos, divididos por la utilización de la energía obtenida a partir del metabolismo de azúcares.

Gupta y Garg (2009) y Yao et al. (2011), reportan que las cepas bacterianas comerciales *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus johnsonii* NCC533 y *Lactobacillus rhamnosus* GG (descubierta en 1985), tienen excelente capacidad de adhesión y son usadas tradicionalmente en la fermentación de productos lácteos, calificada de óptima para su uso como cepa probiótica.

2.2.7. Actividad antibiótica de microorganismos.

Looft et al. (2014), García et al. (2012), Collado y Sanz (2007) y Yao et al. (2011), manifiestan que los microorganismos beneficiosos son amistosos o beneficiosos y viables para permanecer en el tracto digestivo.

Jiménez (2010), Macouzet (2014) y Gardiner et al. (2004), existen microorganismos llamados BAL con capacidad de impedir que los microorganismos patógenos (*Salmonella* y *Escherichia coli*) colonicen el tracto digestivo de cerdos.

Existen microorganismos que producen sustancias extracelulares que mejoran el desempeño y la salud de cerdos, debido al efecto bactericida que poseen, los cuales pueden ser utilizados como probiótico con efecto antibiótico (Mora et al. 2011, Monrroy et al. 2009, Macouzet 2014, Newman et al. 2011 y García et al. 2012).

2.2.8. Características de las bacteriocinas.

Gatti (2013) y Rodríguez (2011), mencionan que las bacteriocinas se utilizan para excluir patógenos, mejorar la digestibilidad e incrementar la actividad inmunológica de muchas especies animales y son ampliamente utilizadas en la cría de cerdos, aves y organismos acuáticos.

Amado et al. (2012), Torres (2002), Gatti (2013), Rodríguez (2011) y Bravo et al. (2009), refieren que las bacteriocinas son sustancias producidas por bacterias probióticas (inhibidores sintetizados por las cepas) que tienen efecto benéficos alternativos para contrarrestar el uso de químicos y antibióticos en la alimentación. Pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos, con diferentes espectros de inhibición.

Karpinski y Szkaaradkiewicz (2015) y Casaburi et al. (2016), mencionan que un probiótico con bacteriocina debe reunir las siguientes características: las cepas utilizadas en los probiótico deben tener propiedades bioterapéuticas, no ser patógenas, no ir asociadas con enfermedades infecciosa y/o trastornos gastrointestinales, producir componentes antimicrobianos, prevenir y tratar enfermedades infecciosas, poseen efectos antimicrobianos.

Casaburi et al. (2016), consideran que las bacteriocinas tienen acción contra infecciones ocasionadas por bacterias entero-patógenas como *Clostridium sp.*, *Salmonella sp.* y *Candida albicans*, los cuales, provocan desórdenes y alteraciones en el tránsito intestinal.

2.2.9. Probióticos en cerdos.

Macouzet (2014), menciona que son las cepas BAL las que alteran favorablemente la flora bacteriana, la mayoría de probióticos comerciales tiene muy baja o una nula eficiencia en el aumento de la producción animal, considerando que estos probióticos adquiridos proceden de otras regiones geográficas o incluso de otras especies de animales.

De Lange et al. (2010), Kim et al. (2012), Oliveira y Gonzáles (2007), García et al. (2012) y Hong et al. (2011), refieren que actualmente se busca aislar probióticos de una especie determinada, e introducirlo a la misma especie, usándolos como suplemento alimenticio.

Alternativa terapéutica no farmacológica para el manejo de cuadros de diarrea en cerdos en lactación y destete, lo que mejora su salud gastrointestinal con actividad inmune moduladora, protección de enterocitos de la acción de entero-patógenos.

Macouzet (2014), indica que la inclusión de una serie de cultivos vivos de una o varias especies microbianas, llamados probióticos, la mayoría pertenecen a especies *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, aunque también se utilizan levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y hongos, provocan efectos beneficiosos modificando la población microbiana de su tracto digestivo

2.2.10. Efectos adversos provocados por el uso de probióticos.

García et al. (2012) reportan que el uso de dosis 10 veces superiores a las recomendadas y comprobada en estudios histológicos, hematológicos, química sanguínea, peso de órganos y el resto de análisis sanitarios, realizados en animales, demuestran que no hay reacciones adversas. Pruebas clínicas en humanos, a largo plazo, indican que el consumo de probiótico en la dieta no produce efectos adversos de ningún tipo.

2.2.11. Patógenos en cerdos.

Vélez (2014) y López-Álvarez (1976), menciona que la *Salmonella thipymurium* es un bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriae*, habita el intestino humano o animal de sangre caliente, de transmisión oral-fecal, causa infección gastrointestinal conocida como salmonelosis. En los casos más graves, la infección puede extenderse del intestino al torrente sanguíneo y de allí a cualquier parte del cuerpo, pudiendo causar la muerte.

En cerdos entre el destete y los cuatro meses de edad se generan graves diarreas hasta el deceso del animal, siendo la *Salmonella*

Thiopymurium, *Clostridium perfringens* y *Candida albicans*, microorganismos patógenos en cerdos que se encuentran en los sistemas de crianza intensivos produciendo un desequilibrio de la microbiota intestinal y causando grandes pérdidas económicas (Vélez 2014, Metzler-Zebeli et al. 2010, Pluske 2013 y Konstantinov et al. 2006).

Las cepas de *E. coli* capaces de producir enfermedad se hallan en el último tramo del tubo intestinal y abundan en los ambientes ocupados por los animales, las enfermedades producidas por *E. coli* en granja afectan a los recién nacidos, pero no exclusivamente. La transmisión tiene lugar por la vía fecal-oral, las cepas de *E. coli* que producen adhesinas del yeyuno y del íleon, se encuentran en las seis primeras semanas de vida, estas cepas aumentan con el estrés por causas de origen alimentario, social o físico (López-Álvarez 1976, Córdova 1993, Castillo 2000, Larsson et al. 2014, Jiménez 2010 y Metzler-Zebeli et al. 2010).

2.2.12. Secuenciación de ADN.

El ADN está definida por la ordenación o secuencia de las bases nitrogenadas en la cadena de polinucleótidos, residiendo precisamente en esta secuencia de bases, la información genética del ADN (Luque y Herraéz 2006 y Vivanco 2007).

La secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable del núcleo celular, que forman la base de los programas de desarrollo de los seres vivos (Luque y Herraéz 2006).

Es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales. Las técnicas actuales permiten realizar

esta secuenciación a gran velocidad, lo cual ha sido de gran importancia para proyectos de secuenciación a gran escala como el Proyecto genoma humano (Collado y Sanz 2007 y Espinoza 2015).

2.2.13. Técnicas basadas en la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

PCR se basa en el mecanismo de la replicación enzimática *in vivo* del ADN: el ADN bicatenario se desenrolla y pasa a ADN monocatenario, se duplica y se vuelve a enrollar. Esta técnica consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN por fusión a temperatura elevada; unión (anillamiento) de dos oligonucleótidos, utilizados como cebadores; extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos a partir de los cebadores utilizando ADN polimerasa como catalizador, en presencia de iones Mg^{2+} , se refiere a la producción de una o más copias de un fragmento genético o secuencia, se le llama Amplicón (Tamay 2013 y Luque y Herraes 2006).

Song et al. (2012), plantea que esta técnica es usada para la detección de bacterias presentes en bajo número, es la capacidad de amplificar cantidades muy pequeñas de DNA.

Collado y Sanz (2007) y Espinoza (2015), menciona que es posible amplificar un gen o una parte de un gen de un número limitado de células de la secuencia de ADN.

La forma de verificación de los productos de PCR es la electroforesis, constituye parte importante del procedimiento rutinario del análisis de los ácidos nucleicos y proteínas. El principio de la electroforesis consiste en la migración de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz de naturaleza porosa, en el cual, por acción de un campo eléctrico, serán separadas de acuerdo a su tamaño o peso molecular (Luque y Herraes 2006).

2.3. Definición de términos básicos.

2.3.1. Biotecnología molecular.

“Se trata de un grupo de tecnologías que comparten dos características comunes, que trabajan con células vivas y sus moléculas y que tienen una amplia gama de usos prácticos para mejorar nuestras vidas” (Maldonado et al. 2002, 10).

2.3.2. Aislamiento bacteriano.

“Purificación e identificación de un determinado organismo del resto de ellos, es el aislamiento que se realiza para obtener cultivos puros de bacterias” (Ruangpan y Tendencia 2004, 5).

2.3.3. Proteómica.

“Estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas de un genoma (proteoma)” (Bou et 2011, 606).

2.3.4. Probiótico.

“Actualmente el término probiótico hace referencia a un preparado o a un producto que contiene cepas de microorganismos viables en cantidad suficiente como para alterar la microflora en algún compartimento del huésped (por implantación o colonización) y que produce efectos beneficiosos en dicho huésped” (Oliveira y Gonzáles 2007, 27)

2.3.5. Bacterias ácido lácticas.

“Grupo de bacterias relacionadas entre sí que producen ácido láctico como principal metabolito, debido a su actividad metabólica de proteínas, azúcares y lípidos, estas sustancias contribuyen a la digestibilidad del alimento y producen inhibición de organismos patógenos” (Parra 2010, 94).

2.3.6. Bacteriocinas.

“Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias, incluyendo las del grupo BAL. Normalmente actúan contra microorganismos no deseados” (Agudelo 2014, 188).

2.3.7. Antagonismo.

“Se da cuando una población microbiana produce una sustancia que es inhibidora para otras poblaciones” (Atlas et al. 2002, 82).

2.3.8. Halos de inhibición.

“Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen, zona donde no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen” (Vélez 2014, 1).

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Localidad y periodo de ejecución.

El estudio se realizó mediante la obtención de muestras en campo y el análisis en laboratorio. En la fase de campo se tomaron dos puntos colectando muestras de un lechón en cada uno de ellos. El primero se ubicó en Los Cedros, distrito de San Pedro de Los Incas (Corrales) geográficamente ubicado a $3^{\circ}36'58,24''$ S $80^{\circ}31'49,75''$ O y la otra en cercado de Tumbes, ubicado $3^{\circ}35'12,96''$ S $80^{\circ}26'45,15''$ O (Figura 1).

La segunda fase se desarrolló en la Universidad Nacional de Tumbes, tanto en el Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Biología, Escuela de Enfermería de la Facultad de Ciencias de la Salud, donde se llevaron a cabo los aislamientos, análisis microbiológicos y moleculares; el análisis de proteómica se realizó en laboratorio de Biotecnología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquería y Ciencias del Mar.

El trabajo se realizó durante los meses de octubre a diciembre del 2015 y enero a setiembre del 2016.

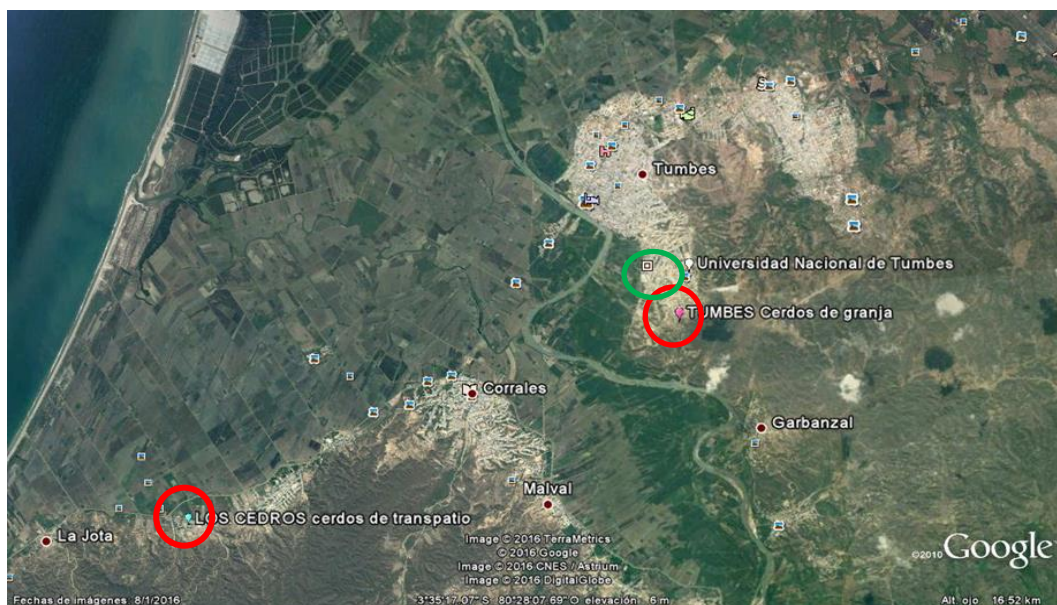


Figura 1. Ubicación de los lugares de la toma de muestra y trabajo experimental (Imagen Google Earth 2015).

3.2. Tipo de estudio y diseño de investigación.

De acuerdo a su fin, la investigación fue aplicada, con enfoque de tipo descriptiva que permitió la identificación y caracterización de las bacterias asociadas a diferentes regiones del tracto digestivo del lechón (Sabino 1996).

De acuerdo al diseño de contrastación, fue experimental, Sabino (1996), porque permitió medir, comparar y predecir las propiedades antagonicas de BAL frente a dos patógenos del cerdo como variable dependiente, según los halos de inhibición generados en tres pruebas de enfrentamiento conocidos como método directo, método pocillo de extracto bacteriano sin neutralizar (acción ácida) y método pocillo con extracto bacteriano neutralizado (bacteriocinas).

3.3. Población, muestra y muestreo.

3.3.1. Población.

Determinada por las bacterias presentes en diferentes regiones del tracto digestivo de dos lechones (seleccionados al azar de dos corrales con 12 animales en cada punto de muestreo), los lechones fueron de 42 días de edad (lechón uno) y de 39 días de edad lechón dos, estos fueron animales de traspatio, cruzados de la raza Landrase/yorkshire (50/50), ambos sanos con siete días pos destete, donde los días de destete varían según el criador y cuatro lechones pos destetados con cuadros de diarrea (para patógenos). Los lechones fueron alimentados con balanceado a base de maíz, soya y polvillo sin antibióticos.

3.3.2. Muestra.

Estuvo conformado por bacterias con características ácido lácticas presentes en diferentes regiones del tracto digestivo del lechón.

3.3.3. Muestreo

Se realizó laparotomía con hisopado de

En ambos lechones se realizó mediante laparotomía y recojo de muestras mediante hisopado, cumpliendo con los estándares de ética (Anexo 1), en diferentes regiones del tracto digestivo del lechón, del estómago (E), estómago esófago (EE), duodeno (D), yeyuno (Y), íleon (I), ciego (C) y colon (Co) de animales sanos y del recto de otros lechones con heces fluidas sin tratamiento (animales con cuadros diarreicos de diferente corral). Para el proceso quirúrgico se utilizó la ketamina como anestésico disociativo (para evitar el estrés), en dosis de 3 mg por kilogramo de peso vivo, vía intravenosa en la vena tibial medial.

3.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.

El desarrollo de cada fase (campo y laboratorio), comprendió:

3.4.1. Fase de campo.

Toma de muestras para obtener bacterias nativas.

Se tomaron muestras por laparotomía que consistió en la apertura de la cavidad abdominal y revisión directa de los órganos abdominales, se decidió el tipo de intervención como tomas biopsia requiriendo anestesia, que fue valorada y administrada por el veterinario cumpliendo con código de ética veterinario (anexo 1).

Recojo de muestras mediante raspado de la mucosa con hisopos estériles previamente autoclavados, obteniendo 35 muestras de un primer lechón, de diferentes partes del tracto digestivo, extraídas seis del estómago (E), seis del estómago-esófago (EE), dos del duodeno (D), cinco del yeyuno (Y), cuatro del íleon (I), seis del ciego

(C) y seis del colon (Co); y del segundo lechón se obtuvieron 39 muestras del estómago-esófago (EE), tres del estómago (E), cuatro del duodeno (D), siete del yeyuno (Y), seis del íleon (I), tres del ciego (C) y 10 del colon (Co). Figura 2.

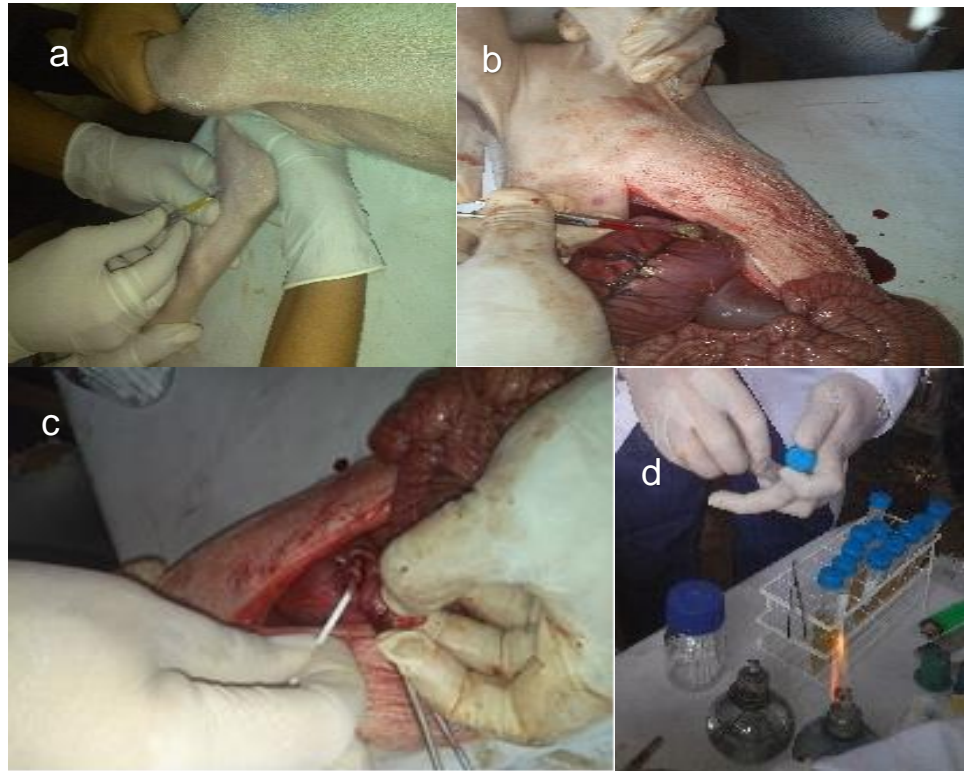


Figura 2. Lechón para extracción de bacterias: a) Aplicación de anestésico. b) Toma de muestra estómago. c) Toma de muestra duodeno. e) Colección de muestras.

3.4.2. Fase de laboratorio.

Se realizó el correspondiente aislamiento, caracterización morfológica y bioquímica de BAL de los lechones sanos y patógenos del lechón con diarrea, procesamiento, análisis e identificación molecular (extracción del ADN), pruebas de antagonismo e identificación de proteínas.

a. Aislamiento de cepas bacterianas del lechón sano.

Las muestras obtenidas de diferentes regiones del tracto digestivo del lechón (para ambos lechones por igual), fueron transportadas en tubos Falcon de 50 ml conteniendo caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) medio para bacterias ácido lácticas con un pH: 5 - 6 y a temperatura ambiente.

Los sobrenadantes obtenidos en los tubos Falcon que contenían las muestras, fueron utilizados como soluciones madre para realizar diluciones decimales (1/5, 1/10 y 1/20), las cuales fueron depositadas en tubos Eppendorf.

b. Identificación morfológica de BAL.

Paralelamente se realizó la preparación de los medios de cultivo en placas Petri, donde se depositó 75 µl de cada dilución de las muestras anteriores, se sembraron por estría en agar MRS suplementada con azul de anilina (0,012%) y con la ayuda de una hasa metálica esteril se extendió por toda la placa.

Las placas fueron expuestas a temperatura ambiente por 24 horas, para promover el desarrollo de microorganismos. Luego se prepararon diluciones seriadas hasta 20^{-2} y fueron sembradas posteriormente por superficie en placas Petri con agar MRS a pH 6,5. Se hicieron purificaciones consecutivas en agar MRS+bacto agar hasta obtener bacterias puras. Figura 3.

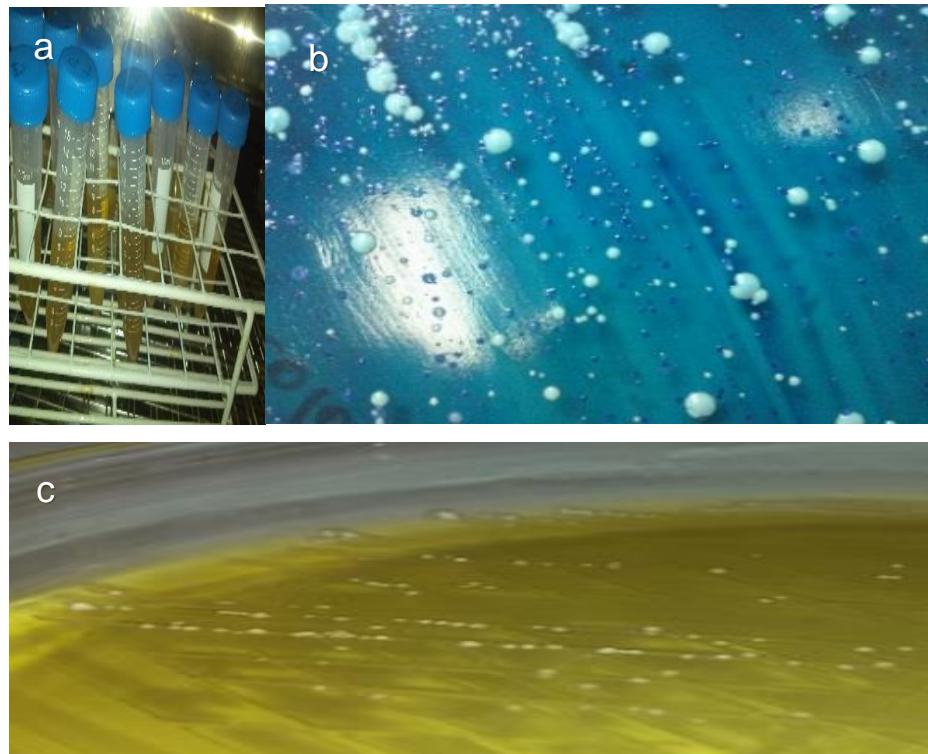


Figura 3. a) Muestras. b) Pre-selección de BAL sembradas en MRS con azul de anilina. c) Selección de BAL en MRS.

Se realizó la evaluación de BAL por el método de Yimin et al. (2005), también se complementó con pruebas de tinción (coloración Gram) y formación de esporas.

c. Caracterización bioquímica de BAL.

Se basó en la identificación de las reacciones metabólicas y enzimáticas de las bacterias viables como son oxidación, catalasa y presencia de gas, también se sometieron a condiciones semejantes a las características del tracto intestinal por tolerancia a la acidez, sales y bilis, donde se probaron concentraciones de 1%, 5% y 10% de sales biliares, cloruro de sodio 5%, 10% y 18% y pH de 2,5; 3,5 y 4,5. Todas las BAL obtenidas fueron sometidas al método aplicado por García et al. (2012). Figura 4

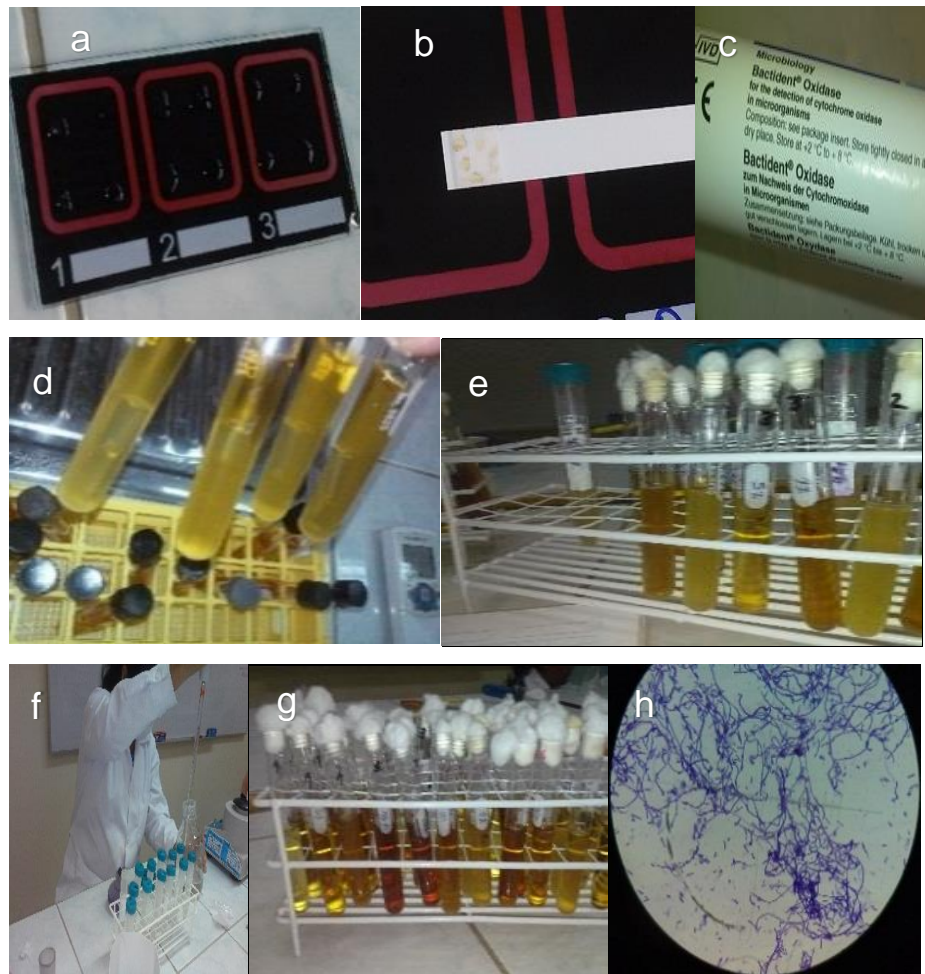


Figura 4. Pruebas bioquímicas: a) Catalasa negativa. b) y c) Oxidasa negativa. d) Presencia de CO₂. e) Prueba de resistencia a sales biliares. f) y g) Prueba resistencia al cloruro de sodio y pH de las BAL. h) Tinción Gram.

Para calificar estas bacterias como BAL debieron pasar las pruebas bioquímicas de: catalasa negativa (BAL no tiene enzima que degradan el peróxido de hidrógeno); que sean oxidasa negativa (las BAL no son aeróbicas por lo que no necesitan en su metabolismo oxígeno); producción de CO₂ (no produzcan gases) fundamentadas en la acción metabólica de azúcares por las BAL, coloración Gram positivas y presencia de esporas negativa, estas cepas obtenidas fueron conservadas en tubos con agar MRS inclinado a 4 °C y congeladas a -20 °C en caldo MRS suplementado con 30% de glicerol.

d. Aislamiento e identificación de cepas patógenas.

Las muestras se obtuvieron de la parte final del recto del lechón con síntomas de diarrea sin tratamiento (animales de diferente corral), fueron transportadas en tubos Falcon de 50 ml conteniendo como medio líquido caldo Brain Heart Infusión (BHI) agar, a temperatura ambiente para bacterias *Escherichia* y *Shigella*.

Para aislar las bacterias patógenas se utilizaron medios específicos: Para encontrar *Escherichia*: agar Eosina azul de metileno, para *Salmonella* y/o *Shigella*: agar *Salmonella Shigella*.

Los sobrenadantes contenidos en los tubos Falcon, fueron utilizados como soluciones madre para realizar diluciones decimales, las cuales fueron depositadas en tubos Eppendorf.

Paralelamente se agregaron los medios de cultivo en placas Petri, se sembraron por estría en agar McConkey (recomendada para aislar selectivamente bacilos Gram negativos y entéricos) y con la ayuda de un esparcidor metálico autoclavado se extendió por toda la placa.

Las placas fueron dejadas a temperaturas entre 37 °C a 40 °C por un período de 24 horas, para el desarrollo de microorganismos. Luego se realizaron diluciones seriadas hasta 20⁻² y fueron sembradas posteriormente por superficie en placas de Petri con agar Müller Hinton (recomendados para pruebas de sensibilidad). Figura 5.

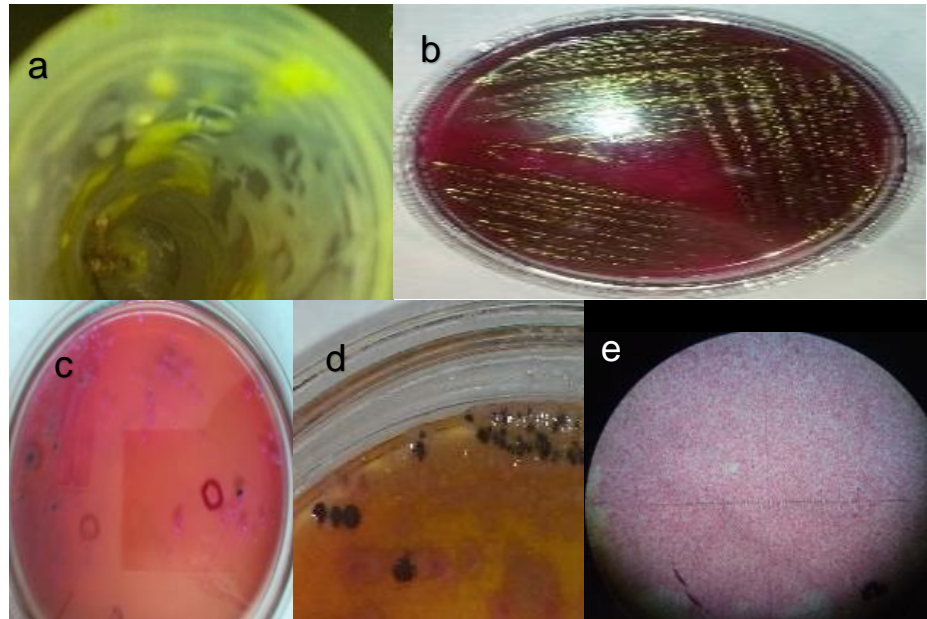


Figura 5. Extracción de bacterias patógenas: a) Muestra de excretas. b) Colonias verde plateadas de *Escherichia* en agar específico. c) y d) Colonias rosado y negra en medio específico *Salmonella Shigella*. e) Observación de bacterias con tinción Gram negativo.

e. Extracción, amplificación, verificación de ADN e identificación molecular mediante secuenciación del gen 16S ARNr.

- Extracción de ADN.

Las extracciones de ácidos nucleicos se realizaron utilizando el método estándar CTAB-DTAB (Gustincich et al. 1991, adaptado para células bacterianas según Dulanto 2013).

Inicialmente las cepas bacterianas fueron sembradas en tubos de vidrio con 10 ml de caldo Trypticase Soya (TSB) e incubadas de 28 a 30 °C por 24 horas. Se tomó 1 ml de la suspensión bacteriana y se incorporó en un microtubo de 1,5 ml de volumen, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante quedando el pellet (biomasa de células) y posteriormente se pesó en una balanza analítica (15 a 25 mg) en balanza de 200 gramos con una sensibilidad de 0,1 mg.

Al microtubo con el pellets, se le agregó 600 µl de solución DTAB (dodeciltrimetilamonio bromuro 8%, NaCl 1,5 M, Tris HCl 100 mM pH 8,8 y EDTA 50 mM) y con ayuda de micropistilos plásticos se homogenizó contribuyendo a la lisis celular, se incubó a 75 °C por 15 minutos y se mezcló con el vortex por 20 segundos.

Se adicionó 700 µl de cloroformo HPLC y se mezcló nuevamente en vortex por 20 segundos, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos y se transfirió 250 µl del sobrenadante a otro microtubo que contenía previamente 100 µl de solución CTAB (5% cetiltrimetilamonio bromuro, 0,4 M NaCl) y 900 µl de agua destilada.

Este nuevo microtubo con su contenido se incubó a 75° C durante 5 minutos y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos. Inmediatamente, se separó el sobrenadante y se resuspendió el ADN con 150 µl de solución disolvente (NaCl 1,2 M) incubándose a 75 °C durante 5 minutos, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos, luego se transfirió 150 µl de la solución a un nuevo microtubo que previamente contenía 300 µl de etanol absoluto. Esta solución del microtubo fue mezclada con el vortex por 20 segundos y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante cuidando de no perder el pellet de ADN y se agregó 500 µl de etanol al 75% para lavar el ADN y finalmente, el ADN fue resuspendido con 200 µl de solución tampón TE (Tris 10 mM- EDTA 1 mM) y almacenado a - 20 °C.

- Amplificación del ADN por PCR.

Para amplificar la región 16S ARNr, se utilizó los cebadores universales 518F (5´ AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3´) y 1510R (5´ GGC TAC CTT GTT ACG A 3´) técnica descritos por Weisburg y seguida por Alfaro et al. (2010). El volumen final de cada reacción fue 20 µl, constituida por 2 µl de buffer Taq 10X,

1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs (100 mM), 1 U de Taq ADN polimerasa, 10 pmol de cada cebador y 2 µl de ADN extraído. La PCR se realizó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Personal), programado en un ciclo de 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

- Verificación del ADN por electroforesis y secuenciación.

Para la electroforesis se utilizó 10 µl de cada producto de amplificación, los cuales fueron migrados en gel de agarosa al 1% con tampón de migración TAE 1X, la migración se realizó a 120 voltios durante 20 minutos; paralelamente se hizo migrar un marcador de peso molecular de 100 a 1 000 pares de bases (pb), posteriormente los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador UV y fotografiados con cámara digital.

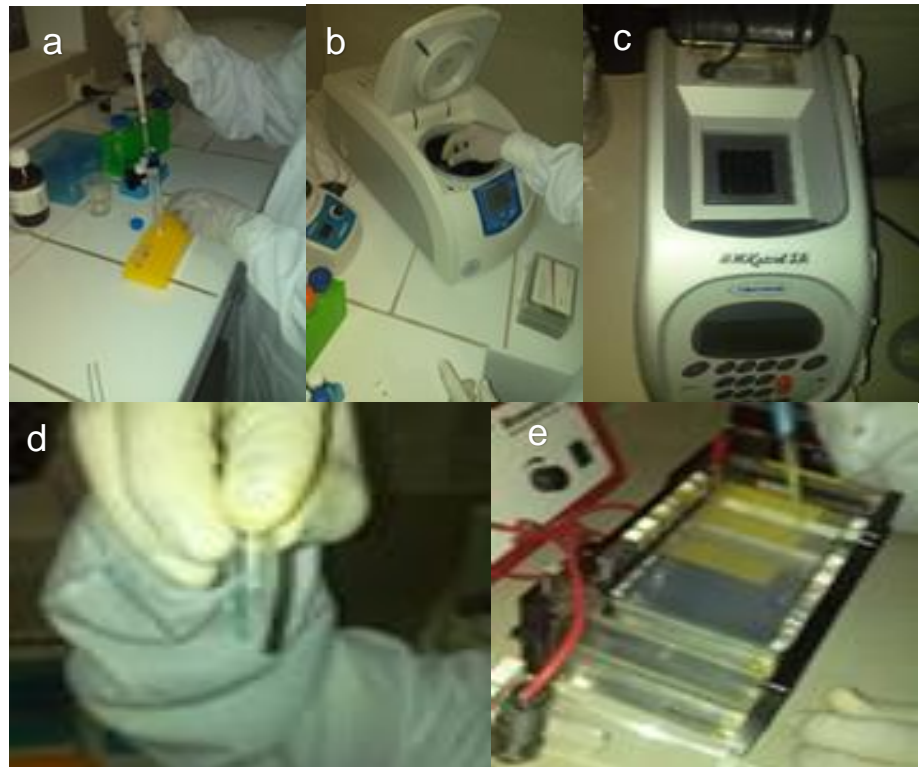


Figura 6. Extracción de ADN: a) Lisis de células. b) Centrifugación. c) Termociclador. d) ADN extraído. f) Electroforesis de las BAL.

- Identificación de la secuenciación genómica

Para la secuenciación se utilizó 10 µl de los productos obtenidos por amplificación en la PCR los cuales fueron colocados en microtubos de 0,2 ml, además, se preparó en microtubos de 0,2 ml porciones de 5 µl de cada cebador universales para el gen 16S ARNr, estas fueron empacadas y enviadas a la empresa Macrogen de Korea, para realizar la secuenciación de las dos cadenas de cada producto amplificado (Figura 6).

f. Actividad antibiótica de las bacterias según los métodos de inhibición utilizados.

Consistió en la determinación de antagonismo expresado mediante los promedios de halos de inhibición formados, se compararon entre si los resultados de la actividad antimicrobiana de cada método y la actividad de cada BAL contra dos patógenos.

Para la determinación de bacterias con características antibacterianas se utilizaron las BAL encontradas e identificadas en el tracto digestivo del lechón sano, contra dos patógenos, *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*, aislados e identificados del lechón con diarrea (Ruangpan y Tendencia 2004, Kloze et al. 2010 y Nodarse 1998), según los métodos: método directo, método pocillo de extracto bacteriano sin neutralizar (acción ácida) y método pocillo con extracto bacteriano neutralizado (acción bacteriocina) según (Vélez 2014, Amado et al. 2012, Nodarse 1998 y Ramírez y Castaño 2009).

g. Pruebas de inhibición bacteriana por el método de enfrentamiento directo.

Se utilizó el método de inhibición, según Vélez (2014), Chythanya et al. (2002), Nodarse et al. (1998) y Ramírez y Castaño (2009), en el cual el enfrentamiento es directo, donde se disponen discos impregnado con BAL (6 mm de diámetro, sembradas en agar

MRS y después de 48 horas de incubación), en placas con agar Müller Hinton, donde se encontraron las cepas bacterianas patógenas aisladas del tracto digestivo del lechón, sembradas por extensión.

h. Pruebas de inhibición bacteriana por el método de difusión en pocillo con extracto bacteriano.

Para descartar el efecto inhibitorio por competición de nutrientes entre la BAL y bacteria patógena, se realizó una prueba final utilizando el método de difusión en pozo o pocillo (Montuille et al. 1999, reportado por Vélez 2014).

Se perforaron hoyos de 6 mm en placas con agar Müller Hinton previamente sembrado por superficie con bacterias patógenas aisladas del tracto intestinal de cerdos con diarrea, donde se incorporaron dos métodos:

- Extracto sin neutralizar (acción ácida), el extracto se obtiene de la misma forma del anterior y se diferencia por que no se aplicó el neutralizador y considerado como sin neutralizar (presencia de acidez producida por los ácidos orgánicos). A cada pocillo preparado se agregó 50 μ l de cada uno de los extractos y se procedió a incubar por 24 horas a 40 °C.

- Extracto neutralizado (acción bacteriocinas), donde al extracto de cultivo líquido de BAL (48 horas de cultivo) libre de células bacterianas (por centrifugación a 10 000 rpm por 15 minutos) se neutralizó con NaOH, 5 M (eliminando el efecto ácido, quedando la presencia de bacteriocinas) (Figura 7).

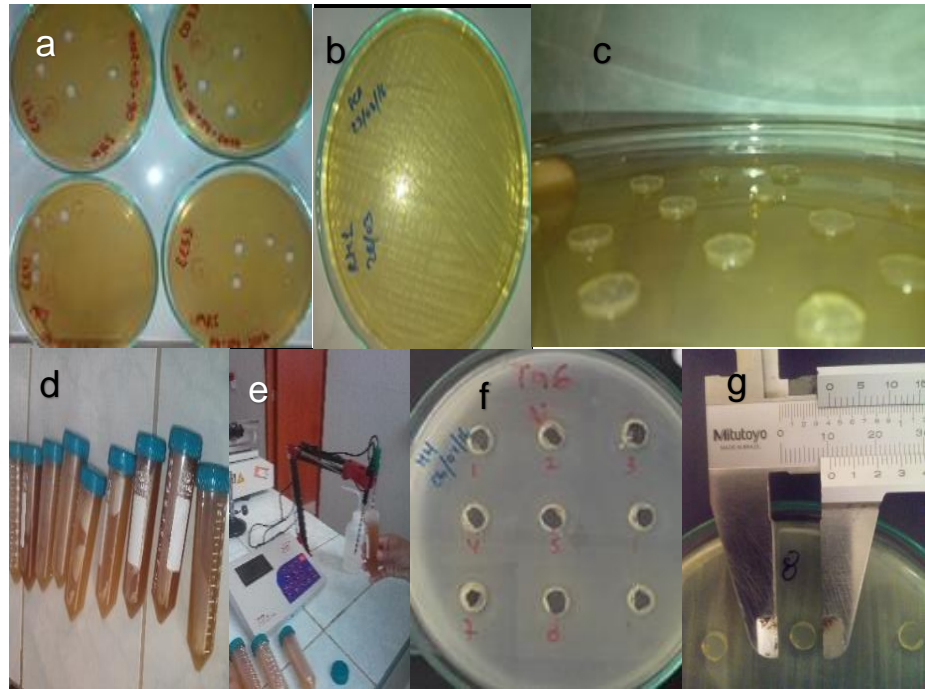


Figura 7.Preparación de pruebas de antagonismo: a) Extracción de discos de agar. b) agar Müeller Hinton para patógeno. c) Discos bacterianos directos. d) Extracto bacteriano. e) Neutralización del extracto bacteriano. f) Pocillo para extracto bacteriano. g) Medición de halos de inhibición.

La cantidad de halos de inhibición y tamaño (zonas claras alrededor del disco), demostraron la actividad antibacteriana de las cepas aisladas, se tomaron datos de la medida de los diámetros de los halos de inhibición

i. Extracción de proteínas bacterianas.

Es importante considerar que en esta metodología el protocolo permitió la extracción de las proteínas directamente de las bacterias (Protocolo fabricante de Kit).

Las cepas bacterianas fueron sembradas en tubos de vidrio con 10 ml Caldo Tripticasa Soya (TSB) e incubadas a 28-30 °C por 24 horas, se tomó 1 ml de la suspensión bacteriana a un microtubo de 1,5 ml de volumen y se centrifugó la solución bacteriana a 1 000 rpm por 10 minutos, donde se incubó el pellet

de 0 a -20 °C por 15 minutos y se agregó 10 µl de buffer (buffer de lisis: lisozimas 10 µl, buffer nativo 1 ml), se agitó con vortex por 30 segundos y se mezcló durante dos minutos, se volvió a incubar a -30 °C por 30 minutos, luego se centrifugó a 1 400 rpm por 20 minutos.

Para recuperar 45 µl aproximadamente del sobrenadante; se tomó 20 µl de lo recuperado y se agregó a un micro tubo de 1,5 ml de volumen, se agregó el mismo volumen de buffer de carga (20 µl) y se incubó a 95 °C por 5 minutos.

Se utilizó 20 µl de producto para la migración en el gel de poliacriloamida SDS-PAGE, método comúnmente aplicado para proteínas, PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis, en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Para ello se preparó un gel en placa vertical, para migrar a 90 voltios por 2 a 3 horas.

Se recuperó el gel, se rehidrató, en una bandeja con agua bidestilada (5 a 30 minutos), posteriormente se agregó la solución de fijación por 30 a 40 minutos, luego se eliminó la solución y se agregó la solución de tinción: 0,2% coomassie blue (colorante para proteínas), metanol/agua al 50% (v/v), ácido acético al 10%, durante 30 minutos, se procedió a lavar con agua destilada y se almacenó el gel en agua destilada en refrigeración de 3 a 12 horas.

Se procedió al lavado final donde se agregó la solución de lavado: metanol/agua al 50% (v/v), ácido acético al 10% durante una o dos horas. Cuando el fondo del gel quedó sin rasgos del tinte, se adicionó agua destilada y se procedió al corte de las bandas, recuperándose aquellas de interés.

Estas bandas se sometieron al método de digestión con tripsina teniendo como referencia pesos moleculares aproximados entre 2 500 a 2 900 kD, la solución utilizada en el protocolo, buffer de reducción: 100 mM de DTT, buffer de alquilación: 100 mM de Iodoacetamide, buffer de digestión: 50 mM de bi-carbonato de amonio en agua (pH 8,0) y Tripsina 0,1 µg/µl.

Se adicionó 15 µl de buffer de digestión en un tubo de 0,2 ml, luego 1,5 µl de buffer de reducción y 10 µl de muestra, luego se agregó 5 µl de agua grado HPLC (high pressure liquid chromatography) para completar un volumen de 27 µl final y se llevó a incubación a 95 °C durante 5 minutos, se dejó enfriar y se envolvieron los tubos con papel aluminio para el proceso de alquilación donde se adicionó 3 µl de buffer de alquilación, se dejó Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, en oscuridad, para luego adicionar 2 µl de tripsina a cada muestra y llevándolo a incubación a 37 °C durante toda la noche, para detener la acción de la tripsina se adicionó 5 µl de 20% de TFA (Ácido trifluoroacético).

Para el proceso de lectura de la proteómica se realizó mediante la técnica de espectrofotometría de masa por el método de desorción/ionización por láser asistida por la matriz, doble vuelo, con equipo MALDI TOF TOF, se procedió a añadir 0,5 µl del estándar de péptidos (entre 250 y 500 moles de péptido) en los pocillos 5 y 15 (la calibración del pocillo 5 se utilizó para las muestras 1 a 10 y la del pocillo 15 para las muestras 11 a 20).

Las muestras digeridas se repartieron en el resto de los pocillos de la placa matriz del MALDI TOF TOF, una vez secas todas las muestras, se añadió 0,5 µl de matriz saturada a cada uno de los pocillos, esperando a que la matriz se seque.

Se introdujo la matriz en el porta muestras del MALDI TOF TOF y se inició el proceso de disparo láser a las muestras estándares y de los péptidos, se guardó en memoria los ficheros de calibración (Figura 8).

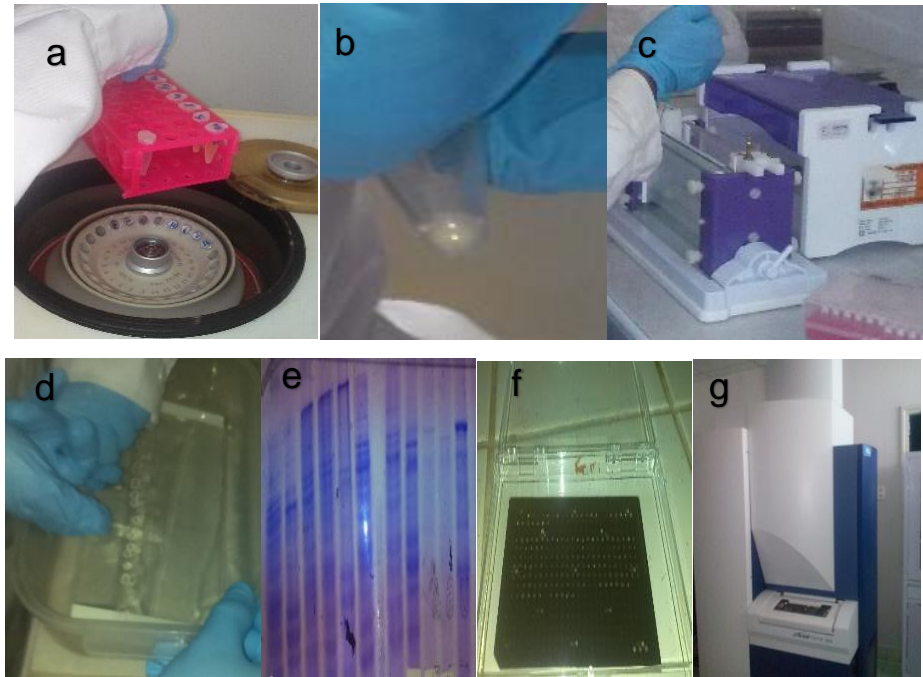


Figura 8. Extracción de proteínas bacterianas: a) Digestión directa con Kit. b) Pellet de digestión. c) Migración en gel poliacrilamida. d) Recuperación de gel. e) Gel de barras con proteína. f) Matriz de ploteo. g) Lectura en MALDI TOF TOF.

Se construyó una lista de pesos moleculares de péptidos de proteína supuesta en la base de datos, tomadas como referencia el peso molecular de las bandas seleccionado del gel digerido, utilizando alguno de los buscadores accesibles a través de Internet complementario al equipo MALDI TOF TOF, se intenta identificar la proteína a partir del mapa de péptidos.

El peso molecular y el número de péptidos identificados se utilizan como criterios de identificación de las proteínas donde se comparó inicialmente la familia *bacillae* y luego con lactobacilos.

Obtenidas las secuencias de péptidos de cada producto digerido, éstas fueron alineadas con el software libre MEGA 6 y

comparadas posteriormente con las secuencias de 16S ARNr que se encuentra en la base de datos de acceso público del GenBank mediante el software libre BLAST, Basic Local Alignment Search Tool (2016).

3.5. Procesamiento y análisis de datos.

Los datos fueron registrados en una hoja electrónica y se procesaron con el programa estadístico Excel; las pruebas de análisis de datos aplicadas fueron para las comparaciones de los diámetros de los halos de inhibición de las pruebas de antagonismo de las BAL frente a dos patógenos aislados del cerdo, en diferentes métodos de enfrentamiento. Se utilizó el Análisis de Varianza y prueba de Duncan ($\alpha = 0,05$) aplicado para todas las comparaciones (Kuehl 2001).

El análisis de las secuencias obtenidas, por microbiología molecular, de las bacterias cultivables, se realizó mediante el uso de una herramienta de acceso libre en el internet llamada Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) que se enlaza con el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), quien tiene a disposición las secuencias génicas de los organismos existentes, y al cual se accedió mediante el siguiente enlace: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>

4. RESULTADOS.

4.1. Aislamiento, identificación morfológica y caracterización bioquímica de bacterias de BAL cultivables asociadas al tracto digestivo de lechón.

En la Tabla 1 se observan la identificación y caracterización de BAL cultivables para su selección: la cual indica que el lechón uno, presentó 32 colonias de bacterias con características de BAL, según el medio de cultivo con MRS + azul de anilina al 0,012% y el lechón dos, mostro 35 colonias con características BAL, según el medio de cultivo con MRS + azul de anilina al 0,012%.

Por otro lado, según las características morfológicas, 16 podrían ser BAL del lechón 1, mientras 23 serían BAL en el lechón 2, en la caracterización bioquímica se obtuvieron 9 y 21 BAL y por pruebas de resistencia con sales biliares, pH y NaCl, quedaron 9 y 15 BAL en el lechón uno y dos respectivamente.

Según las pruebas de antagonismo, como producto final se obtuvieron dos BAL del primer lechón (estómago) y en el segundo lechón (dos cepas estómago, cuatro en el yeyuno y uno en colon) las cuales presentaron capacidad antibiótica, al presentar halos de inhibición en las pruebas de antagonismo frente a dos patógenos del lechón.

Tabla 1. Identificación y caracterización de BAL cultivables asociadas al tracto digestivo del lechón y su actividad

Número de lechón	Región del tracto digestivo	Muestras iniciales recogidas	Viabilidad de		Resistencia,		
			MRS+ azul de anilina (0,012%)	Caracterización morfológica	Caracterización Bioquímica	NaCl, pH, Sales Biliares	Pruebas de antagonismo
1	Estomago esof (EE)	6	6	6	6	6	
1	Estomago (E)	6	2	2	1	1	2
1	Duodeno (D)	2	4				
1	Yeyeuno (Y)	5	5				
1	Ileon (I)	4	4	1			
1	Ciego (C)	6	5	2	1	1	
1	Colon (Co)	6	6	5	1	1	
2	Estomago esof (EE)	3	3	3	4	4	2
2	Estomago (E)	3	1				
2	Duodeno (D)	4	4	3	3	1	
2	Yeyeuno (Y)	7	6	4	4	4	4
2	Ileon (I)	6	5	4	4	4	1
2	Ciego (C)	3	5	2	2	1	
2	Colon (Co)	13	11	7	4	1	
1	TOTAL	35	32	16	9	9	2
2	TOTAL	39	35	23	21	15	7

En la Tabla 2, se observa la caracterización morfológica y bioquímica de las BAL, donde se encontró:

Por la especificidad del medio, todas las colonias se tiñen de azul, características propias de las BAL, además se observó que todas fueron Gram positivas.

También se observó que en las pruebas bioquímicas, todas ellas tuvieron reacción negativa para la prueba de catalasa, oxidasa y CO₂ (excepto BAL 9, que produjo CO₂), todas producen acidez, tienen pH que van de 3,75 a 5,74, presentaron resistencia a las sales biliares al 1% (excepto la BAL 10 y 14) y se mantuvieron viables en pH de 4,5, para el NaCl al 5% no presentaron resistencia las BAL 1, 2 y 9.

Tabla 2. Caracterización morfológica, bioquímica y pruebas de resistencia de las bacterias BAL seleccionadas

CLAVE	Procedencia de muestra	Color de colonia	Tamaño de colonia (mm)	Forma de colonia	Morfología bacteria	Coloración Gram	Prueba oxidasa	Prueba catalasa	Presencia de gas	Valor de pH	Presencia esporas	pH ácido	Pruebas de resistencia								
													% sales biliares			% NaCl			pH		
													1	5	10	5	10	18	2.5	3.5	4.5
Bal 2	(E) Lechón 1	azul	diminuta	redonda concava	bacilos	+	-	-	-	4.44	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
BAL 6	(E) Lechón 1	azul	1	plana	bacilos	+	-	-	-	3.75	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	
BAL 1	(E) Lechón 2	azul	1	redon plana peq.	bacilos largos	+	-	-	-	4.88	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
BAL 4	(E) Lechón 2	azul	1	redon conca peq.	bacilos	+	-	-	-	4.68	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
BAL 7	(Y) lechón 2	azul	diminuta	redonda concava	bacilos largos	+	-	-	-	4.29	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
BAL 8	(Y) lechón 2	azul	2	redonda concava	bacilos	+	-	-	-	4.24	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	
BAL 9	(Y) lechón 2	azul	2	redonda concava	bacilos largos	+	-	-	+	5.25	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	
BAL 10	(Y) lechón 2	azul	1	redonda concava	bacilos	+	-	-	-	5.74	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	
BAL 14	(I) Lechón 2	azul	1	redonda concava	bacilos	+	-	-	-	4.81	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	

(E) estomago

(Y) Yeyuno

(I) Ileon

4.2. Identificación molecular de las BAL cultivables asociadas al tracto digestivo de lechón.

4.2.1. Identificación molecular de las bacterias BAL.

Los resultados de la identificación de cepas seleccionadas de la microbiota gastro-intestinal en lechón pos destetado, mediante la amplificación de la secuenciación con el gen 16S ARNr (secuencia específica para organismos procariontes), identificadas mediante programa de bioinformática MEGA 6 y Blast, fueron:

Alta semejanza de las cepas de BAL 2 y BAL 4 con las cepas BAL 6 y BAL 9 y todas ellas tuvieron alta similitud para *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 DNA (Anexo 2), con una identidad de 99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica, quiere decir que todas las secuencias encontradas fueron muy semejantes a los

resultados del análisis molecular comparada en MEGA 6 (PubMed National Center for Biotechnology 2016).

La cepa bacteriana BAL 1, encontrada en el estómago presentó semejanza a la cepa BAL 10 y BAL 14 encontradas en el yeyuno, esta última con mayor similitud a la cepa BAL 8 y todas ellas tienen alta semejanza genómicamente con el *Lactobacillus fermentum* NBRC 15885 (Anexo 3), con una identidad de 99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica correspondiente, excepto la cepa de la BAL 8 que tiene 99% de identidad y cobertura de 77% comparados en MEGA 6 (PubMed National Center for Biotechnology 2016).

La cepa BAL 7, encontrada en el íleon mostró alta semejanza con la bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* strain L105 16S ribosomal RNA (Anexo 4), con una identidad de 99% y cobertura de 97% de la secuencia nucleotídica comparados en MEGA 6 (PubMed National Center for Biotechnology 2016).

La información permite diferenciar tres grupos de BAL, Tabla 3 y figura 8, en función a la semejanza mostradas en el análisis genómico donde las BAL 2, 4, 6 y 9 encontradas en el estómago tienen semejanza con *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, las BAL 1, 10, 14 y 8 con el *Lactobacillus fermentum* NBRC y la BAL 7 con *Lactococcus lactis*.

En la figura 8, se muestra el árbol filogenético donde se observa la relación filogenética entre las BAL encontrados, estas bacterias pertenecen al orden *Lactobacillales* y muestran ellas con diferencias menores al 1% (Figura 8).

Tabla 3. Identificación molecular mediante el gen 16S ARNr de cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de lechón

Código	Extracción de muestra	Tamaño de la secuencia (pb)	Especie identificada	Identidad (%)	N° de accesión
BAL 2	Estómago	1503	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	99	AP008937.1
BAL 4	Estómago	1507			
BAL 6	Estómago	1499			
BAL 9	Estómago	1503			
BAL 1	Estómago	1494	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC	99	NR_113335.1
BAL 10	yeyuno	2110			
BAL 14	yeyuno	2138			
BAL 8	yeyuno	1932			
BAL 7	íleon	2461	<i>Lactococcus lactis</i>	94	NR_116443.1

.Para obtener mayor información sobre la referencia ingrese al siguiente enlace: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> y digite el código de accesión de cada bacteria cultivable

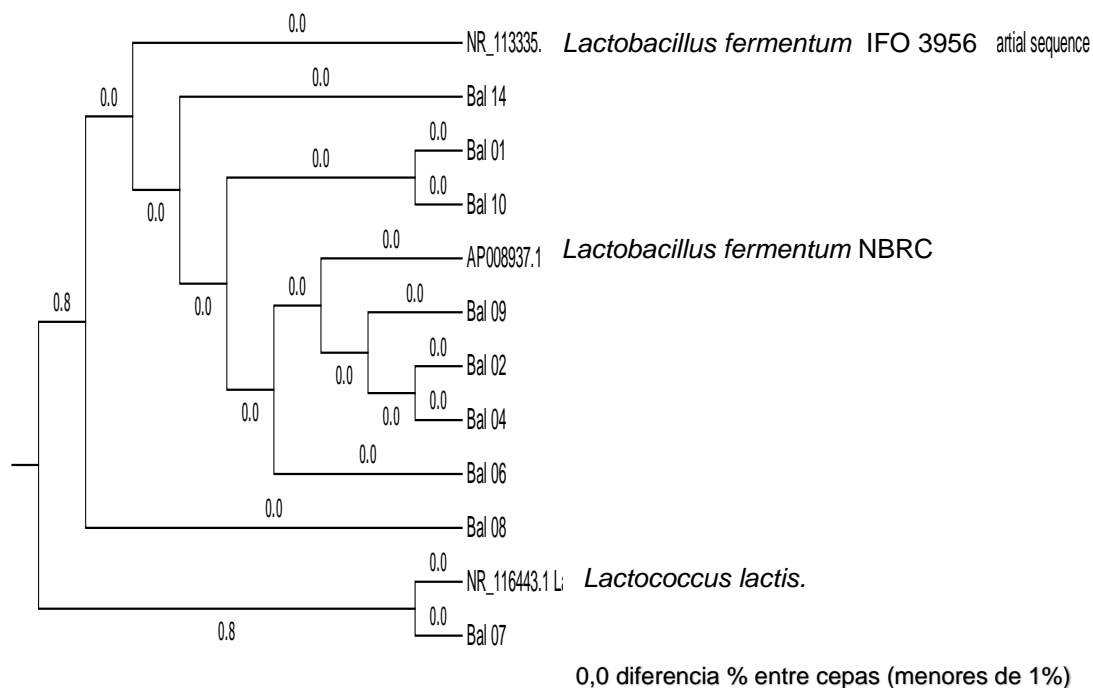


Figura 8. Árbol filogenético mostrando las relaciones de las bacterias ácido lácticas aisladas del tracto digestivo del lechón

En la Figura 9 se verificó la presencia de ADN genómico de las BAL y el peso molecular aproximados expresados en pares de bases, comparados con el marcador de peso en la esquina derecha; las manchas oscuras, demuestran la presencia de ADN genómico de las BAL migradas en gel de agarosa por electroforesis y los cuales tienen pesos moleculares semejantes comprendidos entre 1500 a 2550 pb.

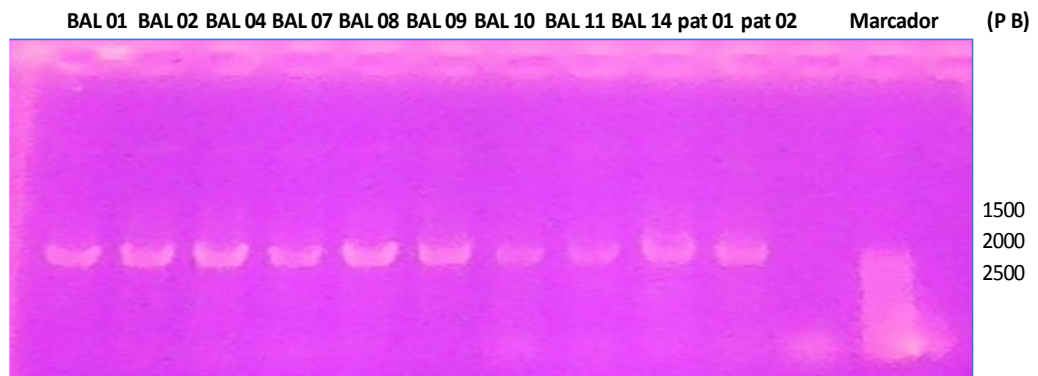


Figura 9. Gel de agarosa de electroforesis para verificación de ADN bacteriano

4.2.2. Identificación molecular de bacterias patógenas.

Fueron aisladas de excretas de lechones con síntomas de diarrea con una identidad de 99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica para la cepas *Escherichia fergusonii* strain ATCC 35469 (Anexo 4); con una identidad de 90% y cobertura de 94% de la secuencia nucleotídica para *Shigella sonnei* strain CECT 4887 16S (Anexo 5), clasificadas dentro del orden Enterobacteriaceae, las que también son denominadas bacterias fecales y con alto porcentaje de parentesco filogénico con diferencia entre ellos menores 1,5% y 2,5% de las encontradas (Tabla 4, Figura 10).

Tabla 4. Identificación molecular mediante el gen 16S ARNr de cepas bacterianas patógenas aisladas del tracto digestivo de lechón

Código	Extracción de muestra	Tamaño de la secuencia (pb)	Especie identificada	Identidad (%)	N° de accesión
Patogena 1	Excretas	1473	<i>Escherichia</i>	99	NR_074 902.1
			<i>fergusonii strain strain 35469</i>		
Patogena 2	Excretas	1473	<i>Shigella sonnei</i>	94	NR_104 826.1
			<i>strain CECT 4887</i>		

Para obtener mayor información sobre la referencia ingrese al siguiente enlace: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> y digite el código de accesión de cada bacteria cultivable

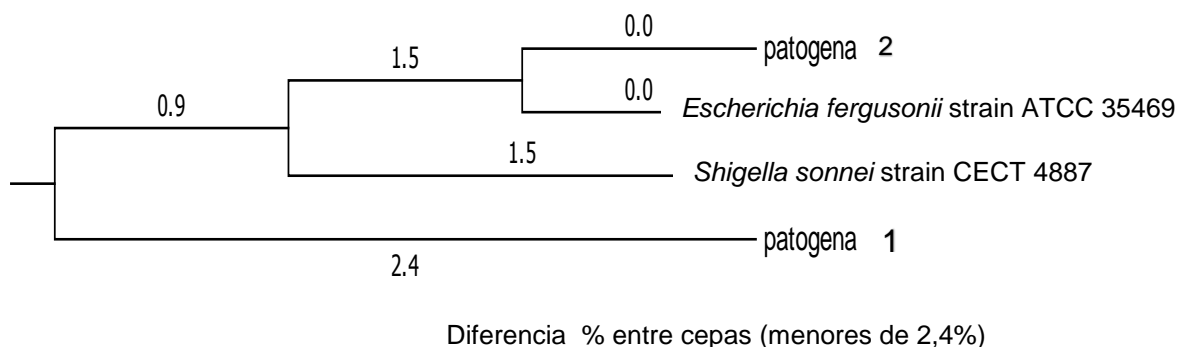


Figura 10. Árbol filogenético mostrando las relaciones de las bacterias patógenas aisladas del tracto digestivo del lechón

4.3. Actividad antibiótica de las bacterias según los métodos de inhibición utilizados.

En la Tablas 5 y 6 se presentan la acción antibiótica según el halo de inhibición producido y el porcentaje de incremento de estos halos. De las nueve bacterias aisladas e identificadas como *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, las cuales se enfrentaron a las bacterias patógenas: *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*.

Tabla 5. Acción antibiótica de cepas bacterianas BAL aisladas del tracto digestivo del lechón frente a cepas patógenas

CLAVE	Bacteria	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469			<i>Shigella sonnei</i> strain CECT 4887		
		Directa	Sin neutralizar	Neutralizado	Directa	Sin neutralizar	Neutralizado
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	+	+++	+	-	-	-
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	+	+	+	-	-	+
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	+	++	+	-	-	-
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	+	++	+	+	+	-
BAL 7	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+++	++	-	-	-
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	++	++	+	-	-	-
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	+	+	+	+	+	+
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	+	+	+	+	+	+
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	+	+	+	-	+	+
+++	<i>alta inhibicion</i>	++	<i>mediana inhibicion</i>		+	<i>baja inhibicion</i>	
-	<i>sin inhibicion</i>						

Se observó que los mejores resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo según los halos generados fue por el método de pocillo utilizando extracto bacteriano sin neutralizar (acción ácida, donde se expresa la acción antibiótica y bactericida que producen los ácidos orgánicos presentes) tanto para el enfrentamiento contra *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*,

Se debe considerar que el método de pocillo utilizando extracto bacteriano neutralizado, pierde el efecto de la acción ácida, quedando el extracto con sustancias no ácidas (bacteriocinas) que producen el efecto inhibitorio (Tabla 6 y Figura 11).

Comparando la susceptibilidad de los patógenos y el método utilizado, se observó que, cuando se utilizó el método con extracto sin neutralizar para el enfrentamiento de las BAL identificadas para *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, contra *Escherichia fergusonii*, estas generaron los mayores halos de inhibición para las nueve BAL expresados en porcentaje

que van de 30,49% a 94,89%; a diferencia cuando se enfrentaron por el mismo método contra *Shigella sonnei*, solo hicieron halos de inhibición cinco BAL expresados entre 3,33% y 26,67%.

Cuando se utilizó el método con extracto neutralizado también presentaron halos de inhibición las nueve BAL frente a la *Escherichia fergusonii*, pero de menor tamaño, de 19,86% a 54,96% mientras que solo cuatro BAL presentaron halo de inhibición para la *Shigella sonnei*, los cuales están entre 10% a 20%.

En la Tabla 6 y Figura 11, también muestra que para los tres métodos utilizados en las pruebas de antagonismo de las BAL frente *Escherichia fergusonii* todas presentan halos de inhibición, lo cual no se aprecia en el enfrentamiento de las BAL contra *Shigella sonnei*, incluso las BAL 1, BAL 4, BAL 7 y BAL 8, no generan halos (Anexo 8).

Los mejores resultados para la capacidad antibiótica están determinado por los extractos bacterianos sin neutralizar siendo *Escherichia fergusonii*. el patógeno más susceptible (Tabla 11 y Figura 6).

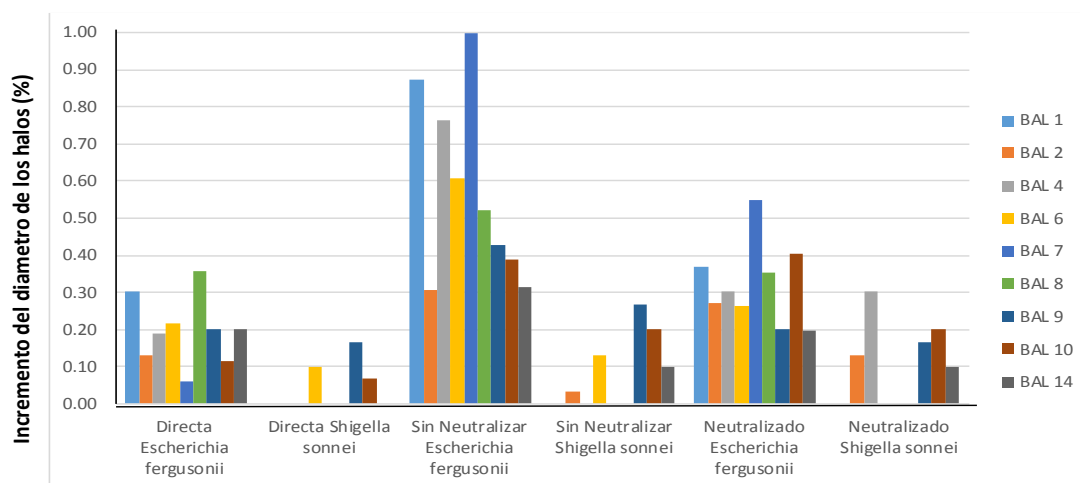


Figura 11. Incremento (%) de halos de inhibición de cepas BAL aisladas del tracto digestivo del lechón frente a dos cepas patógenas.

Tabla 6. Incremento (%) de halos de inhibición de cepas BAL aisladas del tracto digestivo del lechón frente a cepas patógenas

CLAVE	Bacteria	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469			<i>Shigella sonnei</i> strain CECT 4887		
		Directa	Sin neutralizar	Neutralizado	Directa	Sin neutralizar	Neutralizado
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	30,16	87,25	36,69	0,00	0,00	0,00
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	12,96	30,49	27,01	0,00	3,33	13,33
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	19,06	76,28	30,24	0,00	0,00	0,00
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	21,76	60,81	26,43	10	13,33	0,00
BAL 7	<i>Lactococcus lactis</i>	6,02	99,84	54,96	0,00	0,00	0,00
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	35,67	52,24	35,51	0,00	0,00	0,00
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	19,98	42,56	20,01	16,67	26,67	16,67
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	11,34	38,83	40,28	6,67	20,00	20,00
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	19,91	31,25	19,86	0,00	10,00	10,00

4.4. Pruebas de antagonismo entre las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*.

4.4.1. Método directo.

a. Cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Escherichia fergusonii*.

El ANVA con nivel de significancia de 5% (Tabla 7) permitió determinar que las cepas del *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Escherichia fergusonii*, utilizando el método directo, expresaron significancia entre los halos producidos.

Tabla 7 ANVA (significancia de 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción antagónica de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Escherichia fergusonii* mediante prueba directa

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	F5%	Significancia
Entre grupos	24.9593537	8	3.11991921	2.65769906	0.01099944	2.033294624	4.75	*
Dentro de los grupos	116.217824	99	1.17391741					
Total	141.177178	107						

$$CV = 14.75 \%$$

La prueba de Duncan (significancia al 5%), permitió determinar que los halos son estadísticamente semejantes entre las primeras ocho BAL, también que las tres primeras BAL 8, BAL 1 y BAL 2 son las más eficientes y donde todas las BAL demostraron capacidad bactericida contra la *Escherichia fergusonii* (Tabla 8)

Tabla 8 Prueba de Duncan (significancia 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción antagónica de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Escherichia fergusonii* mediante prueba directa

Orden	Bacteria	Promedio diametro de halos (mm)
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	8.140 a
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	7.810 a
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.667 a
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	7.403 a
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.306 a
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.199 a
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	7.194 a
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.011 a
BAL 7	<i>Lactococcus lactis</i>	6.361 b

Promedio con igual literal son semejantes estadísticamente

b. Cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Shigella sonnei*.

Según el ANVA con nivel de significancia de 5% (Tabla 9), concluye de la existencia de alta significancia entre las cepas del *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Shigella sonnei* utilizando el método directo.

Tabla 9 ANVA (significancia de 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Shigella sonnei* mediante prueba directa

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad para F	Valor crítico		
						para F	F5%	Significancia
Entre grupos	6.45333333	8	0.80666667	15.125	1.7468E-10	2.15213288	4.75	**
Dentro de los grupos	2.4	45	0.05333333					
Total	8.85333333	53						

CV = 3.71 %

Según la prueba de Duncan (significancia al 5%), en la tabla 10 se pudo determinar que la BAL 9 generó en promedio halos de 7 mm, estadísticamente es diferente y supera a la BAL 6 con 6,60 mm de halo y BAL 10 con halo de 6,40, entre estos últimos no existe diferencia estadísticas; por otro lado si existe diferencia con las otras BAL 2, BAL 14, BAL 1, BAL 4, BAL 7 y BAL 8 las cuales no presentaron algún halo.

Los resultados para la *Shigella sonnei*, fueron halos más pequeño e incluso algunas cepas no lo producen a diferentes de las encontradas en la *Escherichia fergusonii*.

Tabla 10 Prueba de Duncan (significancia 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Shigella sonnei* mediante prueba directa

Orden	Bacteria	Promedio diámetro de halos (mm)
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.00 a
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	6.60 b
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.40 b
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	6.00 c
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.00 c
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.00 c
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	6.00 c
BAL 7	<i>Lactococcus lactis</i>	6.00 c
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.00 c

Promedio con igual literal son semejantes estadísticamente

4.4.2. Método de difusión en pocillo.

a. Utilización de extracto bacteriano sin neutralizar (acción ácida).

- Cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Escherichia fergusonii*.

En la prueba ANVA con nivel de significancia de 5% (Tabla 11), permitieron determinar que existe significancia entre los tratamientos al igual que la prueba de Duncan (significancia al 5%) tabla 12 permitió precisar que los mayores halos de inhibición se dieron en este método y frente a este patógeno, con marcada diferencia del mayor halo de inhibición producido por la BAL 7 de 11,99 mm, estadísticamente diferente con el resto de las BAL.

Tabla 11 ANVA (significancia de 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Escherichia fergusonii* prueba con extracto bacteriano sin neutralizar

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	F5%	Significancia
Entre grupos	91.318161	8	11.4147701	3.25291461	0.003190489	2.06798366	4.75	*
Dentro de los grupos	256.16357	73	3.50909					
Total	347.481731	81						

CV = 19.60 %

También en este método se determinó que existe grupos de BAL semejante estadísticamente entre sus cepas, en el primer grupo estuvieron la BAL 4 con halo de 10,58 mm, BAL 6 (9,649 mm) y BAL 1 (9,504 mm) y el segundo grupo de la BAL 2 (9,438 mm), BAL 10 (9,313 mm), BAL 8 (9,135 mm) y BAL 9 (8,554 mm) de diámetro.

La BAL 14 (7,875 mm) presentaron los menores promedios de los halos y estadísticamente diferente a todas las BAL.

Todas la BAL generaron halos de inhibición frente a *Escherichia fergusonii* en este método.

Tabla 12 ANVA (significancia de 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Escherichia fergusonii* prueba con extracto bacteriano sin neutralizar.

Orden	Bacteria	Promedio diametro de halos (mm)
BAL 7	<i>Lactococcus lactis</i>	11.990 a
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	10.577 b
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	9.649 b
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	9.504 b
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	9.438 c
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	9.313 c
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	9.135 c
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	8.554 c
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	7.875 d

Promedio con igual literal son semejantes estadísticamente

- **Cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Shigella sonnei***

Según el ANVA con nivel de significancia de 5% (Tabla 13), en este método permitió determinar que todas las BAL se comportan de forma diferentes para este enfrentamiento contra la *Shigella sonnei*,

Tabla 13 ANVA (significancia de 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Shigella sonnei* prueba con extracto bacteriano sin neutralizar.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Valor crítico			
				F	Probabilidad	para F	F5% Significancia
Entre grupos	4.29333333	8	0.53666667	4.528125	0.003733536	2.510157895	4.75 *
Dentro de los grupos	2.13333333	18	0.11851852				
Total	6.42666667	26					

CV = 5.42 %

En la prueba de Duncan (significancia al 5%) de la tabla 14, resuelve que cinco de la nueve BAL generan halos de inhibición, donde la BAL 7 (7,2 mm) sigue generando el mayor halo de inhibición para este patógeno en todos los métodos, continua la BAL 10 (6,8 mm) ambas con diferencia estadísticamente a todas las demás.

Con poco halo y semejantes entre ellas, fueron determinadas por las BAL 6, BAL 10 y BAL 2 con promedio de halos de 6,47 mm, 6,47 mm y 6,40 mm respectivamente y por ultimo las BAL 1, BAL 4, BAL 7 y BAL 8 no presentaron algún halo.

Tabla 14 Prueba Duncan (significancia 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Shigella sonnei* prueba con extracto bacteriano sin neutralizar

Orden	Bacteria	Promedio diametro de halos (mm)
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.20 a
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.80 b
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	6.47 c
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.40 c
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	6.33 c
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.00 d
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	6.00 d
BAL 7	<i>Lactococcus lactis</i>	6.00 d
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.00 d

Promedio con igual literal son semejantes estadísticamente

b. Utilización del extracto bacteriano neutralizado (acción de bacteriocinas).

- **Cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Escherichia fergusonii*.**

Este método permite determinar la acción antibiótica producida por las bacteriocinas, donde el extracto utilizado, estaba

neutralizada la actividad ácida, en la tabla 15, se determinó la comparación de los diámetro de los halos de inhibición producido por la BAL, donde en el ANVA resolvió la existencia de significancia entre ellas.

Tabla 15 ANVA (significancia de 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Escherichia fergusonii* prueba con extracto bacteriano neutralizado

ANÁLISIS DE VARI de BAL frente a la *Escherichia fergusonii* utilizando extracto bacteriano neutralizado

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio	Valor			F5%	Significancia
			de los cuadrados	F	Probabilidad ad	crítico para F		
Entre grupos	33.66163356	8	4.2077042	2.3901	0.02365296	2.064439	4.75	*
Dentro de los grupos	132.0381515	75	1.76050869					
Total	165.6997851	83						

$$CV = 16.71 \%$$

En la prueba de Duncan (significancia 5%) de la tabla 16, muestra el tamaño de los halos encontrados por el método utilizando el extracto neutralizado, la BAL 7 con 9,289 mm presento el mayor halo y es estadísticamente diferente a las demás; se observaron que un grupo produce halos semejante estadísticamente entre ellas BAL 1 (8,201 mm), BAL 8 (8,130 mm), BAL 4 (7,815 mm), BAL 2 (7,621) y BAL 6 (7,586 mm).

La BAL 9 (7,201 mm) y BAL 14 de 7,192 mm produjeron el menor halo y son estadísticamente semejantes entre ellas y diferentes a toda las BAL.

Tabla 16 Prueba de Duncan al $\alpha = 0,05$ del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Escherichia fergusonii* prueba con extracto bacteriano neutralizado

Orden	Bacteria	Promedio diametro de halos (mm)
BAL 7	<i>Lactococcus lactis</i>	9.298 a
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	8.417 b
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	8.201 b
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	8.130 b
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.815 b
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.621 b
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.586 b
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.201 c
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	7.192 c

Promedio con igual literal son semejantes estadísticamente

- **Cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* frente a *Shigella sonnei***

Y por último en la tabla 17, resolvió que para esta prueba tenemos un ANVA (significancia de 5%), diferencias estadísticas entre los halos generados por las BAL al igual que la prueba de Duncan (significancia de 5%) de la tabla 18 se puede determinar que solo cuatro BAL generaron pequeños halos de inhibición, siendo el mayor la BAL 10 con halo de 7,20 mm y estadísticamente diferente a las otras y donde las BAL 9 (7,00 mm), BAL 2 (6,8 mm) y BAL 14 (6,60 mm), fueron semejantes entre ellas.

Tabla 17 ANVA (significancia de 5%) del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Shigella sonnei* prueba con extracto bacteriano neutralizado

ANÁLISIS DE VARIANZA de BAL frente a la <i>Shigella sonnei</i> utilizando extracto bacteriano neutralizado									
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	de los cuadrados	F	Probabilidad	crítico para F	F5%	Significancia	
Entre grupos	13.5709091	10	1.35709091	26.6571	1.32957E-17	2.007792	4.75	*	
Dentro de los grupos	2.8	55	0.05090909						
Total	16.3709091	65							

CV = 3.57 %

Las BAL 6, BAL 1, BAL 4, BAL 7 y BAL 8 no generaron halo en este método.

Las BAL en este método también son menos eficientes e incluso sin presencia de antagonismos frente a *Shigella sonnei*.

Tabla 18 Prueba Duncan al $\alpha=0,05$ del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, frente a *Shigella sonnei* prueba con extracto bacteriano neutralizado

Orden	Bacterias	Promedio diametro de halos (mm)
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	7.20 a
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	7.00 b
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	6.80 b
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.60 b
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	6.00 c
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.00 c
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	6.00 c
BAL 7	<i>Lactococcus lactis</i>	6.00 c
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	6.00 c

Promedio con igual literal son semejantes estadísticamente

4.5. Identificación molecular de proteínas obtenidas de las cepas *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, asociadas al tracto digestivo de lechón, mediante proteómica.

Inicialmente se identificaron y verificaron molecularmente todas las cepas BAL encontradas en las diferentes regiones del tracto digestivo y según el genoma analizado se diferenciaron como *Lactobacillus fermentum*, las cuales se sometieron al análisis de proteómica resultando dos diferentes.

La primera proteína encontrada fueron correspondientes a las BAL 2, BAL 4, BAL 6 y BAL 9 (cepa *Lactobacillus fermentum* IFO 3956) y se encontró la proteína denominada ornithine monooxygenase común en todas ellas, que según (PubMed National Center for Biotechnology 2016) han sido identificadas en su plenitud como proteína del organismo *Bacillus firmus*, con identidad de 100% y cobertura de 100% de la secuencia proteica:

```
>WP_048009930.1      ornithine      monooxygenase      [Bacillus firmus]  
MIYEMTVQFRVLDMKEGLLWYETLLNKKPDLIPHEGFSAEWELITGCWLQIAEGSPSIGSG  
PIRLGVPDLEQERERLITELKITPFEIHTRKEVPVKWATFADPWGNRIGYFEYIDMHEKEIQ  
IKKVNKEDWGR SOURCE Bacillus firmus Bacillus firmus Bacteria; Firmicutes; Bacilli;  
Bacillales; Bacillaceae; Bacillus. COMMENT REFSEQ: This record represents a single,  
non-redundant, protein sequence which may be annotated on many different RefSeq  
genomes from the same, or different, species. COMPLETENESS: full length. type I  
extradiol dioxygenases, glyoxalase I and a group of antibiotic resistance proteins; cd06587"  
/db_xref="CDD:211348" (Tabla 13).
```

En un segundo grupo de BAL correspondiente a la BAL 10, BAL 14, BAL 1, BAL 7 y BAL 8 (*Lactobacillus fermentum* NBRC 15885), se encontró la proteína denominada RNase J family beta-CASP ribonuclease que tiene una región activa que según (PubMed National Center for Biotechnology 2016) identificada plenamente con *Lactobacillus saerimneri*, con una identidad de 100% y cobertura de 100% de la secuencia proteica:

```
>WP_009551846.1 RNase J family beta-CASP ribonuclease [Lactobacillus saerimneri]  
MKKLVKNNETAVFAVGGGLGEIGKNTYGVQFQDEIILIDAGIKFPEDDLLGIDYVIPDYQYL  
VANRDKIKALVITHGHEDHIGGIPYLLQQVNPPIYAGPLALALIKSKLEEHGLLRSTKLHEID
```

EDTVLKFRKTSVSFFRTHHSIPDTLGVAVKTPSGTIVETGDFKFDLTPITHQAPNFQKMAR
 LGEEGVLCLLSDSTNAEVPNFTKSEQWVGKSIHRIFEKVDGRIIFATFASNISRVQQAVSA
 ALGKGRKIAVFGRSMEAAIENGRRLGYLDIPDKALISAKELNSLPANKVMILCTGSQGEP
 MAALSRIANGTHRQVSIHPGDTVVFSSLPPIGNTLSVNKVINELEEAGANVIHGRINNIHAS
 GHGGQEEQRLMLRLIKPKYFMPHGEYRMLKIHELAEQCGVPEENFILKNGDVLALTK
 DSARYAGHFNADDVYVDGSGVGDIGNIVLKDRRILSEGLVVVVATIDMKRRILAGPDL
 LSRGFIYMRESGELINQARKQLFRSITRSLKGDKVTEAKIRENIADLQSFLFDQTERHPMI
 LPMLITV SOURCE *Lactobacillus saerimneri* ORGANISM *Lactobacillus saerimneri*
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus. COMMENT
 REFSEQ: This record represents a single, non-redundant, protein sequence which may be
 annotated on many different RefSeq genomes from the same, or different, species (Tabla
 13).

Ambas proteínas y sus correspondientes organismos tienen alta identidad con el orden Lactobacillae al igual que las BAL caracterizadas molecularmente y presentadas en el árbol filogénico de la Figura 18, donde se puede comparar en porcentaje el parentesco entre todos los organismos involucrados, con una diferencia no mayor al 1% lo cual indicaría que comparten secuencias genómicas en común y en la cual la proteína encontrada en los organismos seleccionados comparten genes en común.

Tabla 13. Identificación molecular de las proteínas y BAL asociadas al tracto digestivo de lechón, mediante proteómica.

Código	Porción del tracto intestinal	Tamaño de la secuencia (AA)	Proteína identificada	Especie identificada	% de identidad	N° de accesión
BAL 2	Estómago					
BAL 4	Estómago					
BAL 6	Estómago	133	ornithine monooxygenase [Bacillus firmus]	<i>Bacillus firmus</i>	100	WP_048009930.1
BAL 9	yeyuno					
BAL 1	Estómago					
BAL 10	Yeyuno					
BAL 14	yeyuno	262	RNase J family beta-CASP ribonuclease [Lactobacillus saerimneri]	<i>Lactobacillus saerimneri</i>	100	WP_009551846.1
BAL 8	yeyuno					
BAL 7	íleon					

Para obtener mayor información sobre la referencia ingrese al siguiente enlace: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> y digite el código de accesión de cada bacteria cultivable

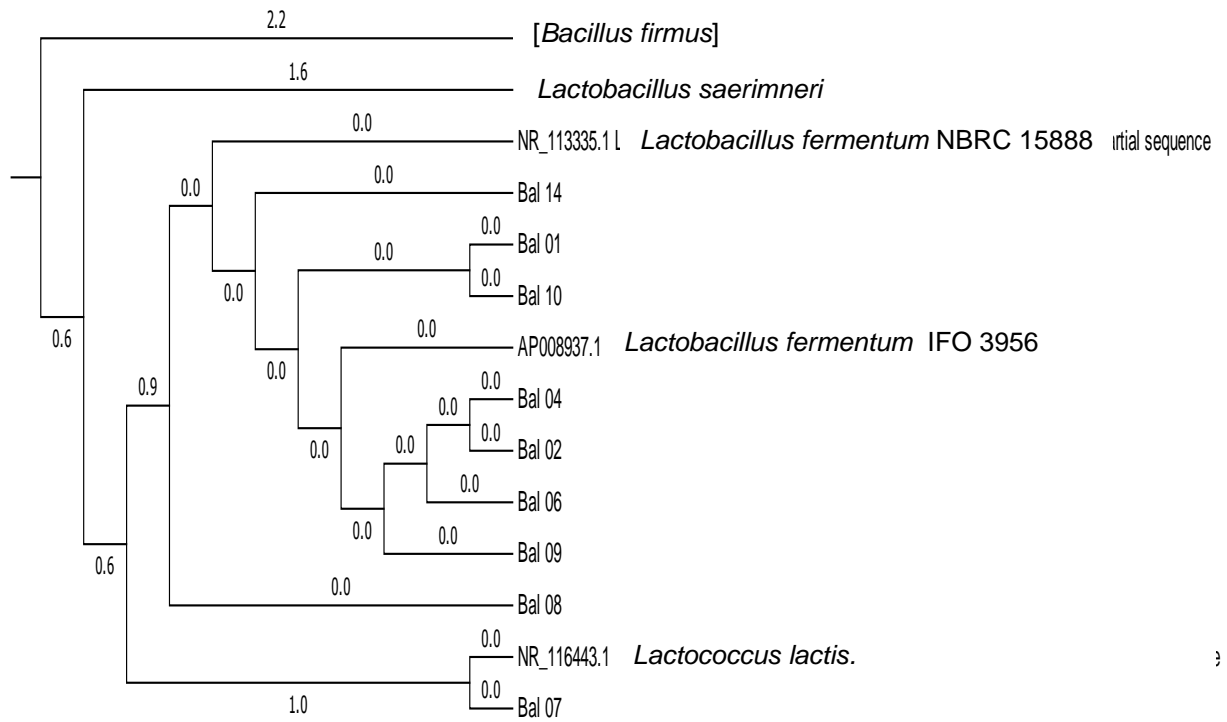


Figura 18. Árbol filogenético mostrando las relaciones de las BAL Identificación molecular y las identificadas mediante proteómica, asociadas al tracto digestivo de lechón.

5. DISCUSIÓN.

De los microorganismos naturales con acción benéfica que se encuentran como bacterias cultivables naturales en el tracto digestivo del lechón, fueron diferenciadas 67 cultivables en medio específico para BAL, inicialmente identificadas morfológicamente y bioquímicamente como bacterias ácido lácticas lo cual coincide con diferentes autores que mencionan el alto porcentaje de bacterias con características de ser BAL y de capacidad benéfica aisladas del tracto digestivo de vertebrados (Jurado-Gómez, Ramírez and Martínez 2013, Rosmini et al. 2004, Sánchez y Ochoa 2015, Cranwell 1985, Álvarez 2004, Sánchez et al. 2016, García et al. 2012, Partanen y Mroz 1999 y Buhnik-Rosenblau et al. 2012).

Las BAL encontradas en diferentes regiones del tracto digestivo de animales son caracterizadas por diferentes autores (Guerra et al. 2007, Samaniego y Sosa 2000, Isakow et al. 2007, Champagne et al. 2005 y Nguyen et al. 2015), tienen como principal característica la producción de ácido láctico como producto metabólico, entre ellos principalmente se encuentran los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus*, estas bacterias son semejantes a las BAL en estudio, con características bioquímicas que reportaron resistencia al pH y producción de extractos con pH bajo de 3,5 a 5,7 propias de las BAL (Guerra et al. 2007, Samaniego y Sosa 2000, Rosminiet et al. 2011, Gebert et al. 2015 y Gardiner et al. 2004).

Según el genoma se caracterizaron cepas de dos BAL, *Lactobacillus fermentus* y *Lactococcus lactis*, los cuales fueron utilizados como probiótico en la alimentación animal, específicamente como lo manifiesta Reque et al. (2000) y Nguyen et al. (2015), quienes utilizaron a *Lactobacillus fermentus* (aislados del pollo) como probiótico, probado en engorde de esta especie, mientras que el *Lactobacillus lactis*, se utilizó como probiótico en la alimentación balaceada de cerdos (De Lange et al. 2010, García et al. 2012 y Hong et al. 2011).

Las nueve BAL aisladas del tracto digestivo del lechón, demostraron viabilidad y resistencia a las condiciones sometidas en el tracto digestivo, donde fueron

tolerantes a la acidez, sales y bilis, al igual de las reportadas por Vélez 2014, Metzler-Zebeli et al. 2010, Pluske 2013 y Konstantinov et al. 2006.

Para determinar la acción bactericida y antibiótica de las BAL fue necesario confrontarlas con patógenos de la misma especie, para lo cual en el enfrentamiento con pruebas de antagonismo generaron halos, por contacto o competencia así como los reportados por Ruangpan y Tendencia 2004, Atlas et al. 2002 y Vélez 2014.

La presencia y tamaño de los halos de inhibición en el enfrentamiento de las BAL contra bacterias patógenas, permitieron diferenciar la acción bactericida o antibiótica de este tipo de bacterias (Vélez 2014).

Los patógenos encontrados frecuentemente en cerdos son del género *Escherichia* y *Salmonella*, los cuales causan desequilibrio biótico intestinal, producen graves diarreas y hasta el deceso del animal (Metzler-Zebeli et al. 2010, Pluske 2013 y Konstantinov et al. 2006), semejante a los cuadros producidos por *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei* que fueron los patógenos con mayor presencia en el trabajo.

Escherichia fergusonii tiene alta susceptibilidad a las BAL aisladas del tracto digestivo, como los reportes donde demostraron el control de *Escherichia coli* por otras bacterias de la flora bacteriana benéfica del animal (Bhandari et al. 2010, Pluske 2013, Estrada et al. 2005, Córdova 1993, Castillo 2000, Larsson et al. 2014, Villena y Ruiz 2002, Vergara 2008).

De los métodos que fueron utilizados, método directo o por competencia de nutrientes, según las pruebas de pocillo con extracto bacteriano neutralizado y sin neutralizar, utilizan los productos extracelulares como son ácidos orgánicos y proteínas que como extractos son más eficientes que los enfrentamiento directos (Metzler-Zebeli et al. 2010).

El extracto bacteriano sin neutralizar (acción ácida) mostraron pH ácido con presencia de ácidos orgánicos (acético, fórmico y láctico), los cuales tienen

efecto bactericida utilizados en la industria alimentaria y procesos de conservación (Metzler-Zebeli et al. 2010)

El extracto bacteriano neutralizado, donde la acción ácida es desactivada por la neutralización con NaOH, indica la acción de otras sustancias producidas por las bacterias conocidas como bacteriocinas, las cuales también tuvieron capacidad, bactericida y antibiótica semejante a las reportado por Looft et al. 2014, Torres 2002, Gatti 2013, Rodríguez 2011, Bravo et al. 2009, Del Coco 2015, Zapata et al. 2009, Pluske 2013, Bhandari et al. 2010 y Macouzet 2014.

Las proteínas encontradas según la proteómica, fueron de alta cobertura e identidad de sus nucleótidos, identificadas en su plenitud en el organismo *Bacillus firmus* y *Lactobacillus saerimneri* estas bacterias también han sido utilizados eficientemente como probióticos reportados por Oliveira y Gonzáles 2007, García et al. 2012, Partanen y Mroz 1999, NCBI 2015 y Buhnik-Rosenblau et al. 2012.

Las proteínas aisladas y caracterizadas de las BAL mediante la secuencia de nucleótidos en la proteómica son la ornithine monooxygenase y RNase J family beta-CASP llamadas Bacteriocinas según Amado et al. 2012, Torres 2002, Gatti 2013, Rodríguez 2011, Bravo et al. 2009.

La ornithine monooxygenase actúa como Sideróforo A (SidA) es una monooxygenasa dependiente de NAD, (P), H y oxígeno de ornitina en la biosíntesis del sideróforos, que limitan el uso de metales en la alimentación de la *Escherichia* produciendo la muerte de la bacteria demostrando su acción bactericida (Romero et al. 2012, Shirey et al. 2013).

La proteína RNase J family beta-CASP ribonuclease es una enzima que actúa como proteasas específica que causa destrucción celular de patógenos como acción antibiótica y degradación enzimática del material genético (Monrroy et al. 2009, Xue-Yuan et al. 2015, Newman et al. 2011, Pedersen 2005).

Ornithine monooxygenase y RNase J family beta-CASP ribonuclease, ambas proteínas intervienen en el metabolismo e impiden la nutrición de patógenos (Zohra 2016, Geng et al. 2016, Cechova et al. 2013).

Las proteínas encontradas en el *Lactobacillus saerimneri* tuvieron efecto bactericida y reúne las condiciones antibióticas, según las pruebas de inhibición realizadas, este organismo se reporta recientemente como un potencial inmunoprobótico para humanos aislado de la saliva (Taweechotipatr et al. 2009 y Rogne et al. 2007) y *Bacillus firmus* es utilizado como probiótico comercial de gran interés en industria de producción de alimento según Zohra et al. 2016, Meng et al. 2010, Rebolledo 2014, García et al., 2012, Partanen y Mroz 1999 y Buhnik-Rosenblau et al. 2012, NCBI 2015.

6. CONCLUSIONES.

1. Se encontraron nueve bacterias cultivables asociadas al tracto digestivo del lechón, capaces de sobrevivir a las condiciones adversas al tracto digestivo y ser calificadas como BAL.
2. Se identificaron molecularmente nueve cepas bacterianas del tracto digestivo del lechón, pertenecientes a *Lactobacillus fermentos* y *Lactococcus lactis*, con alta identidad y cobertura genética.
3. Se identificaron molecularmente dos bacterias patógenas la *Escherichia fergusonii* y *Sigella sonnei* con alta identidad y cobertura genética aisladas de las excretas de lechón con cuadros de diarrea.
4. Las BAL identificadas y caracterizadas tuvieron la capacidad de formar halos de inhibición y efecto antibiótico frente a *Escherichia fergusonii* y *Sigella sonnei*. en función a los métodos diferenciados.
5. El mejor método en la pruebas de antagonismos de las BAL frente a dos patógenos, fue cuando se utilizó extractos bacterianos sin neutralizar (acción acida).
6. Se presentaron halos de inhibición en las pruebas de antagonismo utilizando extracto bacteriano neutralizado permitiendo predecir la presencia de sustancia proteicas (bacteriocinas)
7. En las pruebas de antagonismo el patógeno que tuvo mayor sensibilidad fue la *Escherichia fergusonii* frente a las BAL en estudio expresada por la presencia y el diámetro de los halos de inhibición.
8. Las proteínas encontradas mediante proteómica en las bacterias seleccionas, pertenecen a bacteriocinas de BAL, las cuales tienen capacidad antibiótica ligada al efecto quelante de la (ornithine monooxygenase) y enzimáticos (RNase J family beta-CASP ribonuclease) que destruyen patógenos.

9. Las proteínas encontradas mediante la proteómica permitieron la identificación genómica según nucleótidos, con alta cobertura e identidad de dos organismos como *Bacillus firmus* y *Lactobacillus saerimneri*, del orden *Lactobacillaceae* relacionadas filogenéticamente con *Lactobacillus fermentus* y *Lactococcus lactis*, identificados inicialmente como BAL y todas reportadas con efecto probiótico y antibiótico.

7. RECOMENDACIONES.

1. Realizar el estudio de BAL del tracto digestivo de diferentes animales domésticos y utilizarlos en mejorar la salud y alimentación de la misma especie animal.
2. Realizar aislamiento y cultivo de BAL para ser utilizados como probióticos en diferentes especies animales.
3. Realizar ensayos de uso de extractos bacterianos de BAL como un complemento de la alimentación animal.
4. Obtener bacterias estabilizadas biológicamente, con capacidad antibiótica en cerdos de diferentes edades para su uso generalizado.
5. Medir el efecto antibiótico de las BAL frente a otras bacterias patógenas del tracto digestivo del lechón.
6. Estudiar la viabilidad a la producción de extractos bacterianos bactericidas en producción comercial de lechones.
7. Identificar consorcios bacterianos con capacidad antibiótica.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Acero, F. y M. Gómez. 2011. Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal. Repertorio de Medicina y Cirugía, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud. Bogotá Colombia D.C. *Revista médica* 20, 2:74.
- Agudelo, L. N. 2014. Estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido láctico y su aplicación en la industria de alimentos. Tesis doctoral, Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.
- Alfaro, A. R., M. Guevara y I. Gonzales. 2010. Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Rev. Perú biol.* 17 (3): 359-364 Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332010000300011>. (Accedido 2016-02-20).
- Álvarez, S. J. 2004. Evaluación de diferentes dosis de un preparado biológico de bacterias lácticas en cerdos en ceba, *Revista Electrónica de Veterinaria Redvet*, España, (6): Disponible en línea: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060604> (Accedido 2016-05-25).
- Amado, I., C. Fuciños, P. Fajardo, N. Guerra and L. Pastrana. 2012. Evaluation of two bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria as inoculants for controlling *Listeria monocytogenes* in grass and maize silages. *Animal Feed Science and Technology*, 175(3), 137-149.
- Atlas, R., B. Atlas, R. Bartha, R. Gentilini, E. Martino, P. Pennimpede y T. Michael. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Madrid. España. Addison Wesley.
- Bavera, G., O. Bocco, H. Beguet y A. Petryna. 2002. Promotores del crecimiento y modificadores del metabolismo, Cursos de Producción Bovina de Carne, F.A.V. UNRC. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar (Accedido 2016-05-25).

- Bhandari, S., F. Opapeju, D. Krause and C. Nyachoti. 2010. Dietary protein level and probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88 challenge: Performance and gut microbial population. *Livestock Science* 133, 11th International Symposium on Digestive Physiology of Pigs 1: 185-188.
- Blajman, J., M. Zbrun, D. Astesana, A. Berisvil, A. Sarpen, M. Fusari, Soto, M. Signorini, M. Rosmini y L. Frizzo. 2015. Artículo especial: probióticos en pollos parrilleros: una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Revista Argentina De Microbiología* 47, 360-367.
- Borrueal, N. 2007. Probióticos y prebióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal gastroenterología y patología. Hospital de la Vall d'Hebron. Barcelona. España 30: 7.
- Bou, G., A. Fernández-Olmos, C. García, J. Sáez-Nieto y S. Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29 8: 601-608.
- Bravo, L., M. Correa, J. Clausell, A. Fernández, A. Ramírez, F. Núñez, L. Yudith y C. Yanaika. 2009. Caracterización de factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de pacientes con diarrea aguda en Cuba / Virulence factors and in vitro susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* isolated from diarrhea episodes in Cuba. *Revista Chilena De Infectología* 3: 233.
- Buhnik-Rosenblau, Keren, V. Matsko-Efimov, M. Jung, H. Shin, Y. Danin-Poleg and Y. Yechezkel. 2012. Indication for Co-evolution of *Lactobacillus johnsonii* with its hosts. *BMC Microbiology* 12 (1): 149-158.
- Cadillo, J. 2008. Producción de porcinos. Lima, Perú: Talleres Gráficos Juan Gutenberg. 512 p

- Caja, G., E. González, C. Flores, M. Carro y E. Albanell. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probiótico, enzimas y ácidos orgánicos. Avances en nutrición y alimentación animal. Fira de Barcelona, España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, 193-214.
- Carro, M. y M. Ranillas. 2002. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. Albeitar, España, Mayo 2002. Departamento de Producción Animal I, Universidad de León, España. Disponible en: www.produccion-animal.com.a (Accedido 2016-06-22).
- Casaburi, A., V. Di Martino, P. Ferranti, L. Picariello and F. Villani. 2016. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. Food Control, 59: 31-45.
- Castillo, W. 2000. Alteraciones en el sistema digestivo de lechones destetados precozmente. En: XXIII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Huánuco, Perú.
- Cechova, D., K. Novakova, M. Mikulik, O. Novotna, J. Julak, P. Zanvit and L. Prokesova. 2013. Immunomodulatory properties of subcellular fractions of a G+ bacterium, *Bacillus firmus*. Folia Microbiologica no. 58 (2): 111-21.
- Champagne, C., N. Gardner, y D. Roy. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Crit Rev Food Sci Nutr 45: 61-84.
- Chythanya, R., I. Karunasagar y I. Karunasagar. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. Aquaculture, 208(1), 1-10.

- Collado, M. y Y. Sanz. 2007. Characterization of the gastrointestinal mucosa-associated microbiota of pigs and chickens using culture-based and molecular methodologies. *J Food Prot* 70: 2799-2804.
- Córdova, P. 1993. Alimentación animal. Perú: Ed EDITEC. 244 p.
- Cueto-Vigil, M., Y. Acuña-Monsalve y J. Valenzuela-Riaño. 2010. Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño / in vitro evaluation of probiotic potential of lactic bacteria acid isolated from coastal serum. *Actualidades Biológicas* 93: 129. De Lange, C., J. Pluske, J. Gong, y N. Nyachoti 2010. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Sci* 134: 124-134.
- Del Coco, V. 2015. Los microorganismos desde una perspectiva de los beneficios para la salud. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 171-173.
- Deusch, S., B. Tilkoca, A. Camarinha y J. Seifert. 2015. News in livestock research — use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals computational and structural biotechnology journal 13: 55-63.
- Dulanto, G. 2013. Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de " langostino blanco" *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA).
- Espinoza, L. 2015. Guía práctica sobre la técnica de PCR INECC Capítulo diecisiete. Las herramientas moleculares. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf> (Accedido 2016-06-22).
- Estrada, M., R. Gutiérrez and C. Montoya. 2005. Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* / in vitro evaluation of the bactericidal effect of native stocks

of *Lactobacillus* sp. against *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional De Agronomía, Medellín*. 1: 2601.

FAO, 2006, Joint FAO/WHO Workshop Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Rome (Italy). Nutrition and Consumer Protection Div. FAO, Geneva (Switzerland) WHO, and AGN.. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation / Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Cordoba, Argentina, 1-4 October 2001. Report of a Joint FAO/WHO Workshop Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 Apr-1 May 2002." FAO Food And Nutrition Paper (FAO) 85: AGRIS

García, M., Y. Sorrondegui, Y. López y A. Carcassés. 2012. Empleo de probióticos en los animales. Sitio argentino de Producción Animal. Disponible en: www.produccion-animal.com (Accedido 2016-06-22).

Gardiner, G., P. Casey, G. Casey, P. Lynch, P. Lawlor, C. Hill, G. Fitzgerald, C. Stanton and R. Ross. 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Applied And Environmental Microbiology* 4: AGRIS

Gatti, M. 2013. Cerdos Criados Con Antibióticos: Un Peligro Para La Salud Humana 2013. Universo Porcino. Investigación y desarrollo. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. (Accedido 2016-05-25).

Gebert, S., T. Rehberger author and C. Maxwell. 2015. *Lactobacillus brevis* strain 1E1 administered to piglets through milk supplementation prior to weaning maintains intestinal integrity after the weaning event. AGRIS, EBSCOhost.

Geng, C., X. Nie, Z. Tang, Y. Zhang, J. Lin, M. Sun y D. Peng. 2016. A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematocidal activity and

- degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. *Scientific Reports*, 6, 25012.
- Guerra, N., A. Torrado, C. López y L. Pastrana. 2005. Modelling the fed-batch production of pediocin using mussel-processing wastes *Proc. Biochem.* 40: 1071–1083.
- Guerra, N., P. Bernárdez, J. Méndez, P. Cachaldora and L. Castro. 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 134(1), 89-107.
- Gustincich, S., G. Manfiolett, G. Del Sal, C. Schneider and P. Carnici. 1991. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*. 11(3): 298-302.
- Gupta, V. and R. Garg. 2009. Probiotics. *Indian journal of medical microbiology*, 27(3), 202.
- Hong, T., V. Passoth and J. Lindberg. 2011. Bacterial diversity at different sites of the digestive tract of weaned piglets fed liquid diets. *Asian Austral J Anim Sci* 24: 834-843.
- Isakow, W., L. Morrow and M.H. Kollef. 2007. Probiotics for Preventing and Treating Nosocomial Infections Review of Current Evidence and Recommendations. *Chest Journal*, 132(1), 286-294.
- Jiménez, J. 2010 Aislamiento e identificación de bacterias patógenas, *Escherichia coli* en cerdos lactantes con diarrea, Tesis, Facultad de Medicina veterinaria, Universidad Veracruzana Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/693/1/Fatima>.(Accedido2016-05-25).

- Jurado-Gómez, H., T. Ramírez y B. Martínez. 2013. Evaluación *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* como alternativa al uso de antibióticos en lechones. *Revista MVZ Córdoba* 18: 3648-3657.
- Karpinski, T. and A. Szkaaradkiewicz. 2015. Las bacteriocinas, Enciclopedia de Alimentación y Salud. *Pol J Microbiol*, 62(3), 312-319
- Kim, H., K. Borewicz, B. White, R. Singer, S. Sreevatsan, Z. Tu and R. Isaacson. 2012. Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (38): 15485-15490.
- Klose, V., K. Bayer, R. Bruckbeck, G. Schatzmayr and A. Loibner. 2010. In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. *Veterinary Microbiology*. 3-4: AGRIS.
- Konstantinov, S., A. Awati, B. Williams, B. Miller, P. Jones, C. Stokes, A. Akkermans, H. Smidt and W. de Vos. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology* 8 (7): 1191-1199.
- Kuehl, R. O. 2001. Diseño de experimentos Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación Segunda edición. The University of Arizona. COPYRIGHT© 2001 por International Thomson Editores, S.A. de C.V., una división de Thomson Learning Estados Unidos de Norte América 661 p.
- Kumar, A., A. Vlasova, L. Zhe, S. Kuldeep Chattha, S. Kandasamy, M. Esseili, Z. Xiaoli, G. Rajashekara and L. Saif. 2014. In vivo gut transcriptome responses to *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* in neonatal gnotobiotic piglets. *Gut Microbes* 5 (2): 1.
- Kurzak, P., M. Ehrmann and R. Vogel. 1998. Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *Systematic and applied microbiology*, 21(4), 588-592

- Lamendela, R., J. Santo Domingo, S. Ghosh, J. Martinson and D. Oerther, 2011. Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiology* 11: 103.
- Larsson, J., R. Lindberg, A. Aspan, R. Grandon, E. Westergren, y M. Jacobson. 2014. Neonatal piglet diarrhoea associated with enteroadherent *Enterococcus hirae*. *J Comp Path* 151: 137-147.
- Leroy, F. y L. De Vuyst. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15(2): 67-78.
- Looft, T., H. Allen, B. Cantarel, U. Levine, D. Bayles, P. David, D. Alt, B. Henrissat and T. Stanton. 2014. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations. *The ISME journal*, 8(8), 1566-1576.
- López-Álvarez, J. 1976, *Escherichia coli*, mecanismos de patogenicidad, Departamento de bacteriología Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia, Universidad Autónoma de México, Ciencias veterinarias 01: Disponible en: www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c01.pdf. (Accedido 2016-05-16).
- Lusiastuti, A., T. Sumiati and W. Hadie. 2013. Probiotik *Bacillus firmus* untuk pengendalian penyakit *Aeromonas hydrophila* pada budidaya ikan lele dumbo, *Clarias gariepinus*. *Jurnal Riset Akuakultur*, 8 (2) 253-264.
- Luque, J. y A. Herraes., 2006. Biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en la salud, departamento de Bioquímica y Biología molecular, Univerwsidfad de Alcalá, Alcalá de Henares Madrid. Editorial Harcourt. Grafica Muriel S.A 469.

- Mallo, J., J. Rioperez y P.Honrubia. 2010. The addition of *Enterococcus faecium* to diet improves piglet's intestinal microbiota and performance. *Livestock Sci* 133: 176-178.
- Macouzet, M. 2014. Probiótico: componentes claves de la producción animal moderna Colaboración de AgroBio México, Universidad McGill, Canadá Centro de Investigación y Desarrollo de Alimentos, Ministerio de Agricultura y Agroalimentación de Canadá.
- Maldonado, E. 2002. Biología Molecular en Medicina, Biología molecular y salud, Colección de textos politécnicos, editores Limusa SA de CV Grupo Noriega Editores, México, Colección de textos politécnicos.
- Meng, Q., L. Yan, X. Ao, T. Zhou, J. Wang, J. Lee and I. Kim. 2010. Influence of probiotics in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, meat quality and blood characteristics in growing-finishing pigs. *Journal of animal science*, 88(10), 3320-3326.
- Metzler-Zebeli, B., S. Hooda, R. Pieper, R. Zijlstra, A. van Kessel, R. Mosenthin and M. Gänzle. 2010. Nonstarch polysaccharides modulate bacterial microbiota, pathways for butyrate production, and abundance of pathogenic *Escherichia coli* in the pig gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 76 (11): 3692-3701
- Monrroy, M., T. Castro, F. Fernández y L. Mayorga 2009. Bacteriocinas producidas por bacterias prebióticas Laboratorio de Alimento Vivo, Depto. El Hombre y Su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México, Biotecnología, UAM-I 2009.
- Mora, I., J. Cabrefiga y E. Montesinos. 2011. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus strains* from plant environments. *International Microbiology*, 14: 213-223.

- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2015. Database resources of National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 43: D6-D17.
- Newman, J., L. Hewitt, C. Rodrigues, A. Solovyova, C. Harwood and R. Lewis. 2011. Article: Unusual, Dual Endo- and Exonuclease Activity in the Degradosome Explained by Crystal Structure Analysis of RNase J1. *Structure* 19, 1241-1251.
- Nguyen, A., D. Nguyen, M. Tran, L. Nguyen, A. Nguyen and T. Phan. 2015. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH16 strain from chicken gastrointestinal tracts for use as a feed supplement to promote weight gain in broilers. *Letters In Applied Microbiology* 60 (6): 580-588.
- Nodarse, H. 1998. Valoración in vitro de discos para antibiogramas de producción nacional 1998 Instituto Superior de Medicina Militar Dr. Luis Díaz Soto *Revista Cubana Medicina Ciudad de la Habana Cub Med Mil* 27(2):
- Oliveira, G. y I. Gonzales. 2007. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica, Unidad de Nutrición Clínica y Dietética. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. Málaga. Instituto de Salud Carlos III. España *Nutr Hosp*. 22 (2):26-34
- Parra, R. 2010. Review lactic acid bacteria: functional role in the foods. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105.
- Partanen, K. and Z. Mroz. 1999. Organic acid for performance enhancement in pig diets. *Nutr Res Rev* 12: 117-145.
- Pedersen, C., S. Roos, H. Jonsson and J. Lindberg, 2005. Performance, feeding behaviour and microbial diversity in weaned piglets fed liquid diets based on water or wet wheat-distillers grain. *Archives of animal nutrition* 59, 3:165-179.

- Pieper, R., P. Janczyk, R. Schumann and W. Souffrant. 2006. The intestinal microflora of piglets around weaning with emphasis on lactobacilli. *Archiva Zootechnia*, 9, 28-40. (Pineda et al., 2012);
- Pluske, J. 2013. Feed- and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. *J Anim Sci Biotechnol* 4: 1.
- Ramírez, L. y D. Castaño, 2009. Metodologías Para Evaluar In Vitro La Actividad Antibacteriana De Compuestos De Origen Vegetal Universidad Tecnológica de Pereira *Scientia et Technica* XV (42).
- Rebolledo, A. 2014. Aislamiento, selección y caracterización de una bacteria ácido láctica porcina como probiótico en lechones post destete. Tesis de Magister en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias Palmira, Colombia. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/47647/1/1113628932_Angelo.pdf (Accedido 2016-05-16).
- Reque, E., A. Pandey, S. Franco y C. Soccol. (2000). Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 303-307.
- Rogne, P., G. Filmen, J. Nissen y P. Eugen. 2007. Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin lactococcin.
- Romero, E., M. Fedkenheuer, S. Chocklett, J. Qi, M. Oppenheimer and P. Sobrado 2012. Dual role of NADP (H) in the reaction of a flavin dependent N-hydroxylating monooxygenase. Contents lists available at SciVerse Science Direc, *Biochimica et Biophysica Acta* 1824: 850-857. Disponible en: www.elsevier.com/locate/bbapap (Accedido 2016-06-16).
- Rosmini, M., G. Sequeira, I. Guerrero, L. Martí, R. Dalla, L. Frizzo y L. Bonazza. 2004. Producción de prebióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev Mex Ing Quím* 3: 181-191.

- Ruangpan, L. y E. Tendencia. 2004. Chapter 1. Bacterial isolation, identification and storage. In Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Department, 3-11, Tigbauan, Iloilo, Philippines.
- Sabino, C. 1996. El proceso de investigación, Editorial el Lumen Hvmánitas, Buenos Aires, República Argentina, 91 pág. Disponible en: hugoperezidiart.com.ar/tallerdetesis-pdf/55-sabino-pp1-92.pdf (Accedido 2016-01-26).
- Samaniego, L. y M. Sosa. 2000. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Centro de Estudios Biotecnológicos, Facultad de Agronomía. Ciudad de Matanzas, Cuba.
- Sánchez, S. y M. Ochoa. 2015. Producción y valoración de alimentos para animales monogástricos, con ensilado biológico de restos del procesamiento de langostino (*Litopenaeus vannamei*) fermentados con lactobacilos. Scientia Agropecuaria 7: 181-189 Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo> (Accedido 2016-01-26).
- Sánchez, S., E. Benites, E. Ubillus, y M. Ochoa. 2016. Efecto de tres niveles de ensilado biológico de cabeza de *Penaeus*, en alimentación de cerdos (*Sus scrofa*) en las etapas fisiológicas de gestación y lactación. Manglar, 10(2), 27-38.
- SENASA, 2015. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Publicado el 22 de Julio de 1998 Decreto Supremo N° 015-98-AG Aprueba el Reglamento de Registro, Control y Comercialización de Productos de Uso Veterinario y Alimentos para Animales. Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe> (Accedido 2016-05-22).

- Shirey, C., S. Badiyan and P. Sobrado. 2013. Role of Ser-257 in the Sliding Mechanism of NADP (H) in the Reaction Catalyzed by the *Aspergillus fumigatus* Flavin-dependent Ornithine N5-Monooxygenase SidA. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(45), 32440–32448
- Song, D. Ibrahim, S. and S. Hayek 2012. Recent application of probiotics in food and agricultural science. *Probiotics*, InTech, Manhattan, 1-34.
- Steven, L. 1998. Ionóforos, antibióticos, probiótico y supresores del celo. Curso de Postgrado Sistema Intensivo de Producción de Carne. Río Cuarto. Convenio Ohio State University – U.N.R.C. www.produccion-animal.com.a
- Torres, C. y M. Zarazaga. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja. Logroño, Gaceta Sanitaria versión impresa ISSN 0213-9111 Gac Sanit v.16 n.2 Barcelona mar.-abr. 2002 Disponible en: <http://scielo.isciii.es/scielo.php> (Accedido 2016-01-15).
- Tamay, L. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real, *Tecnología de la Salud, investigación en discapacidad*, 2 (2): 70-78
- Taweechotipatr, M., Ch. Iyer, J. Spinler, J. Versalovic and S. Tumwasorn. 2009. *Lactobacillus saerimneri* and *Lactobacillus ruminis*: novel human-derived probiotic strains with immunomodulatory activities. *FEMS Microbiology Letters* 293 (1): 65-72.
- Vélez, J. 2014. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granjas del Aburrá sur, Tesis de Magister en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Medellín, Colombia. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/45835/1/32255433.2014.pdf> (Accedido 2016-05-22).

- Vivanco, F. 2007. Proteomica y Medicina, Departamento de Inmunología. Fundación Jiménez Díaz, curso de Biotecnología Aplicada Séptima edición, Sanidad y Ediciones, S.L. Capitán Haya, 60. 28020 Madrid, España P 15-30
- Xiong, J., Z. Qiaoni, L. Haiyan, X. Liqiu, L. Lin, S. Ming and Y. Ziquan. 2015. "Systemic nematicidal activity and biocontrol efficacy of *Bacillus firmus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*." *World Journal Of Microbiology and Biotechnology* 31(4): 661-667.
- Xue-Yuan, P., P. Bralley, G. Jones and B. Luisi. 2015. Linkage of catalysis and 5' end recognition in ribonuclease RNase J. *Nucleic Acids Research* 43(16): Disponible en: https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal (Accedido 2016-05-22).
- Yao, W., W. Zhu, H. Smidt and M. Verstegen. 2011. Cultivation-Independent Analysis of the Development of the *Lactobacillus* spp. Community in the Intestinal Tract of Newborn Piglets *Agriculture science in china* 10:3 2011
- Yimin, C., B. Yoshimi, N. Takashi and O. Tae-Kwang. 2005. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. In: Ramírez C. *Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune.* [Tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Sector de Tecnología.
- Zapata, S., J. Muñoz, O. Ruiz, O. Montoya y P. Gutiérrez. 2009. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. Grupo de Biotecnología Microbiana. Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 16(1): 1
- Zohra, R., U. Shah Ali, P. Sidra and A. Afsheen. 2016. Influence of different metals on the activation and inhibition of α -amylase from thermophilic

Bacillus firmus KIBGE-B28. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*
29(4): 1275-1278. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/publication/305113141> (Accedido 2016-05-22).

Anexos

Anexo 1

CÓDIGO DEONTOLÓGICO DEL COLEGIO MÉDICO VETERINARIO DEL PERU (CMVP)

DE LA DEONTOLOGÍA PROFESIONAL EN LA DOCENCIA E INVESTIGACIÓN

Artículo 84°.- El avance de las Ciencias Veterinarias se basa en la investigación y si no puede prescindir de una experimentación con animales vivos, en muchos casos, entonces el bienestar de éstos es prioritario para el investigador, por tanto los protocolos de investigación con animales vivos deberán ser aprobados y supervisados por los Comités que los centros de investigación, públicos o privados, tengan instituidos, pero en ningún caso se podrá violar las leyes de Protección Animal.

Artículo 85°.- La investigación con animales vivos debe basarse en las normas científicas aceptadas comúnmente y el sufrimiento físico y/o estrés de los animales experimentales deberá ser el mínimo posible, evitando su sufrimiento.

Artículo 86°.- El Médico Veterinario está obligado a tener una distinción clara entre procedimientos en fase de ensayo y aquellos que ya han sido aceptados como válidos y son practicados en el ejercicio de la Medicina Veterinaria clínica, porque el ensayo clínico de nuevos procedimientos no deberá privar al paciente de recibir un tratamiento aceptado como válido. Cuando se desee aplicar un tratamiento en fase de ensayo, deberá requerirse el consentimiento del propietario debidamente informado.

Artículo 87°.- El Médico Veterinario tiene el deber de comunicar y difundir, por escrito o verbalmente, a nivel profesional especializado, los descubrimientos realizados o las conclusiones de sus estudios científicos. Antes de divulgarlos a los medios de comunicación deberá someterlos a la opinión o criterio de organismos especializados o autoridades científicas en la materia.

www.cmvv.pe/wp-content/uploads/2013/04/Codigo-Deontologico.pdf

SECUNCIACION DE NUCLEOTIDOS ENCONTRADOS

Anexo 2

Lactobacillus fermentum IFO 3956 DNA, complete genome. SOURCE *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus

GGCCATCCTTGATCGGATCATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGTGGTTTTTAAAGTTCTGATGTAAGGAGCAGTGG
CTCAACCATTGTGTGCATTGGAAACTGGGAGAGTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCCGGAGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACTGACTGAGGCTCGA
AAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTCTAGTGTAGGGGAGC
TATAAGTTCTCTGTAGCGCAGCTAACGCATTAACGCATCCGCTGGGGAGTACGACCCAAAGTTGAAACTCAAAA
GGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
TCTTGACATACTCGTCTATCCTTAGAGATAAGGAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCATCATTAAAG
TTGGGCTAGCTAAGCGCAAGGAGGGCGCTTCTAAGGTAAGACCGATGACGGGTGATCACAAAAAGGAGAAAA
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTGCACAACCCGCGAGGGTGGCTAATCTCTT
AAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
CACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGGAAGTTGGGAGTACCCAAA
GTAGGTTGCCTAAGCGCAAGGAGGGCGCTTCTAAGGTAAGACCGATGACGGGTGATCACAAAAAGGAGAAAA
ACACACAGGGGGGGGTGGTTGCCCGCCCCCTCTCGGGAGGAGAGCGGGGCCTC Lactobacillus fermentum IFO
3956 DNA, complete genome. SOURCE *Lactobacillus fermentum* IFO 3956, *Lactobacillus fermentum* IFO 3956
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus. REFERENCE 1 Comparative genome
analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin
production AUTHORS Morita,H., Toh,H., Fukuda,S., Horikawa,H., Oshima,K., Suzuki,T., Murakami,M., Hisamatsu,S.,
Kato,Y., Takizawa,T., Fukuoka,H., Yoshimura,T., Itoh,K., O'Sullivan,D.J., McKay,L.L., Ohno,H., Kikuchi,J., Masaoka,T.
and Hattori,M. JURNAL DNA Res. 15 (3), 151-161 (2008) PUBMED 18487258. 2(bases 1 to 2098685) Direct
Submission, AUTHORS Hattori,M., Yamashita,A., Toh,H., Oshima,K. and Shiba,T. Submitted (16-MAR-2005)
Contact:Masahira Hattori University of Tokyo, Graduate School of Frontier Sciences; 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa,
Chiba 277-8562, Japan. (PubMed National Center for Biotechnology 2016)

Anexo 3

Lactobacillus fermentum strain NBRC 15885 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence. SOURCE *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fermentum*, Bacteria;
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;

AGGATGAACGCGGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCAACGCGTTGGCCCAATTGATTGATGGTGTGCTGCAC
CTGATTGATTTTGGTCGCAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCAGAAGCGGGGGA
CAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACGTTGTTGCGATGAACAACGCTTAAAAGATGGCTTCTCGC
TATCACTTCTGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCCTACCAAGGCGATGATGCATAG
CCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTC
TGTTGTTAAAGAAGAACGATGAGAGTAACTGTTTCATACGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGTCACGGCTAACT
ACGTGCCAGACGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAGAGTGCAGGC
AAGAGGGTAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGG
CTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAT
GCCGTAACGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAAGTGCAGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCG
CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCTAGAGATAGGGCGTTTCT
TCGGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTTGTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGTGAAGTGCAGGCTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAC
GAGTCGCGAACTCGCGAGGGCAAGCAAATCTTAAACCGTTCTCAGTTCGACTGCAGGCTGCAACTCGCCT
GCACGAAGTCGGAATCGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
GCCGCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACTTTTAGGAGCCAGCCGCTAAGGTG
GGACAGATGATT. *Lactobacillus fermentum* strain NBRC 15885 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. SOURCE
Lactobacillus fermentum, *Lactobacillus fermentum*, Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;
Lactobacillus. Encontrados en estudios relacionados con organismos benéficos según los autores, REFERENCE 1
TITLE NITE Biological Resource Center (NBRC) AUTHORS Miyashita,M.Unpublished. 2(bases 1 to 1501) Direct
Submission Submitted (23-APR-2014) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA.
3(bases 1 to 1501) Direct Submission AUTHORS Miyashita,M. and Nakagawa,Y.Submitted (15-APR-2011)
Contact:Mika Miyashita National Institute of Technology and Evaluation, NITE Biological Resource Center (NBRC);
Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan. (PubMed National Center for Biotechnology 2016)

Anexo 4

Lactococcus lactis subsp. *Tructae* Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Lactococcus.

GCGAGTGCAGGCGGTTCAATAGGGCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCCCCGGAAAGTTGCATCAGAAACTGTTNG
AACTTGAGTGCNAAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAG
TGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCAGCTAACGC
ATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCAGTGCAAACCTAAGAGA
TTAGCTGTTCCCTTCGGGGACGCTGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCAATTAGTTGCCATCATTAAAGTTGGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGCTACAAT
GGACGGTACAACGAGAAGCGAACCTGCCAAGGCAAGCGGATCTCTTAAAGNCGTTCTCAGTTCGGACTGTAGGC
TGCAACTCNNCTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CCTTGACACACCGCCCGTCAACACCATGAGAGTCTGTAACNNCCNAANCGGTGGGATAACCTTTATAGGAGT
CAGCCGTCTAAGGTAGGACAAATGATTAGGGTGAAGTCGTTAAACAAGGTAACCCGNAAA *Lactococcus lactis*
subsp. *Tructae* Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Lactococcus. REFERENCE 1(bases 1
to 1541) *Lactococcus lactis* subsp. *tructae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*)
and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) AUTHORS Perez, T., Balcazar, J.L., Peix, A., Valverde, A., Velazquez, E., de
Blas, I. and Ruiz-Zaruela, I. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61 (PT 8), 1894-1898 (2011) PUBMED 20833888. 2 (bases 1
to 1541) Direct Submission CONSRM NCBI RefSeq Targeted Loci Project Submitted (23-APR-2014) National Center
for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA. 3(bases 1 to 1541) Direct Submission. AUTHORS
Balcazar, J.L., Peix, A., Velazquez, E., de-Blas, I. and Ruiz-Zaruela, I. Submitted (29-MAY-2008) Microbiologia y
Genetica, Universidad de Salamanca, Doctores de la Reina s/n, Salamanca 37007, Spain. (PubMed National Center
for Biotechnology 2016)

Anexo 5

Escherichia fergusonii strain ATCC 35469 16S ribosomal RNA gene, complete
sequence. SOURCE *Escherichia fergusonii* ATCC 35469 *Escherichia fergusonii*
ATCC 35469 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
Enterobacteriaceae; Escherichia

TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGTTTC
GCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGAAACGGT
AGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATG
GGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCA
CACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC
TGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGGAGTAA
AGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCGCAGAAGAAGCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATA
CGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAAGTGTGAAA
TCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGC
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGTGTGCGACTTGG
AGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTCAAGCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGATGCAACGCGAAGA
ACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCT
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTG
CCAGCGGTCGGCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAGTC
ATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACAGTGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCA
AGCGGACCTATAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCCGGAATCGCTAGT
AATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTGG
GTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTACTGACTGGGGTGAAGTC
GTAACAAGGTA *Escherichia fergusonii* strain ATCC 35469 16S ribosomal RNA gene, complete sequence. SOURCE
Escherichia fergusonii ATCC 35469 *Escherichia fergusonii* ATCC 35469 Bacteria; Proteobacteria;
Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia. REFERENCE 1(bases 1 to 1542) Direct
Submission CONSRM NCBI RefSeq Targeted Loci Project. Submitted (28-JAN-2013) National Center
for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA. 2(bases 1 to 1542) Direct Submission. AUTHORS
Genoscope - C.E.A. Submitted (14-DEC-2008) Genoscope - Centre National de Sequencage :BP 191 91006 EVRY
cedex - FRANCE (PubMed National Center for Biotechnology 2016)

Anexo 6

Shigella sonnei strain CECT 4887 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. *Shigella sonnei* *Shigella sonnei* Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; *Shigella*.

```
GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGTTTTCG
CTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAAACGGTA
GCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGG
GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACA
CTGGAAGTGAACGCTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
ATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAG
TTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGAGAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAT
CCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAAAGACTGACGCT
CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGATTGGA
GGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT
TAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAA
CCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCT
GCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTG
CCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTC
ATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCA
AGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGG
GTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTC
GTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTTCTGAGCTT Shigella sonnei strain CECT
4887 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Shigella sonnei Shigella sonnei Bacteria; Proteobacteria;
Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Shigella.REFERENCE 1Taxonomic note: SOS,
Sequencing Orphan Species: filling the gaps in the 16S rRNA gene sequence database for all classified species with
validly published names. AUTHORS Yarza,P., Euzeby,J., Sproer,C., Tindall,B.J., Pukall,R., Spring,S., Lang,E.,
Gronow,S., Verbarq,S., Klenk,H.-P., Crouch,A., Beck,B., Unosson,C., Moore,E.R., Nakagawa,Y., Clermont,D.,
Janssens,D., Sakamoto,M., Iida,T., Kudo,T., Kosako,Y., Oshida,Y., Ohkuma,M., Arahal,D.R., Spieck,E., Roeser,A.P.,
Figge,M., Park,D., Buchanan,P., Nicholson,A., Cifuentes,A., Schleifer,K.-H., Amann,R., Gloeckner,F.O. and Rossello-
Mora,R. Unpublished. 2(bases 1 to 1530) Direct Submission. CONSRTM NCBI RefSeq Targeted Loci Project
Submitted (25-NOV-2013) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA. 3(bases 1
to 1530) Direct Submission. Arahal,D. Submitted (20-MAY-2011) to the INSDC. University of Valencia, Spanish Type
Culture Collection (CECT), Edificio de Investigacion,Campus de Burjassot, Burjassot 46100, SPAIN. (PubMed National
Center for Biotechnology 2016
```

Anexo 7

BASE DE DATOS DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

halos de inhibición de bacterias del lechón

directo a *Escherichia fergusonii*

CEPAS	Diametro de halos													
1	8.5	8.6	6	7.8	8.0	8	7.8	8	8.6	9	8	6	9	6
2	7.0	7.0	8	7.7	8.0	9	7.7	8	7	8	8	6	9	7
4	8.6	8.8	6	7.0	7.7	8	7.0	6	6	6	8	6	7	6
6	7.0	7.0	6	7.3	7.2	7	7.3	8.5	9	8	8	6	8	6
7	6.0	6.0	6	6.4	6.3	7	6.4	8	6	6	6	6	7	6
8	7.2	10.3	8.9	8.1	8.2	7	8.1	9	9	10	8	6	8	6
9	7.9	6.0	6	7.2	7.5	8	7.2	8	6	6	8	8	9	6
10	8.0	8.0	6	7.4	7.8	8	7.4	7	7	7	8	6	9	7
14	6.0	6.0	6	7.2	7.3	9	7.2	8.5	6	8.5	9	6	8	6

halos de inhibición de bacterias del lechón

Directo a *Shigella sonnei*

CEPAS	Diametro de halos													
1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
6	6	6	7	7	7	7	6	6	7	7	6	6	6	6
7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
9	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
10	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
14	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

a *Escherichia fergusonii*

halos de inhibición de bacterias del lechón

Sin neutralizar

CEPAS	Diametro de halos													
1	11.1	12.5	9.5	6	10.26	0	9.17	11	6	10	9.5	10		
2	12	8.1	9.44	8	12	8	9.18	11	7	11	9.44	8.1		
4	12.2	12.7	10.6	7	12.9	7	9.97	11	8	11.5	10.6	13.5		
6	9.14	8.32	9.65	0	7.32	0	8.26	11	0	12	9.65	11.5		
7	11.8	11.5	12	0	11.9	0	11.7	13	0	11.5	12	13		
8	12.1	8.8	9.13	7	7.54	8	8.41	11	7	11.5	9.13	10		
9	7	0	8.55	7	8.82	7	7.16	12	6	12	8.55	10		
10	10	9.42	9.31	9	8.12	6	8.59	11	9	11	9.31	11		
14	7.32	7.54	7.88	7	8.64	7	7.25	9	6	9	7.88	10		

sin neutralizado a *Shigella sonnei*

CEPAS	Diametro de halos													
1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
2	6	6	6	6	7	6	6	6	7	6	7	6	6	6
4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	6	7	7	7	7
7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
9	8	7	8	7	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8
10	7	7	8	7	7	7	8	7	7	7	7	7	7	7
14	6	7	7	7	6	7	7	7	6	6	6	6	6	7

halos de inhibición de bacterias del lechón

neutralizado a *Escherichia fergusonii*

CEPAS	Diametro de halos													
1	9.34	6	10	6	8.201	6	7.69	9	8.56	10.3	8.2	9		
2		7	8	8	7.621	7	7.53		8.1	7	7.62	8		
4	8.08	7	8	7	7.815	7	7.63	8	8.56	8.12	7.81	9		
6	9.14	6	7	7	7.586	6	7.3	9	8.32	7.32	7.59	8		
7	11	6	10	6	9.298	6	8.54	11	12	10.2	9.3	12		
8	8.8	6	8	8	8.13	8	8.02	9	8.8	7.54	8.13	9		
9	7	6	9	7	7.201	6	6.96	7	0	8.82	7.2	0		
10	10	7	8	7	8.417	7	8.09	10	9.42	8.12	8.42	9		
14	7.32	6	9	6	7.192	6	6.92	7	7.54	8.64	7.19	8		

neutralizado a *Shigella sonnei*

CEPAS	Diametro de halos													
1	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
2	7	7	7	6	7	7	7	6	7	7	7	7	7	7
4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
8	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
9	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
10	7	7	7	7	8	7	7	7	7	7	7	8	7	7
14	7	6	7	6	7	7	7	6	7	7	7	7	7	7

DEDICATORIA

Dedicado a:

Mi madre: Carmen Suárez Vda. de Sánchez, por su incondicional apoyo a la realización de sus hijos.

Mi Esposa Gloria María Ocho Mogollón por acompañamiento incondicional en el desarrollo de nuestra vida profesional y personal.

Mi Hija, María Grazia por ser el motivo de superación.

Mis Hermanos, Eduardo, Manuel, Martin, Socorro y Maritza por estar siempre presente.

Y todos los que comparte nuestros esfuerzos, Karina, Milton, Carlos Billy, Adolfo.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud a:

La Universidad Nacional de Tumbes

Todos los que hicieron posible este trabajo (Ruben Alfaro, Carmen Rojas, Wendy Castillo, Piter Peña, Froilan Lupuche, Teresa Luna y otros)