

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



## **Capacidad de Bioconversión de Selenio inorgánico por bacterias ácido lácticas desarrolladas en un medio enriquecido**

**Tesis**

**Para obtener la Especialidad en Biotecnología**

**Presenta:**

**Xochitl Martínez Ramírez**

**Directora:** Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano

**Asesor:** Dr. Luis Guillermo González Olivares

**Asesor externo:** Dra. Araceli Castañeda Ovando



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00174

Matrícula: 2152800981

CAPACIDAD DE BIOCONVERSIÓN DE SELENIO INORGÁNICO POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DESARROLLADAS EN UN MEDIO ENRIQUECIDO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 13 del mes de diciembre del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO  
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES  
DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO

siendo los dos primeros asesores de la alumna y lectora la tercera, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA

DE: XOCHITL MARTINEZ RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:



XOCHITL MARTINEZ RAMIREZ  
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

*Aprobado*

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESORA

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

ASESOR

DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

LECTORA

DRA. ARACELI CASTAÑEDA OVANDO

---

## Agradecimientos

Agradezco la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por abrirme sus puertas al aceptarme para realizar mis estudios, los cuales me han abierto un nuevo mundo de conocimientos.

A mis asesores, Dra. Gaby, Dr. Luis y Dra Aracely, muchas gracias por todo su apoyo otorgado y su paciencia para la elaboración de ésta tesis, agradezco especialmente al Dr memo, que me ha enseñado muchas cosas y me ha apoyado en otras tantas.

A mi Familia, mis padres y hermanos que siempre han estado para apoyarme, escucharme y levantarme, esto no se hubiera logrado sin ustedes.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Guadalupe, Miriam, Jesica, Fátima y Paola, Emmanuel, Chucho, Pinito, muchas gracias por estar, por ayudarme y orientarme.

Finalmente y no menos importante, a Dios, el motor de mi vida...

*Si caminas solo llegarás más rápido pero si caminas acompañado irás más*

*lejos*

---

## Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	1	5.2.1 Determinación de la	
2. ANTECEDENTES .....	2	concentración crítica de	
2.1 Bacterias ácido lácticas.....	2	inhibición .....	12
2.2 Bacterias probióticas .....	3	5.2.2 Determinación de la zona de	
2.3 Selenio.....	4	desaceleración .....	13
2.3.1 Usos del selenio en el cuerpo		5.3 Análisis de selenio.....	13
humano.....	5	5.4 Análisis estadístico de los	
2.3.2 Selenoproteínas .....	6	resultados.....	14
2.3.3 Estudios con selenio .....	7	6. Resultados y discusión .....	15
2.4 Estudios del metabolismo de		6.1 Análisis de la tolerancia al	
bacterias probióticas y selenio ..	8	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> .....	15
3. OBJETIVOS.....	10	6.2 Determinación de la	
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	10	concentración de inhibición	
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10	crítica .....	15
4. Hipótesis .....	11	6.4 Fermentación en medios	
5. Metodología.....	12	suplementados con Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ...	20
5.1 Muestras .....	12	6.5 Determinación de selenio .....	23
5.2 Fermentación en medios		7. CONCLUSIONES.....	26
suplementados con Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ...	12	8. Referencias .....	27

---

## Índice de Figuras

Fig. 1 rutas metabólicas del selenio en hígado y riñón (Krittaphol et al., 2011)	9
Fig. 2 Determinación de la concentración de tolerancia para <i>L. casei</i> Shirota	17
Fig. 3 determinación de la concentración de tolerancia para <i>L. johnsonii</i>	18
Fig. 4 Crecimiento de <i>L. casei</i> Shirota en medios MRS y MRS enriquecido con Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	20
Fig. 5 Velocidad de crecimiento para <i>L. casei</i> Shirota	21
Fig. 6 Cinéticas de crecimiento de <i>L. johnsonii</i> en un medio MRS y MRS enriquecido con selenito.	22
Fig. 7 Velocidad de crecimiento para <i>L. johnsonii</i>	23

## Índice de Tablas

Tabla 1 Determinación de la concentración de tolerancia para <i>L. casei</i> Shirota	15
Tabla 2 Determinación de la concentración de tolerancia para <i>L. johnsonii</i>	16
Tabla 3 Rangos de crecimiento de bacterias ácido lácticas y R <sup>2</sup>	16
Tabla 4 Porcentaje de absorción de selenio por especies de <i>Lactobacillus</i>	24

## **1. INTRODUCCIÓN**

El selenio (Se) es un mineral que se debe de consumir en bajas concentraciones debido a que es altamente tóxico, de acuerdo con Reid *et al.*, (2004), la dosis recomendada es de 55  $\mu\text{g}/\text{día}$  y su límite de consumo es de 400  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Este elemento puede presentarse bajo su forma inorgánica u orgánica, esta última mayormente aprovechable que la primera (Krittaphol *et.al.*,2011).

Entre las principales funciones de este mineral en el organismo humano, están, la de regular la función de la glándula tiroides, promover la producción de anticuerpos y promover la salud reproductiva mejorando la calidad del esperma. Además de ello, se ha comprobado que una deficiencia de selenio, influye directamente en el estado emocional de los seres humanos (Brown & Arthur, 2001)

Diversos estudios han utilizado la forma inorgánica del Se, como selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ); se añade a plantas y alimentos destinados al consumo animal, con el fin de aumentar valores nutritivos. Se ha comprobado que añadirlo en esta forma química, permite ser metabolizado por las bacterias ácido lácticas, las cuales presentan la capacidad de biotransformarlo en una especie orgánica. Este proceso puede ser a través de diferentes métodos de detoxificación, produciendo  $\text{H}_2\text{Se}$ , para finalmente convertirse a  $\text{Se}^0$ , el cual puede ser aprovechado por la bacteria insertándolo en algunas proteínas.

En este trabajo, el principal objetivo, fue estudiar el comportamiento de las bacterias ácido lácticas, en medios enriquecidos con diferentes concentraciones  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , con el fin de determinar la concentración de este compuesto que inhibe su crecimiento. Así mismo se verificó la concentración de selenio absorbida durante el desarrollo de las bacterias ácido lácticas estudiadas.

---

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL), han sido ampliamente utilizadas en la producción de alimentos fermentados en diversos procesos industriales. Algunas de estas bacterias son clasificadas como probióticas y, ciertas especies se han considerado para la desintoxicación de metales pesados (Caballero-Araúz *et al.*, 2008).

Entre estos metales pesados se encuentra el selenio, el cual en altas concentraciones es tóxico para plantas, animales y microorganismos. Al encontrarse en un medio con altas concentraciones de este no metal, las BAL, utilizan un mecanismo de detoxificación mediante la reducción de selenato a selenito, lo que finaliza con la forma no tóxica del selenio, como selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ), el cual es empleado por algunos microorganismos para su crecimiento. Además de ello, dicho elemento, puede reemplazar al azufre por selenio en pequeñas cantidades, incorporándose en las proteínas celulares, como la selenometionina y la selenocisteína (Andreoni *et al.*, 2000).

La capacidad de las BAL de asimilar el Se, y algunos otros metales como Cadmio y Zinc, tiene una gran importancia fisiológica y nutricional, tanto para los humanos como para los microorganismos, los cuales concentran el selenio del medio en sus células produciendo una forma orgánica de Se a partir de una forma inorgánica lo que permite un aprovechamiento más fácil de éste mineral (Bomba *et al.*, 2002). Esta característica de las BAL, presenta dos ventajas, en la primera, su uso en alimentos fermentados, puede proveer una fuente de bajo costo de Se orgánico para humanos y animales. Por otra parte, como segunda ventaja, se presenta que ciertas BAL se consideran como probióticas, las cuales al poder resistir el paso del tracto gastrointestinal y establecerse en el intestino, tienden a acumular Se que ingiere el huésped, lo cual a su vez, alterará la expresión de varias selenoproteínas de este último (Pophaly *et al.*, 2014). Las bacterias introducen el selenio en aminoácidos, que en esta forma, se insertan en el centro

---

catalítico de las enzimas. Por otra parte, el selenio también puede usarse para sintetizar selenoproteínas como la glutatión peroxidasa, tioredoxina reductasa, las cuales juegan un papel muy importante como antioxidantes (Gan, *et al.*, 2014).

## ***2.2 Bacterias probióticas***

Las bacterias probióticas son definidas como “microorganismos vivos adicionados a alimentos que son benéficos para la salud” (Aggett *et al.* 1999). En este grupo se incluyen géneros como *Lactobacilli* y *Bifidobacterium* (Kieran *et al.*, 2003). La concentración mínima de ingesta de bacterias probióticas que se recomienda es de  $10^6$  UFC/mL (Shah, 2000).

La importancia del uso de bacterias probióticas es debido a que han demostrado importantes beneficios a la salud (Scholz-Ahrens *et al.*, 2015), específicamente por su adherencia al tracto gastrointestinal en donde promueven un balance en la microbiota, evitando la colonización de bacterias patógenas y toxinas, y al mismo tiempo, ayudan al metabolismo de nutrientes que el organismo por sí mismo no puede aprovechar (Borchers, 2009), es decir, los productos finales de la fermentación, como polisacáridos, péptidos y proteínas, pueden ser absorbidos por el hospedador y éstos pueden influir en la salud y estado mental del hospedador (Saier & Mansour, 2005). Dichas bacterias probióticas cumplen con características que aseguran su efecto benéfico sobre el organismo hospedador, como no ser patógenas, resistencia a las sales biliares así como al ácido gástrico, adhesión al tejido epitelial del intestino, en donde producen sustancias antimicrobianas y nutraceúticas (Leroy *et al.*, 2008). Además de ello, mejoran la respuesta del sistema inmune, reducen el nivel del colesterol en plasma sanguíneo e inhiben la aparición de cáncer (Yang *et al.*, 2009).

Por otro lado, se sabe que para los microorganismos, los metales pesados son altamente tóxicos (cadmio) al igual que no metales como el SE, esto es debido a que pueden reemplazar fácilmente los compuestos que son funcionales para la célula en sus sistemas de transporte, que al ser reemplazado, provoca una desnaturalización de proteínas (Holmes y col., 1997). Bajo condiciones adecuadas

---

las bacterias probióticas son capaces de acumular grandes cantidades de elementos traza (incluyendo elementos altamente tóxicos), tales como selenio, zinc y cobre, y los transforma en componentes orgánicos no tóxicos (Ren *et al.*, 2011). De acuerdo con Kamna *et al.*, (2014) algunas especies de lactobacilos pueden concentrar selenio (Se) en forma de selenocisteína en la biomasa, la cual puede ser usada como fuente orgánica de este oligoelemento, para después ser aprovechado en la dieta.

### **2.3 Selenio**

El Se es un elemento traza esencial que se encuentra principalmente como Se inorgánico (muchas veces como selenito o selenato) y Se orgánico en forma de selenometionina, el cual, en esta forma, es mayormente asimilable (Chantiratikul, *et al.*, 2015). El Se tiene una ingesta diaria recomendada (IDR) de 60 µg por día para hombres y de 53 µg por día para las mujeres (Rayman, 2012).

En los sistemas biológicos los compuestos del Se tienden a ser metabolizados a estados más reducidos, con lo cual se forman los seleno compuestos (Combs Jr. & Combs., 1984). El selenato y selenito son metabolizados en el hígado después de su administración oral para después ser absorbido en el tracto intestinal (Swanson *et al.*, 1991) donde el Se puede interactuar con bacterias nativas (Krittaphol *et al.*, 2011).

Además, se ha comprobado que la presencia del Se en cantidad mayor a la ingesta recomendada, puede inhibir la carcinogénesis, efecto comprobado en modelos con animales (Combs & Combs, 1984). Este efecto se debe a la estimulación de la enzima glutatión peroxidasa, la cual tiene un efecto protector contra el cáncer intestinal, antioxidante en la glándula tiroides y sensor de estrés (Krittaphol, 2011), además de ello, produce un efecto antioxidante de ciertas formas de la tioredoxina reductasa, a quien se le atribuye una función inmunológica además de participar en la regeneración de los sistemas antioxidantes y mantenimiento intracelular de las reacciones redox (López-Bellido y López-Bellido; Krittaphol, *et al.*, 2011).

---

### 2.3.1 Usos del selenio en el cuerpo humano

Recientemente, se ha descubierto que los efectos benéficos del Se dependen de la forma en la cual sea ingerido, lo que ha llevado a algunos autores a la conclusión de que la forma orgánica es más aprovechable que la forma inorgánica ya que es en la forma de SeC (Selenocisteína)(que es en ésta forma en la que se encuentra en las plantas), que es insertado el Se en el sitio activo de las enzimas por el codón UGA (Alzate *et al.*, 2010; Lamberti *et. al.*, 2011)

Numerosos estudios se han llevado a cabo con la finalidad de enriquecer diferentes productos alimenticios como levaduras, col, ajo, brócoli, cebollas y sésamo. Algunos otros alimentos, han sido estudiados para determinar la biodisponibilidad del selenio, entre los que se encuentran las levaduras, ajo (ambas enriquecidas con selenio), nueces de Brasil, cebollas verdes y cebollines (Alzate *et al.*, 2010).

De acuerdo a Rayman, (2000, 2002a, 2012b), el selenio se involucra en aspectos de la salud humana como:

- a) El apropiado funcionamiento del sistema inmune, ya que estimula la producción de linfocitos T y la actividad de las células *killer*.
- b) Reduce la virulencia y la progresión de infecciones virales (virus de la gripe y VIH, entre otros).
- c) Esencial para la fertilidad masculina, ya que mejora la movilidad del espermatozoide y facilita la síntesis de testosterona y posiblemente influya en la fertilidad femenina (reduce el riesgo de aborto).
- d) Regula el estado de algunos neurotransmisores en el cerebro, lo que influye en el estado anímico, reduce la depresión, ansiedad, confusión mental y hostilidad, ataques epilépticos y Alzheimer.
- e) Producción y regulación de la actividad de la deiodinasa que promueve la conversión de la hormona tiroidea T4 a su forma activa T3.

- 
- f) Actúa como agente antioxidante y antiinflamatorio, ya que presenta efecto benéficos contra la artritis reumatoide, pancreatitis y asma (López-Bellido y López-Bellido, 2013).

### **2.3.2 Selenoproteínas**

El Se se encuentra formando parte de 25 selenoproteínas que tienen a la selenocisteína en su centro activo, entre ellas se encuentran selenoenzimas que incluyen la glutatión peroxidasa, iodotironina deiodinasa, y tioredoxina reductasa, las cuales contienen SeC. La inserción de la Sec a una selenoproteína está dada por el codón UGA en el RNAm (Rayman, 2012a) (Pieniz, *et al.*, 2011). En una síntesis de proteína, el RNAt aminoacilado es transportado hasta el ribosoma por un complejo de proteínas y GTP. Después de ello ocurre una interacción de codón-anticodón y el GTP es hidrolizado. Para que se efectúe la inserción del selenio se requiere de la formación de un complejo cuaternario el cual es desnaturalizado de tal manera que permite la interacción con el ribosoma. Se ha observado que la secuencia de inserción bacteriana de SeC, es una estructura de tallo-bucle situado en la parte inferior del codón UGA/Sec.

El Se, también puede formar selenometiona reemplazando al sulfuro en la metionina y puede ser incorporado con la metionina (Pieniz *et al.*, 2011).

Las selenoproteínas han sido subdivididas en tres grupos, basados en la localización de la selenocisteína. El primer grupo es el más abundante e incluye proteínas en las cuales la selenocisteína se encuentra en la porción N-terminal. El segundo grupo de las selenoproteínas eucarióticas es caracterizado por la presencia de selenocisteína en el carbono terminal, el resto de las selenoproteínas con SeC en la parte intermedia de la cadena, se encuentran en el tercer grupo (Whanger, 2009).

Sin embargo Krittaphol y colaboradores (2011) encontraron que, en ratones el nivel de selenio afecta a la biosíntesis de selenoproteínas, ya que las bacterias de la flora nativa pueden competir contra el hospedador por el selenio cuando éste se encuentra en bajas concentraciones. Se sabe que la microbiota metaboliza la

---

mayor parte de SeMet (selenometionina) en el intestinos grueso, sin embargo, no se sabe si dichas bacterias forman compuestos de SeMet.

Las Se-metilselenocisteína y la  $\gamma$ -glutamyl-Se-metilselenocisteína son más efectivas en la prevención contra el cáncer en modelos de animales, que la selenometionina, que se acumula en los bacterias (Alzate, *et al.*, 2010).

### **2.3.3 Estudios con selenio**

Actualmente, se ha dado una mayor importancia a la búsqueda de la mejora de la salud a través del enriquecimiento de alimentos que provean de nutrientes al consumidor. Es por ello que se han enriquecido alimentos con algunos minerales como cadmio, zinc y selenio. Sin embargo, es importante evaluar la forma en la que se encuentran estos metales, así como la cantidad en la que se suministran (Spivey, 1979).

Recientemente se ha demostrado la importancia del Se en la salud, debido a las selenoproteínas, de las que puede formar parte o presentarse como cofactor (Rayman y DPhil, 2000).

De acuerdo con ello, diversos estudios han demostrado que las bacterias probióticas interactúan con el selenio, para transformarlo en Se orgánico, su efecto en la salud reproductiva (Pieniz *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha demostrado que el Se inorgánico en combinación con bacterias probióticas, presenta una correlación con el desarrollo de los sistemas de regulación de la hormona tiroidea a través de la tioredoxina y la glutatión peroxidasa, lo que se atribuye a la biotransformación que llevan a cabo estas bacterias (Ibrahim *et al.*, 2012).

Vodnar y Socaciu (2014) han comprobado que en probióticos encapsulados con alginatos y quitosán enriquecidos en selenio, el cual provee de un efecto protector a las bacterias frente a las temperaturas de refrigeración, lo que permite que permanezcan viables y logren sobrevivir al paso del tracto gastrointestinal. Además se demostró que el Se fue importante para su sobrevivencia y viabilidad.

---

## ***2.4 Estudios del metabolismo de bacterias probióticas y selenio***

Muchos elementos traza que son esenciales para el organismo, administrados en concentraciones adecuadas permiten el desarrollo correcto del mismo; sin embargo, en altas concentraciones resultan en un daño tóxico. Se ha demostrado que muchas bacterias pueden activar la captación y reducción de minerales y de iones metálicos que se encuentran en el medio (suelos o soluciones) (Eszenyi *et al.*, 2011).

La suplementación con L-selenometionina, o selenito es comúnmente usada en mamíferos, particularmente en áreas donde hay una deficiencia de dicho elemento. Debido a que en algunos países las plantas destinadas al consumo humano y animal, carecen de la concentración adecuada de Se, además de ello, se han suplementado alimentos con selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) o con bacterias que cumplen la función de transformar el selenio y después de romper las células bacterianas, se agregan en quesos y leches fermentadas (Combs & Combs, 1984). Es así que, se sabe que la microbiota juega un papel fundamental en la biodisposición del selenio y que algunas bacterias reducen el selenito a Se elemental (Krittaphol *et al.*, 2011). Cuando las bacterias toman el Se del medio pueden incorporarlo a la cisteína o metionina generando SeC y SeMet, estos compuestos pueden ser insertados en las proteínas durante su síntesis (Pophaly *et al.*, 2014).

El mecanismo principal de síntesis de selenoproteínas, se lleva a cabo debido a que, tanto el selenio orgánico como el inorgánico, son convertidos a sus derivados metilados vía selenido ( $\text{HSe}^-$ ) o algunas otras rutas metabólicas como se puede observar en la fig. 1. Aunque se ha visto que algunas bacterias pueden procesar el Se metilado, aún no se conoce el rol de las bacterias probióticas para el metabolismo y aprovechamiento del Se (Krittaphol *et al.*, 2011).

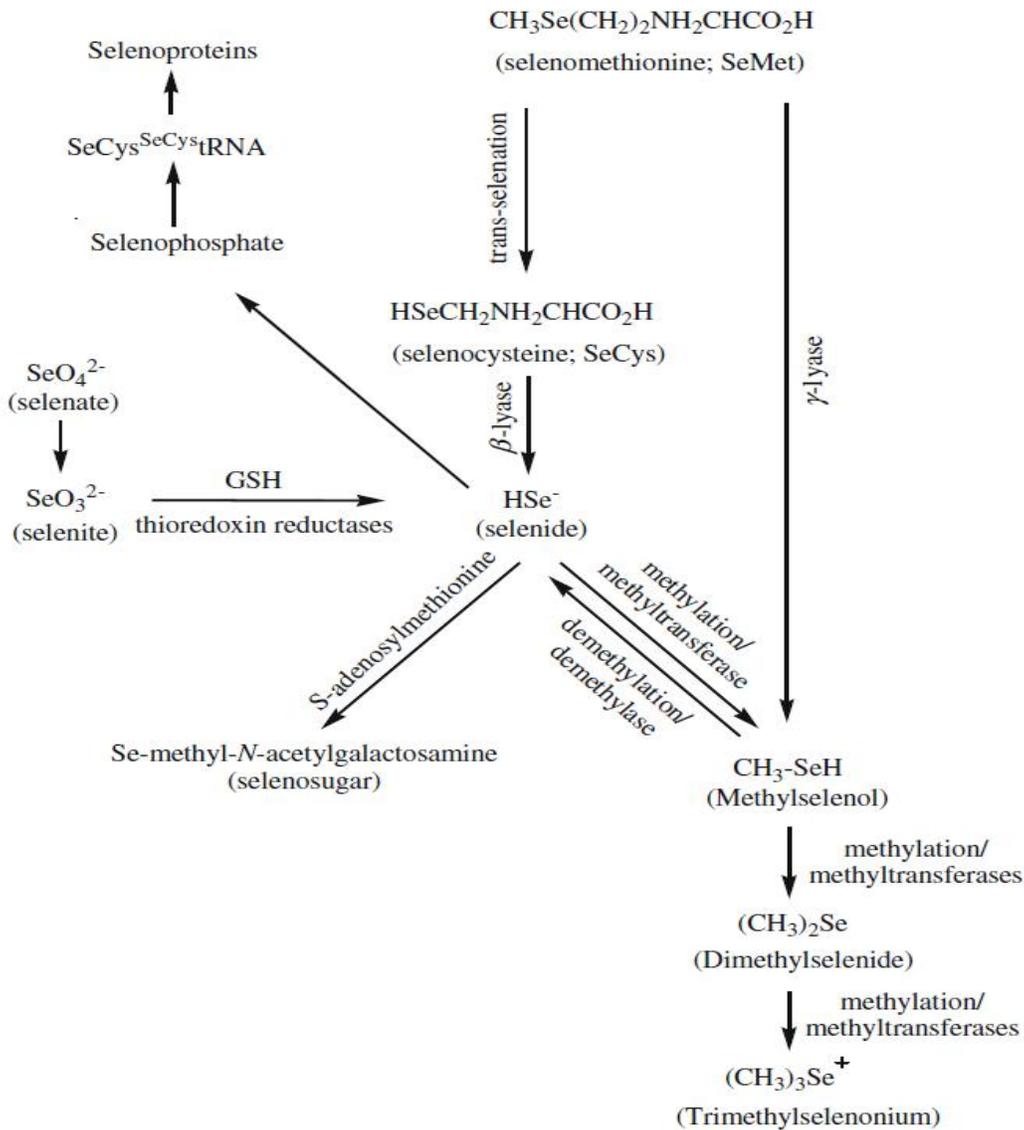


Fig. 1 rutas metabólicas del selenio en hígado y riñón (Krittaphol et al., 2011)

En estudios recientes se ha comprobado la acción del Se combinado u obtenido con probióticos para estudiar sus efectos en la salud reproductiva mediante la capacidad de transformar el Se inorgánico a Se orgánico por bacterias probióticas (Ibrahim et al., 2012).

---

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar la concentración de selenio en bacterias probióticas desarrolladas en un medio enriquecido con selenito de sodio, para determinar la concentración de selenio de origen inorgánico absorbido a través de un análisis por emisión atómica.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Acondicionar a las bacterias probióticas para obtener los inóculos de los sistemas de fermentación.
- Determinar la concentración de inhibición crítica a Se(IV) de bacterias probióticas a través de la fermentación en medios de MRS enriquecidos con selenito de sodio.
- Realizar las curvas de crecimiento de bacterias probióticas en medio enriquecido con selenito de sodio.
- Cuantificar el selenio remanente en los medios de cultivos enriquecidos con la concentración de inhibición crítica de selenito de sodio, para determinar el porcentaje de selenio absorbido por la bacteria probiótica.

---

#### ***4. Hipótesis***

Las bacterias probióticas son capaces de absorber selenio de origen inorgánico cuando crecen en un medio enriquecido con selenito de sodio para transformarlo en selenio orgánico.

---

## **5. Metodología**

### **5.1 Muestras**

Se aislaron las bacterias *L. casei* Shirota y *L. johnsonii* de productos lácteos comerciales. Se propagaron en medio MRS (Man Rogosa y Sharpe) a 37°C durante 24 horas. Se realizó la tinción de Gram para comprobar la pureza del cultivo.

Para determinar la cuenta de microorganismos viables, se utilizó el método de la gota, en el cual se hacen diluciones sucesivas y a partir de ellas se depositan 0.05 mL del cultivo en placas de MRS. Se incubaron a las condiciones mencionadas en el párrafo superior.

### **5.2 Fermentación en medios suplementados con $\text{Na}_2\text{SeO}_3$**

Una vez aisladas las cepas de *L. casei* Shirota y *L. johnsonii* en caldos de MRS fermentados durante 24 horas, se tomaron 0.2 mL del medio de cultivo y 0.2 mL de glicerol, para conservar las bacterias en un temperatura de 4°C, hasta su posterior uso.

#### **5.2.1 Determinación de la concentración crítica de inhibición**

Las fermentaciones para cada microorganismo se inocularon a una concentración de  $10^6$  UFC en tubos con 10 mL de caldo MRS enriquecido con 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 y 300 mg de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ /L para observar el descenso en la cuenta viable de los microorganismos. La fermentación se llevó a cabo durante 36 horas a 37°C.

Para lograr las concentraciones antes mencionadas, se partió de una solución de selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), con 22.5 mg en 25 mL de agua destilada; la solución se esterilizó a 120°C durante 15 minutos a 1.5 psi de presión. A partir de esta solución se prepararon los tubos con las diferentes concentraciones señaladas en el párrafo anterior.

---

Para determinar el punto crítico de inhibición se utilizó el método de Talmage y Fitch modificado (Peña, 2007), el cual consiste en:

- Graficar los datos obtenidos de la cuenta viable de cada bacteria.
- Identificar el cambio de orden en la gráfica.
- Trazar una bisectriz de forma tangente a los puntos cercanos al cambio de orden.
- Alargar y entrecruzar las dos bisectrices, para formar un ángulo frente al cambio de orden.
- Trazar una línea en el cruzamiento de las bisectrices, para tocar la curva de inhibición.
- Interpolarse el punto que toca la línea recta a la curva y referenciar respecto a la concentración observada.

### ***5.2.2 Determinación de la zona de desaceleración***

Una vez determinada la concentración crítica de inhibición, se realizaron las fermentaciones en medios de MRS enriquecidos con  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  con dicha concentración (196 mg/L para *L. casei* Shirota y 206 mg/L para *L. johnsonii*). La fermentación se llevó a cabo durante 36 horas, tomando una muestra cada dos horas, comparando con un medio no enriquecido con Se, para realizar una cinética de crecimiento y establecer la zona de desaceleración comparando todos los puntos de las curvas.

### ***5.3 Análisis de selenio***

Para la determinación de selenio por espectrometría de masas (ICP) se tomaron muestras de 1 mL del medio de MRS fermentado, enriquecido con selenio. La muestra se centrifugó a 39000 g por 15 minutos a 4°C para separar la biomasa del medio de cultivo. Las muestras de células, se almacenaron en tubos eppendorf para lavar con una solución de DTT (di-tiotreitol) al 0.3% (p/v), después de ello se centrifugaron las células en las mismas condiciones de separación del medio.

---

Las tres réplicas del sobrenadante, se mezclaron con el DTT de cada muestra para analizarlos en ICP. A cada muestra se le añadieron 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado, 4 mL de agua desionizada y 1 mL de muestra. La mezcla se digestó mediante microondas utilizando una rampa de temperatura desde T<sub>amb</sub> hasta T=175°C durante 5.5 minutos y de 175 a 180° C durante 4.5 min. El límite de presión en los vasos fue de 110 psi. La solución resultante se diluyó a 25 mL.

Las soluciones estándar de selenio se prepararon con agua desionizada y a partir de la dilución de un estándar de 50 mg/L, utilizando las concentraciones de 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.25 y 1.5 mg/L, al 3% en HNO<sub>3</sub>. Las muestras se midieron a la longitud máxima de emisión del selenio (196 nm) en un equipo de ICP, para realizar la curva de calibración correspondiente.

La concentración de Se absorbido por la biomasa se realizó por interpolación considerando las diluciones correspondientes.

#### ***5.4 Análisis estadístico de los resultados***

En todos los experimentos se realizaron repeticiones y los datos experimentales, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), se hizo la comparación de medias por el método de Tuckey con un nivel de significancia de 0.05. El programa utilizado para el análisis fue NCSS-2007 (versión: 07-1-15). Letras minúsculas diferentes indicadas en las barras de error de las gráficas de resultados, demuestran una diferencia significativa entre cada uno de los sistemas y letras mayúsculas diferentes indican una diferencia significativa entre cada medición (nivel de significancia  $p < 0.05$ ).

---

---

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Análisis de la tolerancia al $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

A partir de los medios preparados con las diferentes concentraciones de selenito de sodio se fermentaron y se obtuvieron los siguientes resultados de tolerancia tanto para *L. casei* Shirota como para *L. johnsonii*.

Recientemente, se ha prestado mayor atención a la interacción de las bacterias con elementos tóxicos que se pueden acumular en las membranas celulares, estos elementos pueden llegar a ser tóxicos a altas concentraciones, sin embargo, las bacterias son capaces de interactuar con dichos compuestos, mediante una reducción, a través de mecanismos especializados similares a los utilizados para la reducción de sulfatos. Dichos mecanismos de reducción, utilizan donadores de electrones que incluyen el piruvato, lactato y el  $\text{H}_2$ , formando especies que pueden permitir el crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de metales tóxicos presentes en el medio (Barton *et al.*, 2015).

### 6.2 Determinación de la concentración de inhibición crítica

En las fermentaciones se determinó la cuenta viable; se observó que para *L. casei* Shirota (Tabla 1) se obtuvo una cuenta viable de 9.37 log UFC/mL en un medio sin enriquecimiento con Se. Para las concentraciones de 20 hasta 100 mg/L se obtuvo una cuenta viable de aproximadamente 8 ciclos logarítmicos de UFC. Para la concentración de 250 y 300 mg/L no hubo crecimiento.

Tabla 1 Determinación de la concentración de tolerancia para *L. casei* Shirota

Concentración mg/L $\text{Na}_2\text{SeO}_3$	Log UFC/mL <sup>des. est.</sup>	Concentración mg/L $\text{Na}_2\text{SeO}_3$	Log UFC/mL <sup>des. est.</sup>
0	9.37 <sup>±0.04</sup>	100	8.20 <sup>±0.13</sup>
20	8.82 <sup>±0.07</sup>	150	7.54 <sup>±0.13</sup>
40	8.92 <sup>±0.10</sup>	200	5.83 <sup>±0.13</sup>
60	8.22 <sup>±0.13</sup>	250	0.0
80	8.30 <sup>±0.11</sup>	300	0.0

Para el experimento realizado con *L. johnsonii* (Tabla 2) se obtuvo que a partir de la concentración de 20 mg/L hasta 200 mg/L la cuenta viable se mantuvo de 9 ciclos logarítmicos, descendiendo en 250 mg/L a 8.78 UFC/mL y en 300 mg/L a 7.92 UFC/mL en un tiempo final de 24 horas.

Tabla 2 Determinación de la concentración de tolerancia para *L. johnsonii*

Concentración mg/L Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Log UFC/mL <sup>des. est.</sup>	Concentración mg/L Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Log UFC/mL <sup>des. est.</sup>
0	9.5 <sup>±0.05</sup>	100	9.57 <sup>±0.01</sup>
20	9.99 <sup>±0.00</sup>	150	9.39 <sup>±0.01</sup>
40	9.81 <sup>±0.03</sup>	200	9.30 <sup>±0.00</sup>
60	9.50 <sup>±0.03</sup>	250	8.78 <sup>±0.09</sup>
80	9.58 <sup>±0.07</sup>	300	7.92 <sup>±0.07</sup>

Después de calcular los puntos de inflexión en las gráficas de crecimiento, se descartaron algunos de estos puntos a partir del valor obtenido de R<sup>2</sup>. De acuerdo con la tabla 3, se conservó el valor más cercano a 1; fue de 0.8767 para *L. casei* Shirota y de 0.8904 para *L. johnsonii*, es decir, el rango donde se observó la concentración crítica de inhibición fue de 150 a 300 mg de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>/L. Esto se realizó con la finalidad de determinar el rango de concentración de selenito de sodio donde se encontraba el punto de inflexión y por consecuencia el punto crítico de inhibición, que posteriormente fue calculado.

Tabla 3 Rangos de crecimiento de bacterias ácido lácticas y R<sup>2</sup>

Microorganismo	Rango analizado	Coefficiente de correlación lineal, R <sup>2</sup>
<i>L. casei</i> Shirota	20-80 mg Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> /L	0.6764
	150-300 mg Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> /L	0.8767
<i>L. johnsonii</i>	20-80 mg Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> /L	0.7977
	150-300 mg Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> /L	0.8904

De acuerdo con el método de Talmage y Fitch modificado (Peña, 2007), la concentración (Fig. 2) crítica de inhibición calculada para *L. casei* Shirota fue de 196 mg/L. Tal concentración es menor a la encontrada por Pusztahelyi y colaboradores (2015) quienes reportaron que para *L. casei* Shirota había una

inhibición total a una concentración de 10 000 mg/L de selenito de sodio, bajo las mismas condiciones.

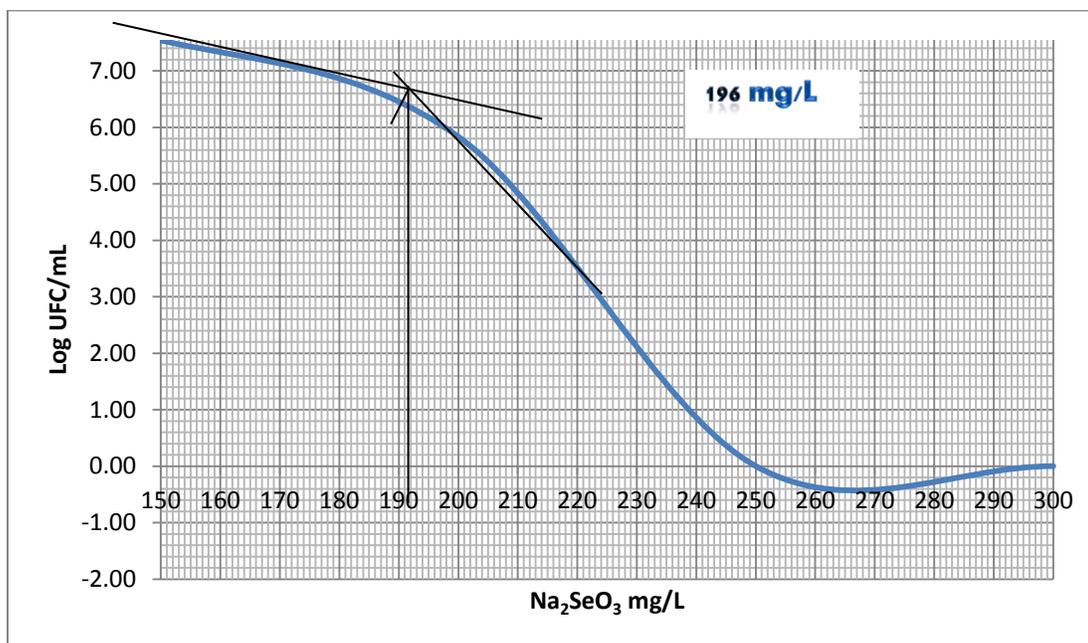


Fig. 2 Determinación de la concentración de tolerancia para *L. casei* Shiota

El punto crítico de inhibición para *L. johnsonii* (Fig. 3) fue de 206 mg/L, una concentración mayor a la obtenida para *L. casei* (197 mg/L). Dicha concentración también fue mayor que el punto crítico de inhibición reportado por González-Olivares y colaboradores (2015), quienes encontraron que a los 98 mg/L de selenito de sodio se tenía un punto crítico de inhibición de *L. johnsonii*.

El método de Talmage y Fitch se basa en un gráfico donde se presenta un grupo de factores que indican una sedimentación. De ésta manera, se puede remover el material suspendido producido (Peña, 2007., Ferrara-Giner y Ramírez, 2013). Con el cambio de concentración de sustrato producto, la generación de biomasa floculenta y compacta que se sedimenta rápidamente presenta un cambio de energía que podría indicar un cambio en el metabolismo de las bacterias, esto se podría relacionar con uno de los cambios de orden de reacción global (Ferrara-Giner y Ramírez, 2013)(Ampudia, 2011)

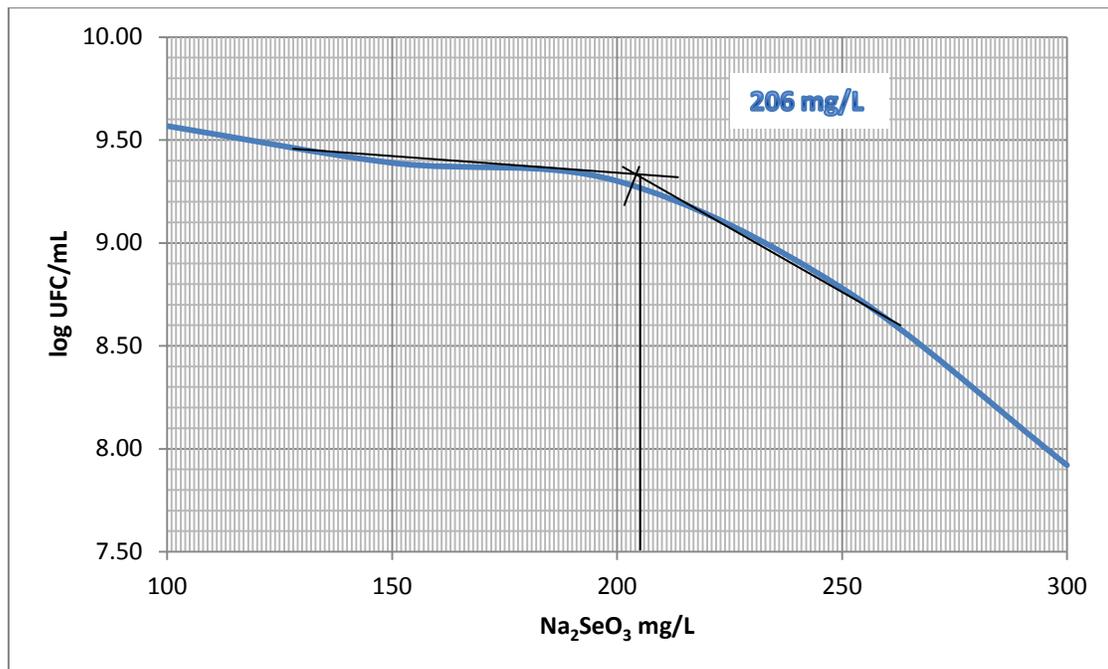


Fig. 3 determinación de la concentración de tolerancia para *L. jhonsooni*

Esto último tiene una influencia directa en la absorción de selenio debido a que se sabe que los microorganismos que se utilizan como cultivos iniciadores en productos comerciales, muestran generalmente una muy escasa viabilidad y capacidad de adaptación, pues factores como pH, acidez, la presencia de otros microorganismos, temperatura y contenido de oxígeno influyen de manera directa en la viabilidad de las bacterias ácido lácticas (Gueimonde *et al.*, 2004).

Desde 1995 Calomme y colaboradores estudiaron el efecto de la presencia de selenito de sodio a diferentes concentraciones en los medios de cultivo, sobre el crecimiento de diferentes bacterias lácticas. Ellos reportaron que las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* son capaces de crecer hasta 500 mg/L de selenito de sodio, sin embargo observaron que a partir de concentraciones de 200 mg/L, el crecimiento disminuye.

---

En otro sentido, se ha comprobado que algunas bacterias, especialmente las probióticas pueden reducir el selenito a selenio elemental y algunas otras pueden transformar el selenio elemental a selenuro de hidrógeno ( $H_2Se$ ). Se cree que estos mecanismos de reacción sirven para proteger a la bacteria contra los daños de toxicidad de selenio (Krittaphol *et al.*, 2011). Estos mecanismos podrían no desactivarse en las concentraciones donde se observa la tolerancia al selenito de sodio, por lo que ocurre una inhibición.

En este estudio se evidenció que, a una concentración de 206 mg/L para *L. johnsonii* y 197 mg/L para *L. casei* Shirota, las bacterias son capaces de interactuar con el selenio. Hasta estas concentraciones existen mecanismos de detoxificación, a través de una bioconversión de selenito a selenuro, probablemente por la acción de proteasas producidas para evitar el daño oxidativo a las células. La bioconversión del selenio inorgánico ( $Na_2SeO_3$ ) del medio es llevado a cabo mediante la unión de este elemento a un aminoácido, metionina o selenocisteína, o reemplazando al azufre de algunas proteínas (Wu *et al.*, 2016). Por otro lado, un mecanismo de detoxificación de las bacterias, se basa en la transformación del selenito a selenato, para después transformarlo a  $H_2Se$  y llegar a Se elemental, el cual en condiciones de anaerobiosis es una forma estable y no se disuelve fácilmente en el agua. Gracias a estas propiedades el selenio elemental es menos tóxico comparado con otras formas del Se (Eszenyi *et al.*, 2011).

La concentración de un agente inhibidor de bacterias, presente en el medio de crecimiento, se conoce como Concentración crítica de inhibición (Picazo, 2000). En dicha concentración, la población bacteriana identifica a la población sensible, con lo cual mueren las bacterias que no presenten cualquier tipo de mecanismo de resistencia adquirido (Abujheisha, 2005). De acuerdo con Wu *et al.* (2015), a concentraciones mayores de la crítica, las bacterias son incapaces de reducir el selenio, lo que provoca un envenenamiento a la célula. Esto tiene como consecuencia la inhibición completa de la célula bacteriana, tal y como se puede

ver en *L. casei* Shirota, la cual se inhibió completamente después de la concentración crítica, mientras que *L. johnsonii*, disminuyó cerca de dos ciclos logarítmicos en su crecimiento.

#### 6.4 Fermentación en medios suplementados con $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

Después de ser determinada la concentración crítica de inhibición, se realizaron fermentaciones con medios enriquecidos con selenito de sodio durante 36 horas. Para *L. casei* Shirota (Fig. 4) hubo diferencia significativa en el crecimiento al comparar con una fermentación en medio MRS sin Se ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). En el medio MRS, sin enriquecimiento de Se, la fase de desaceleración se presentó a las 6 horas de iniciada la fermentación, mientras que en el medio con Se, esta misma fase se presentó a las 15 horas (Fig. 4).

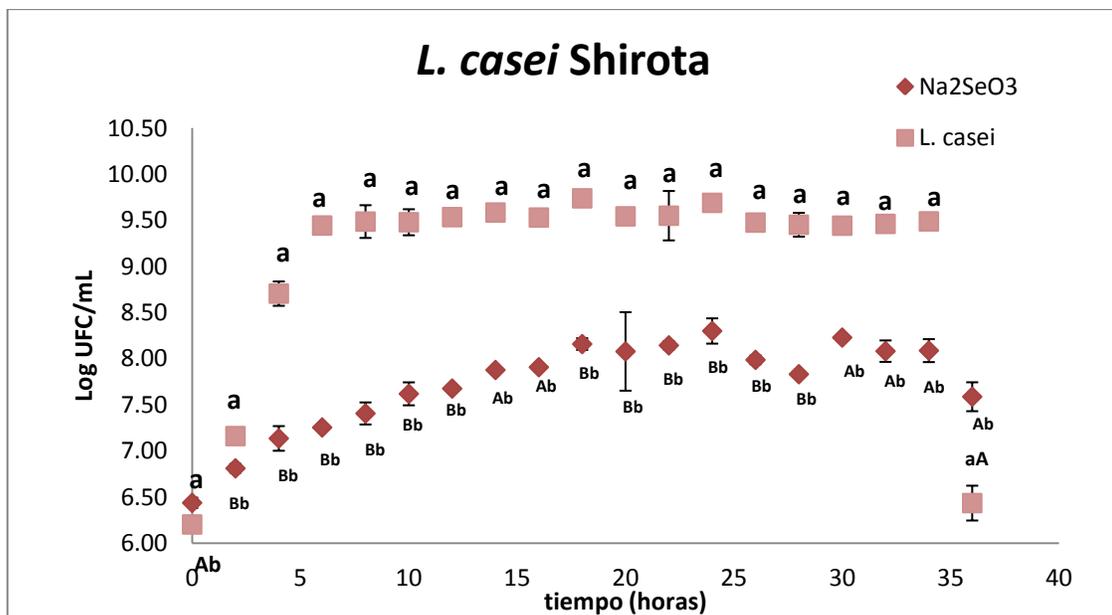


Fig. 4 Crecimiento de *L. casei* Shirota en medios MRS y MRS enriquecido con  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

Por otra parte, el número de UFC en la fermentación realizada sin Se, alcanzó valores más altos. En el caso de la fermentación con Se, existen reportes donde se afirma que los microorganismos necesitan adaptarse a la presencia de Se y tienen que echar a andar mecanismos de detoxificación durante los cuales

algunas bacterias mueren y otras sobrevive. Posiblemente por esta razón se observa una diferencia en la velocidad de crecimiento bajo ambas condiciones evaluadas (Krittaphol, 2007).

De acuerdo con la Fig. 5, podemos observar que la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *L. casei* Shirota fue de  $2.54 \text{ h}^{-1}$  en un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 0.27 horas, mientras que cuando se enriquece el medio con Se,  $\mu$  fue de  $0.40 \text{ h}^{-1}$  en un  $t_d$  de 1.71 h, es decir, la presencia de Se hace que la velocidad de crecimiento,  $\mu$ , disminuya.

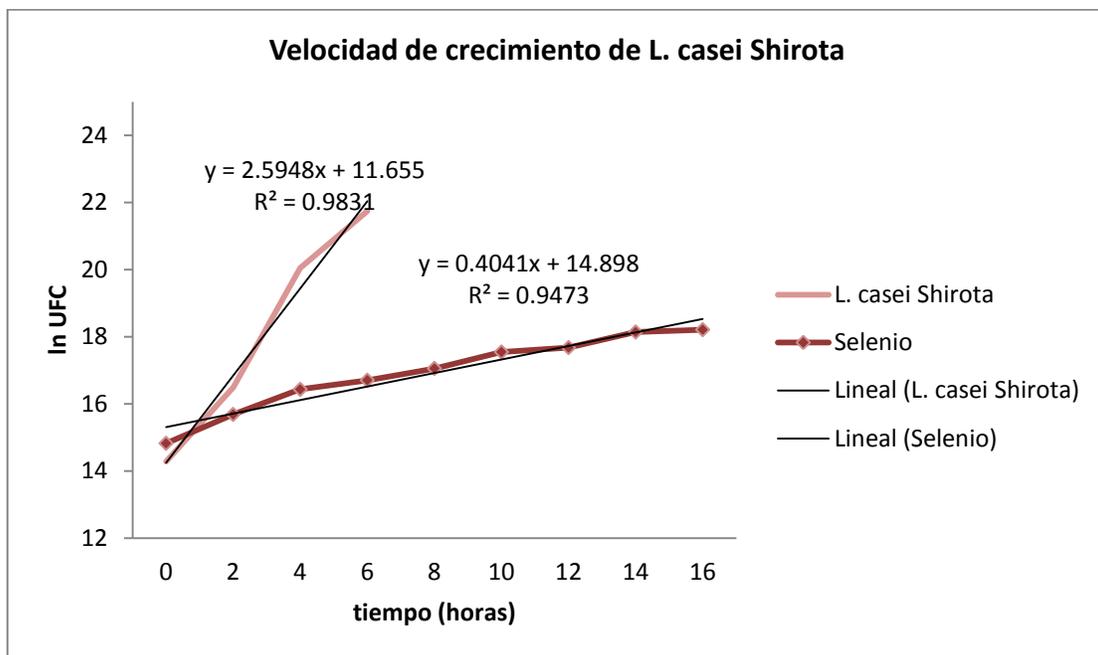


Fig. 5 Velocidad de crecimiento para *L. casei* Shirota

A partir de las 34 horas (Fig. 6) en los dos medios de cultivo evaluados, se presenta un descenso en la cuenta viable. Por otro lado, la zona de desaceleración se presentó a las 7.5 horas en medios con MRS, mientras que para medios enriquecidos se presentó a las 10 horas. En comparación con lo reportado por Wu *et al* (2015), tanto *L. casei* Shirota como *L. jhonsoni* tienen una mayor tolerancia a la presencia de Se, ya que *B. subtilis* sólo fue capaz de crecer a concentraciones de 45 mg/L durante 4 h, después de las cuales entró en fase

estacionaria. Este paso implica una adaptación de la bacteria expresando enzimas que le permitan soportar el estrés del medio y la reproducción bacteriana, esto con la inserción del Se elemental presente en el medio hacia selenoproteínas que son vitales para su sobrevivencia.

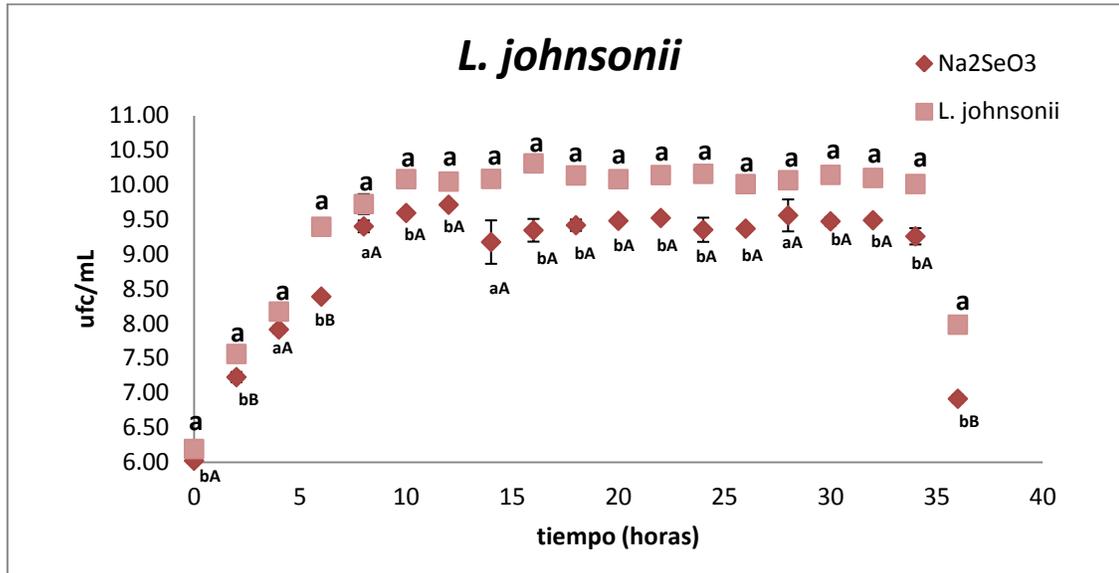


Fig. 6 Cinéticas de crecimiento de *L. johnsonii* en un medio MRS y MRS enriquecido con selenito.

*L. johnsonii* (fig. 7), tiene una  $\mu$  de  $1.0252 \text{ h}^{-1}$  en un  $t_d$  de 0.68 h en un medio de MRS, mientras que en un medio enriquecido con Se,  $\mu$  adquiere un valor de  $0.8182 \text{ h}^{-1}$  en un  $t_d$  de 0.85 h. Como se puede observar (Fig. 7), la presencia del Se afecta la velocidad de crecimiento para *L. johnsonii*

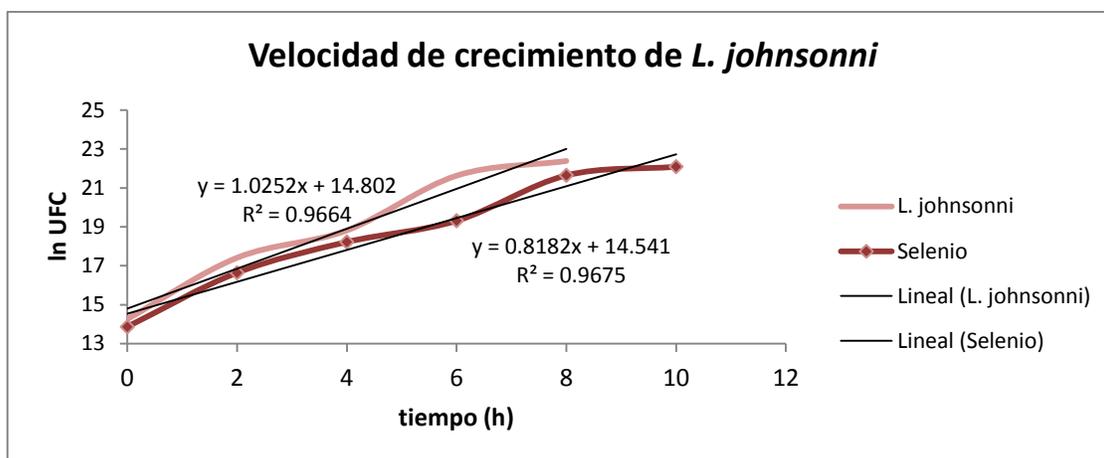


Fig. 7 Velocidad de crecimiento para *L. johnsonii*

Además de sobrevivir, las bacterias son capaces de transformar el Se; así, se ha observado que la bioconversión de selenio llevada a cabo por microorganismos es más rápida y segura en comparación con los cereales crecidos en suelos enriquecidos con selenito de sodio. Las bacterias enriquecidas con selenio, tales como *L. bulgaricus*, en dosis de 1 a 16 mg/L, mejoran el valor nutritivo y la calidad del producto fermentado (Wu *et al.*, 2015).

El comportamiento de crecimiento de las bacterias, está relacionado directamente con la cantidad de sustrato presente en el medio y es ahí donde se observa la dinámica ocurrida en la transición de la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria donde el crecimiento se detiene (también llamada zona de desaceleración) (Bren *et al.*, 2013).

### 6.5 Determinación de selenio

A partir de la determinación de la zona de desaceleración, se realizaron fermentaciones y se tomaron muestras del caldo de fermentación libre de células a dos diferentes tiempos. Para *L. casei* Shirota se tomaron a las 10 y 15 horas de fermentación y para *L. johnsonii* los tiempos tomados fueron de 5 y 7.5 horas. La concentración inicial de inoculación fue de  $10^6$  UFC/mL.

Como se puede observar en la tabla 7, *L. casei* Shirota, fue inoculado en un medio MRS enriquecido con 196 mg/L y fermentando durante 10 y 15 horas, que de acuerdo a la Fig. 3, es el tiempo donde se presenta la zona de desaceleración.

Para un tiempo de 10 horas de fermentación de *L. casei* Shirota, se obtuvo que de 196 mg de selenito/L iniciales, se contabilizaron 74.9 mg de Selenio/L finales. Esto reflejó un porcentaje de absorción de 17.26% de Se con una cuenta total de 7.3 Log de UFC/mL. En un tiempo de 15 horas, se tuvo 57.32 mg/L de Selenio en el medio de MRS, por lo que el porcentaje de absorción fue de 35.98% del Se en una concentración del lactobacilo de 7.4 log UFC/mL. Se sabe que a concentraciones de 5 mg/L de selenito, el crecimiento de los lactobacilos es estimulado (Zhihua *et al.*, 2011).

**Tabla 4 Porcentaje de absorción de selenio por especies de Lactobacillus**

Bacteria	Tiempo (horas)	Log UFC/mL	[Se] <sub>1</sub>	[Se] <sub>2</sub>	% de Absorción del Se
<i>L. casei</i>	10	7.3	197	74.9	17.26
<b>Shirota</b>	15	7.4		57.32	35.98
<i>L. Johnsonii</i>	5	7.9	207	58.41	49.80
	7.5	7.9		47.09	61.77

[Se]<sub>1</sub>=Concentración de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> agregados inicialmente en el medio de fermentación. [Se]<sub>2</sub>= Concentración de Se determinada al final de la fermentación, tomando como concentración inicial el Se presente en [Se]<sub>1</sub>

Para *L. johnsonii*, se enriqueció el medio con una concentración de 207 mg/L de selenito. Se observó que en un tiempo de 5 horas se tenía una concentración de 58.41 de Selenio en el medio de MRS. Esto indicó que el porcentaje de absorción fue de 49.80%. En un tiempo de 7.5 horas el Se presente en el medio era de 47.09 mg/L de Se, representando un 61.77% de absorción. Esto calculado a partir de la concentración de células en el medio. Se puede observar que *L. johnsonii* tiene el mayor porcentaje de absorción de Se (61.77%) que *L. casei* Shirota. Sin embargo, en ambos casos se observa que durante la etapa

---

logarítmica del crecimiento la concentración de selenio en la célula no tiene diferencia significativa.

Se sospecha que la bioconversión a Se orgánico, es debida a la acción de la enzima glutatión, la cual es un antioxidante que contiene compuestos tiólicos y tiene un bajo peso molecular. La glutatión mantiene la homeostasis intracelular regulando el equilibrio redox logrando disminuir los daños a la membrana celular (Krittaphol, 2007).

Maham *et al.* (1999), observaron que cuando se añade selenito de sodio como complemento en alimento para cerdos de engorda, el nivel de Se presente en la sangre, no era mayor que cuando se agregaban levaduras enriquecidas con selenio al alimento. Mientras que Pusztahelyi *et al.* (2015), en estudios previos reportan que las bacterias ácido lácticas, especialmente las probióticas también pueden mejorar el contenido de Se en la sangre.

---

## 7. CONCLUSIONES

- La concentración crítica de selenito de sodio para la inhibición de *L. casei* Shirota y *L. johnsonii* aislados de leches fermentadas comerciales fue menor que la reportada para las mismas bacterias acondicionadas de cultivos puros. Lo que expresa una mayor tolerancia hacia la presencia de SE
- El valor obtenido en la concentración crítica para la inhibición de ambos microorganismos, (196 y 207 mg/L) permitirá establecer las condiciones más favorables en presencia de Se en futuros estudios.
- Las zonas de desaceleración de la curva de crecimiento microbiano estuvieron influenciadas por la presencia de selenito de sodio solo para *L. casei* Shirota y en menor proporción sobre *L. johnsonii*.
- Los porcentajes de absorción del selenio inorgánico, bajo nuestras condiciones experimentales fueron mayores al 50%
- Se comprobó que las bacterias probióticas son capaces de absorber selenio de fuentes inorgánicas en concentraciones que no inhiban su crecimiento.

---

## 8. Referencias

Abujheisha R., K. (2005). Determinación de la carga crítica como nuevo método alternativo al estándar de difusión en agar para establecer la sensibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos. Doctorado. UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Aggett, P.J., et al. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, s1–s27.

Alzate, A., Pérez-Conde M., C., Gutiérrez, A., M., Cámara, C. (2010). Selenium-enriched fermented milk: A suitable dairy product to improve selenium intake in humans. *International Dairy Journal*. 20, 761-769

Ampudia Moya, M. (2011). Investigación de las Condiciones Óptimas y de la Cinética del Proceso de Biodigestión Anaerobia de Desechos Orgánicos Agroindustriales y Estiércol Vacuno. Licenciatura. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO.

Andreoni, V., Moro L., M., Cavalca L., Erba, D. & Ciappellano, S. (2000). Selenite tolerance and accumulation in the *Lactobacillus* species. *Annals of Microbiology*. 50, 77-78

Barton, L., L., Tomei-Torres, A., Xu, H., Zocco, T. (2015). Metabolism of metals and Metalloids by the Sulfate-reducing Bacteria. *Bacteria metal interactions*. Springer, USA, pp. 57-85

Borchers, T. A. et al. (2009). Proiotics and immunity. *Journal of gastroenterology*. 44(1), 26-46

Bren, A., Hart, Y., Dekel, E., Koster, D. & Alon, U. (2013). The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC Systems Biology*. 7(27), 1-9

Brown, K., M. & Arthur, J., R. (2001). Selenium, Selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition*. 4(2B), 593-599

Caballero-Araúz, I., L., Afton, S., Wrobel, K., Caruso, J., A., Gutiérrez-Corona, J., F., & Wrobel K. (2008). Study on the protective role of selenium against cadmiun toxicity in lactic acid bacteria: An advanced application of ICP- MS. *Journal of Hazardous Materials*. 153, 1157-1164

Calomme, M. R., Van den Branden, K., Vanden Berghe, D. A. (1995). Selenium and Lactobacillus species, *Journal of Applied Microbiology*. 79 (3), 331-340

Chantiratikul A. Pakmaruek P., Chinrasri O., Aengwanich W., Chookhampaenh O., Maneetong S. & Chantiratikul P. (2015). Efficacy of Selenium from Hydroponically Produced Selenium-Enriched Kale Sprout (*Brassica oleracea* var. *alboglabra* L.) in Broilers. *Biol trace Elem Res*.

---

Combs Jr GF, Combs SB. (1984). The nutritional biochemistry of selenium. *Annual Review of Nutrition*. 4, 257-280

Driscoll, D., M. & Copeland, P., R. (2003). Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annual Review of Nutrition*. 23, 17-40

Eszenyi, P., Sztrick, A., Babka, B. & Prokish, J. (2011). Elemental, Nano-Sized (100-500 nm) Selenium Production by probiotic Lactic Acid Bacteria. *Int Jour Biosc, Bioc and Bioinformatics*. 1(2), 148-152

Ferrara-Ginger G. & Ramírez A. (2013). Análisis de la sedimentabilidad de los lodos biológicos producidos en un rcs durante la desnitrificación de un efluente de un biorreactor de crecimiento adherido. *Revista de la Facultad de Ingeniería U. C. V.* 28(1), 37-44

Gan, F., Chen, X., Liao, S., F., et. al., (2014). Selenium-Enriched Probiotics Improve Antioxidant Status, Immune Function, and Selenoprotein Gene Expression of Piglets Raised under High Ambient Temperature. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4502-4508

Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Reyes-Gavilán, C., G. (2004). Viability and diversity of probiotic Lactobacillus And Bifidobacterium populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*. 37, 839-850

Holmes, J., D. Richardson, J., D., Saed, S., Evans-Gowing R., Russel, A., D. & Sodeau R., J. (1997). Cadmium-specific formation of metal sulfide Q-particles ' by Klebsiella pneumoniae. *Microbiology*. 143, 2521-2530

Ibrahim A., M., Hala et. al., (2012). Selenium-Enriched Probiotics Improves Murine Male Fertility Compromised by High Fat Diet. *Biological Trace Element Research*. 147(1-3), 251-260

Kamna S., Tomar S., K., Sangwan V. & Bhushan B. (2014). Evaluation of Lactobacilli from Sources for Uptake and Accumulation of Selenium. *Biol Trace Elem Res*. 160, 433-436

Kieran, M., et. Al., (2003). Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Reviews therapeutic focus*. 8, 692-700.

Kittaphol W., Wescombe P. A., Thomson C. D., McDowell A., Tagg J. R., Fawcett J. P. (2011). Metabolism of L-selenomethionine and Selenite by probiotic Bacteria: In Vitro and In Vivo Studies. *Biological trace Element Research*, 144(1-3), 1358-1369

Krittaphol W., McDowell A., Thomsom C. D., Mikov M. & Fawcett J. P. (2011). Biotransformation of L-Selenomethionine and Selenite in rat Gut Contents. *Biol Trace Elem Res*. 139, 188-196

---

Lamberti, C., Mangiapane, E., Pessione, A., Mazzoli, R., Giunta, C., & Pessione, E. (2011). Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. *Proteomics*. 11, 2212-2221

Leroy, F., Falony, G. & Vuyst L., (2008). Latest developments in probiotics. Toldrá F. Meat biotechnology (capítulo 10). Valencia, España: Springer.

López-Bellido G., F., J. y López B., L. (2013). Selenio y salud; valores de referencia y situación actual de la población española *revisión*. *Nutrición Hospitalaria*. 28(5), 1396-1406

Mahan, D., C., Cline, T., R., Richert, T., B. (1999). Effect of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to grower–finisher pigs on resulting performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and lion quality. *J Anim Sci*. 77, 2172–2179

Pieniz S., Andrezza R., Queiroz P. J., Oliveira C. F. A. & Brandelli A. (2013). Production of Selenium-Enriched Biomass by *Enterococcus durans*. *Biol trace Elem Res*. 155, 447-454

Peña, R., Circo, S. (2007). Solución automática del método de Talmage y Fitch. *Tecnología Química 1* (2007), 10-15

Picazo, J; Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, (2000). España: coesant-seimc, p.4.

Pieniz, S., Benedict, C., O., Andrezza R. & Brandelli A. (2011). Evaluation of selenite bioremoval from liquid culture by *Enterococcus* species. *Microbiol Res*. 166, 176-185

Pophaly S., D., Hitesh K., P., Kumar T., S. & Singh R. (2014). Selenium enrichment of lactic acid bacteria: A functional food perspective. *Trends in Food Science & Technology*. 39, 135-145

Pophaly., S., D., Singh H., K., P., Kumar, T., S. & Singh, R. (2014). Selenium enrichment of lactic acid bacteria and bifidobacteria: A functional food perspective. *Trends in Food Science & Technology xx. Review*, 1-11

Pusztahelyi T., Kovács S., Pócsi I. & Prokisch J. (2015). Selenite-stress selected mutant strains of probiotic bacteria for Se source production. *Journal of trace elements in medicine and biology*. 30, 96-101

Rayman M., P. (2002) The argument for increasing selenium intake. *Proc Nutr Soc*. 61, 203-15.

Rayman M., P. (2012) Selenium and human health. *Lancet*. 379, 1256-68.

---

Rayman P., Margaret y DPhil (2000). The importance of selenium to human health. *El Sevier*. 356(9225), 233-241

Reid, M., E; Stratton, M., Suzanne; Lillico, A., J; Fakhri, Marwan; et al. (2004). A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18.1, 69-74.

Ren, Z., Zhao, Z., Wang, Y. & Huang, K. (2011). Preparation of Selenium/ Zinc-enriched Probiotics and their effect on blood Selenium and Zinc Concentrations, Antioxidant Capacities, and intestinal Microflora in Canine. *Biol Trace Elem Res*. 141, 170-183

Saier, M.H. & Mansour, N. M. (2005). Probiotics and prebiotics in human. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 10, 22–25.

Schollz-Ahrens K. E., Ade P., Marten B., Weber P., Timm W., Asil Y., Glüer C. C. & Schrezenmeir J. (2007). Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *The Journal of Nutrition*. 137(3), 838S-846S

Spivey, F., M., R. (1979). Nutritional Influences on Metal Toxicity: Cadmium as a Model Toxic Element. *Environmental Health Perspectives*. 29, 95-104

Swanson CA, Patterson BH, Levander OA, Veillon C, Taylor PR, Helzouer K, McAdam PA, Sech LA. (1991). Human [75Se] seleniomethionine metabolism: a kinetic model. *The American journal of clinical nutrition*. 54, 917-926

Vodnar, D., Cristian. & Socaciu C. (2014). Selenium enriched green tea increase stability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* in chitosan coated alginate microcapsules during exposure to simulated gastrointestinal and refrigerated conditions. *Food Science and Technology*. 57, 406-411

Whanger, P., D. (2009). Selenoprotein expression and function-Selenoprotein W review. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790, 1448-1542

Wu, S., Zhou, N., Li, D., He, S., Chen, Y., Bai, Y., Zhou, M., He, J., Wang, C. (2015). Effects of Selenium on the growth and fermentation properties of Se-enriched *Bacillus subtilis* J-2. *Journal of Food Biochemistry*. 40 (1), 31-38

Wu, S., Zhou, N., Dongsheng, L., He, S., Chen, Y., Bai, Y., Mingquan, Z., Jianjun, H. and Wang, C. (2016). Effects of selenium on the growth and fermentation properties of Se-enriched *Bacillus Subtilis* J-2. *Journal of food biochemistry*. 40, 31-38

---

Yang, J., Huang, K., Qin S., Wu, X., Zhao Z. & Chen F. (2009). Antibacterial Action of Selenium-Enriched Probiotics Against Pathogenic *Escherichia coli*. *Dig Dis Sci*. 54, 246-254

Zhihua, R., Zhao, Z., Wang, Y., Huang, K. (2011). Preparation of Selenium/Zinc-Enriched Probiotics and their Effect on Blood Selenium and Zinc Concentrations, Antioxidant Capacities, and Intestinal Microflora in Canine. *Biol Trace Elem Res*. 141, 170-183

III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE INNOVACIÓN Y TENDENCIAS  
EN PROCESAMIENTO DE  
XVIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE  
**ALIMENTOS**



UNIVERSIDAD  
DE GUANAJUATO

LA VERDAD OS HARÁ LIBRES



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y la  
División de Ciencias de la Vida del Campus Irapuato-Salamanca a través del  
Departamento de Alimentos otorga la presente:

# CONSTANCIA

A  
**X. Martínez-Ramírez, G.M. Rodríguez-Serrano, E. Contreras-López, J. Añorve-Morga, J. Jaimez-Ordaz, L.G. González-Olivares.**

Por su participación con el trabajo libre:

Crecimiento de bacterias ácido lácticas en presencia de una concentración crítica de inhibición de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

Presentado en el III Congreso Internacional Sobre Innovación y Tendencias en Procesamiento  
de Alimentos y en el XVIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Llevado a cabo del 18 al 20 de Mayo del 2016 en la ciudad de Guanajuato, Gto.  
División de Ciencias Económico Administrativa-UGTO

*Ma. del Rosario Abraham Juárez*  
**Dra. Ma. del Rosario Abraham Juárez**  
Directora del Departamento de Alimentos-UG  
Y Coordinadora del evento

*Juan Gabriel Báez González*  
**Dr. Juan Gabriel Báez González**  
Coordinador del evento  
Facultad de Ciencias Biológicas-UANL

