



**DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA DE IDENTIFICACIÓN DE
BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE
ANÁLISIS MULTILOCUS DE SECUENCIAS (MLSA)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

B. E. IVÁN OSEGUERA LÓPEZ

Director:

Dr. Humberto González Márquez

Asesores:

Dra. Keiko Shirai Matsumoto

Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann

Diciembre/2014

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 283833

Agradecimiento al proyecto Ecos-ANUIES-CONACYT M10-A02.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Diseño de una estrategia de identificación de bacterias ácido-lácticas mediante la técnica de Análisis multilocus de secuencias (MLSA)”

que presentó

B.E. Iván Oseguera López

El día 11 de Diciembre del año 2014

Sinodales:

Presidente: Dra. Keiko Shirai Matsumoto



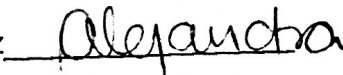
Departamento. Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Secretario: Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann



Centro de Ciencias Genómicas. Universidad Nacional Autónoma de México

Vocal 1: Dra. Alejandra Serrato Díaz



Laboratorio Divisional de Biología Molecular, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Vocal 2: Dra. Ma. Margarita Zayil Salazar Campos



Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Humberto González Márquez
Depto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa.
Lab. de Expresión Génica
hgm@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann
Centro de Ciencias Genómicas
Universidad Nacional Autónoma de México
vinuesa@ccg.unam.mx

Asesora

Dra. Keiko Shirai Matsumoto.
Depto. Biotecnología D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa
Lab. de Biopolímeros
smk@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Humberto González por permitirme continuar con mi formación académica bajo su dirección en este proyecto, por el apoyo y confianza brindada hacia mi persona cuando parecía que las cosas no saldrían adelante, pero sobre todo por sus consejos y su amistad. Muchas gracias Doc.

Al Dr. Pablo Vinuesa por su gran ayuda y apoyo en la realización del presente trabajo, porque a pesar de tener su agenda llena me brindó parte de su tiempo para sacar adelante este proyecto gracias a su vasta experiencia, y sobre todo por el ánimo y felicidad con que transmite los temas que le apasionan.

A la Dra. Keiko Shirai por el apoyo brindado, los consejos y recomendaciones realizadas para mejorar el presente trabajo y sobre todo por proporcionarnos la bacteria clave que hizo que este trabajo fuera posible.

A la Dra. Alejandra Serrato por apoyarme y escucharme siempre, por su participación en realización de todo el trabajo de secuenciación que el presente trabajo involucró, y su ayuda para que mi trabajo saliera adelante.

A la Dra. Beatriz Buentello por su apoyo y el tiempo brindado para realizar las secuenciaciones que no había podido obtener correctamente.

Al Q.F.B. Alejandro Camacho, por proporcionarme las cepas que permitieron complementar y enriquecer este estudio, dado que resulto difícil que alguien más quisiera compartir material biológico para ser aplicado en el presente trabajo. Gracias, por formar parte vital de este proyecto y por todos los consejos y apoyo que me brindo.

A la Dra. Zayil Salazar por los consejos y observaciones aportadas para la mejora del presente trabajo, por el apoyo y los buenos deseos.

A todos, gracias.

DEDICATORIAS

A DIOS por permitirme seguir vivo para cumplir esta meta.

A mis padres, Elizabeth y Alfonso que siempre estuvieron apoyándome y haciendo todo cuanto estuvo en sus manos para que pudiera cumplir este objetivo. Mamá sabes que te amo y estoy agradecido por todo lo que has hecho para formarme como la persona que soy y así seguir saliendo adelante. Papá, gracias por soportarme y apoyarme siempre que lo he necesitado. Se los agradezco con todo mi corazón

A Erick, por apoyarme y escucharme cuando lo necesito, gracias *Pollo* porque a pesar de las discusiones que tenemos como hermanos siempre estamos para apoyarnos.

A mi abuela Roselia que siempre estuvo para mí, que siempre me cuidaba y sé que aún lo sigues haciendo, eres uno de mis pilares para salir adelante. Donde sea que estés *Abue* sabes que te agradezco con todo mí ser, que te amo y que te extraño a cada momento.

A Citlallin Almaguer por todas las palabras de aliento, los buenos consejos y todas las charlas que hemos tenido que me han ayudado a motivarme y seguir superándome.

A mis amigos:

Pedro que siempre has estado para apoyarme y para escucharme, gracias *bro*.

Olivia, gracias por ser mi gran amiga, por escucharme siempre y por apoyarme en todo.

Indra, por apoyarme y escuchar todas mis quejas y reclamos y siempre apoyarme.

Ingrid por apoyarme y confiar en mí, sabes que aún tenemos otro congreso pendiente.

Eréndira, que me apoyaste desde que comenzamos la universidad y que siempre estuviste para mí.

Annel, te agradezco con todo mi corazón por haber llegado a mi vida y permitirme ser parte de la tuya, gracias por soportarme y apoyarme en todo momento, por todos los momentos que hemos pasado juntos y por los momentos que aun nos faltan vivir. Annelita sabes que eres el amor de mi vida y que espero que pronto podamos cumplir una meta que tenemos juntos, te amo.

A todos mis compañeros del Lab. S- 248 y todos los que pudiera haber omitido les agradezco infinitamente.

Sinceramente

Iván

RESUMEN

El género *Lactobacillus* tiene gran importancia científica, médica, alimentaria y biotecnológica. Debido a su versatilidad metabólica, es posible emplearlos como modelo de investigación científica, tal es el caso de la bacteria spB2 (identificada en este estudio como *L. brevis*), utilizada para la obtención de la quitina y el quitosano a partir de desechos de camarón, mejorando la calidad del polímero obtenido (mayor masa molecular e índice de cristalinidad), comparado con el método químico tradicional. Adicionalmente, muchas especies de este género presentan muchas aplicaciones, por lo que resulta interesante su estudio, así como el descubrimiento de nuevas especies y su identificación correcta.

Muchas de las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* sólo han sido identificadas por métodos fenotípicos y algunas otras mediante el gen 16S rRNA o algunos genes constitutivos individuales, lo que ha ocasionado que la información sea redundante y con bajo grado de confiabilidad. Por ello, el desarrollo de la estrategia de identificación por el método Análisis Multilocus de Secuencias (MLSA) para la identificación bacteriana permitirá realizar la identificación exacta y con mayor confiabilidad de cepas aún no identificadas así como definir nuevas especies y la reubicación taxonómica de aquellas que han sido indebidamente clasificadas.

En este trabajo, se analizaron 7 cepas de *Lactobacillus*, se aisló su DNA cromosomal y amplificaron los genes *16S rRNA*, *gyrB*, *pheS*, *tuF* y *Hsp60*. Se realizó una comparación de las secuencias obtenidas mediante el programa PhyML para obtener el análisis filogenético de los genes por separado así como un análisis concatenado. El MLSA es una técnica filogenética muy robusta de análisis y permitió identificar especies del género *Lactobacillus*. Con el análisis concatenado de los genes *pheS*, *tuF* y *Hsp60*, se logró establecer una clasificación taxonómica más estricta para las cepas estudiadas respecto a la obtenida utilizando metodologías fenotípicas o genotípicas con análisis de genes individuales.

ABSTRACT

Lactobacillus genus has a pivotal role in the scientific, medical, biotechnological and food industry research works, because of its metabolic versatility it is possible to use them in several research models, as in the case of spB2 strain (identified as *L. brevis*), used to extract chitin and chitosan from shrimp wastes thus improving the quality of the polymer obtained (high molecular weight and crystallinity index) compared to the traditional chemical method. In addition, as many of the species of this genus are applied with other research purposes, it is interesting to study them, as well as the discovery of new species and their correct identification.

Many of the species belonging to the genus *Lactobacillus* have only been identified by phenotypic methods, and some others through gene sequence comparison of 16S rRNA or by only one housekeeping gene which has resulted in redundant information with low degree of confidence. Therefore, the development of Multi Locus Sequence Analysis (MLSA) for bacterial identification will allow more accurate and reliable identification of strains still unidentified, to define new species and the taxonomic relocation of those who have been wrongly classified.

In this work, seven strains of *Lactobacillus* were analyzed, their chromosomal DNA was isolated and 16S rRNA, *gyrB*, *pheS*, *tuF* and *Hsp60* genes were amplified. When MLSA was carried out with the PhyML program the sequences were analyzed one by one and in a concatenated way, providing a more strict taxonomic classification from the studied strains than that one obtained when phenotypic methods and genotypic analysis of individual genes were used.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	IV
DEDICATORIAS.....	V
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
ÍNDICE GENERAL.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XV
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Definición de especie.....	2
1.1.1 Definición de especie a nivel molecular.....	3
1.1.2 Identificación de Especies.....	3
1.2 Métodos de tipificación de bacterias.....	5
1.2.1 Métodos fenotípicos.....	6
1.2.1.1 Características microscópicas y tinción de Gram.....	6
1.2.1.2 Características macroscópicas.....	7
1.2.1.3 Medios de cultivo y condiciones físicas.....	7
1.2.1.4 Pruebas Bioquímicas.....	8
1.2.2 Métodos moleculares.....	8
1.2.2.1 Análisis de genes específicos.....	9
1.2.2.1.1 Gen 16S del ARN ribosomal (16S rRNA).....	9
1.2.2.1.2 Gen 23S rRNA.....	10
1.2.2.1.3 Región intergénica espaciadora (ITS) 16S-23S.....	10
1.2.2.1.4 Gen <i>gyrB</i>	11
1.2.2.1.5 Gen <i>rpoB</i>	11
1.2.2.1.6 Gen <i>tuF</i>	12
1.2.2.1.7 Gen <i>rpoA</i>	12
1.2.2.1.8 Gen <i>pheS</i>	13
1.2.2.1.9 Gen <i>recA</i>	13
1.2.2.1.10 Gen <i>Hsp60</i>	13

1.2.2.2	Ribotipificación o Ribotyping.	14
1.2.2.3	Análisis de perfiles de ADN por amplificación aleatoria (RAPD)	15
1.2.2.4	Número variable de repeticiones en tándem (VNTRs)	16
1.2.2.5	Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	17
1.2.2.6	Secuenciación de todo el genoma.....	18
1.2.2.6.1	Secuenciador de genoma FLX 454 (Roche Applied Science)	18
1.2.2.6.2	El analizador de genoma Illumina (Solexa).....	19
1.2.2.6.3	Secuenciación de nueva generación SOLiD (The Applied Biosystems ABI System).....	19
1.2.2.7	Secuenciación aleatoria de todo el genoma tipo escopeta (shotgun).....	20
1.2.2.8	Secuenciación al azar de todo el genoma.....	21
1.2.2.9	Análisis de secuencias multilocus o MLSA (Multilocus Sequence Analysis).....	22
1.2.2.10	Tipificación por Multilocus (MLST)	23
1.3	Phylum firmicutes.....	24
1.3.1	Bacterias ácido lácticas	25
1.3.2	Género <i>Lactobacillus</i>	27
1.4	Importancia de la bacteria spB2.....	28
2	ANTECEDENTES.....	31
3	JUSTIFICACIÓN O RELEVANCIA DEL ESTUDIO	32
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
5	HIPÓTESIS.....	33
6	OBJETIVO GENERAL	33
7	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
8	MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
8.1	Preparación de medios	34
8.2	Crecimiento de las cepas.....	34
8.3	Tinción de Gram.....	34
8.4	Aislamiento de la cepa bacteriana	34
8.5	Cinética de crecimiento.....	35

8.6	Pruebas Bioquímicas	35
8.6.1	Catalasa.....	35
8.6.2	Oxidasa.....	35
8.6.3	Crecimiento en medio MRS a 20° y 45 °C	36
8.6.4	Producción de gas en medio MRS a 20° y 45°C	36
8.6.5	Crecimiento en medio MRS en presencia de 6.5% de NaCl.....	37
8.6.6	Crecimiento en condiciones de anaerobiosis.....	37
8.6.7	Capacidad de Acidificación y coagulación en medio Litmus Milk (leche tornasol).....	37
8.6.8	Movilidad en medio Sulfuro Indol Movilidad (SIM)	40
8.6.9	Reacción bilis esculina (Facklam y Moody, 1970).	41
8.6.10	Hidrólisis de arginina en medio MRS modificado.....	41
8.6.11	Fermentación de carbohidratos en caldo rojo de fenol y MRS modificado.....	42
8.7	Pruebas de fermentación API	43
8.8	Obtención de DNA cromosomal.....	43
8.9	Conservación de la cepa bacteriana.....	43
8.10	Selección de genes candidatos para el estudio.	44
8.11	Análisis <i>in silico</i> de los genomas de lactobacilos reportados.....	45
8.12	Depuración de archivos fasta y alineamiento múltiple	46
8.13	Amplificación de secuencias por PCR	46
8.14	Electroforesis de los amplicones obtenidos	47
8.15	Purificación de los amplicones obtenidos	47
8.16	Análisis de los datos obtenidos y construcción del árbol filogenético	47
8.17	Bacterias estudiadas.....	48
9	RESULTADOS	49
9.1	Preparación de medios y crecimiento de las cepas	49
9.2	Tinción de Gram y aislamiento de la cepa	49
9.3	Cinética de crecimiento.....	50
9.4	Pruebas bioquímicas.....	50
9.4.1	Oxidasa.....	50
9.4.2	Catalasa.....	50
9.4.3	Crecimiento en medio MRS a 20°C y 45°C durante 24 hrs.	51

9.4.4	Producción de gas en medio MRS con campana de Durham a 35±2.0°C y 45 °C durante 24 h	51
9.4.5	Crecimiento en medio MRS en presencia de 6.5% de NaCl a 35±2.0°C..	52
9.4.6	Crecimiento en condiciones de anaerobiosis.....	53
9.4.7	Capacidad de acidificación y coagulación en medio Litmus Milk a 20° y 37°C durante 5 días.	53
9.4.8	Movilidad en medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad) 24-48 h a 35±2.0°C..	55
9.4.9	Reacción Bilis Esculina en Agar Bilis Esculina 35±2.0°C durante 2 días .	56
9.4.10	Hidrólisis de Arginina en Medio MRS modificado	56
9.4.11	Fermentación de Carbohidratos en medio MRS modificado.....	57
9.4.12	Fermentación de carbohidratos en medio base Caldo Rojo de Fenol	58
9.5	Pruebas API.....	60
9.6	Obtención del ADN cromosomal.....	60
9.7	Análisis <i>in silico</i> de los genomas reportados de <i>Lactobacillus</i>	61
9.8	Amplificación de los genes por PCR.....	62
9.9	Electroforesis de los amplificadas.....	62
9.10	Secuenciación de los amplificados obtenidos.....	64
9.10.1	Gen 16S rRNA.....	64
9.10.2	Gen <i>pheS</i>	65
9.10.3	Gen <i>Hsp60</i>	65
9.10.4	Gen <i>tuF</i>	65
9.10.5	Gen <i>gyrB</i>	65
9.11	Alineamientos Múltiples	65
9.12	Análisis Filogenético	66
9.12.1	Análisis filogenético del gen 16S rRNA.....	66
9.12.2	Análisis filogenético del gen <i>pheS</i>	68
9.12.3	Análisis filogenético del gen <i>tuF</i>	69
9.12.4	Análisis filogenético del gen <i>Hsp60</i>	70
9.12.5	Análisis concatenado de los genes <i>pheS</i> , <i>tuF</i> y <i>Hsp60</i>	71
10	DISCUSIÓN.....	73
11	CONCLUSIÓN.....	76
12	PERSPECTIVAS	76

13 BIBLIOGRAFÍA	78
14 ANEXOS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Marcadores más usados en la identificación de especies de <i>Lactobacillus</i>	44
Figura 2. Distribución de los genes seleccionados a lo largo de un genoma de <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC14869	45
Figura 3. Tinción de Gram realizada a la cepa spB2.....	49
Figura 4. Curva de crecimiento y disminución de pH en medio MRS durante el crecimiento de <i>Lactobacillus</i> spB2.	50
Figura 5. Prueba de Oxidasa.....	51
Figura 6. Crecimiento en Medio MRS a 20 °C y 45°C por parte de la cepa en estudio spB2 y el lactobacilo referencia, <i>L. plantarum</i>	51
Figura 7. Evaluación de la producción de gas a partir de glucosa a 35° y 45°C por las bacterias spB2 y <i>L. plantarum</i>	52
Figura 8. Crecimiento en presencia de 6.5% de NaCl para las bacterias spB2 y <i>L. plantarum</i>	52
Figura 9. Crecimiento celular en condiciones de anaerobiosis.....	53
Figura 10. Resultados en medio Litmus Milk a 20°C para las cepas spB2 y <i>L. plantarum</i>	54
Figura 11. Resultados medio Litmus Milk a 45°C para las cepas spB2 y <i>L. plantarum</i>	54
Figura 12. Resultados de la prueba en medio SIM	55
Figura 13. Reacción Bilis Esculina	56
Figura 14. Hidrólisis de Arginina en medio MRS modificado.....	57
Figura 15. Fermentación de carbohidratos en medio MRS modificado para las bacterias spB2 y <i>L. plantarum</i>	57
Figura 16. Patrón de fermentación de carbohidratos en medio base caldo rojo de fenol después de 24 h por parte de la bacteria spB2.....	58

Figura 17. Patrón de fermentación de carbohidratos en medio base caldo rojo de fenol después de 48-72 h por parte de la bacteria spB2.....	59
Figura 18. Patrón de fermentación en carbohidratos en medio base caldo rojo de fenol después de 24 por parte de la bacteria referencia.	59
Figura 19. Patrón de fermentación en carbohidratos en medio base caldo rojo de fenol después de 48-72h por parte de la bacteria referencia.....	60
Figura 20. Amplificado del gen 16S rRNA en un gel de Agarosa al 1%.....	62
Figura 21. Amplificado del gen <i>rpoA</i> en un gel de agarosa al 2%.	63
Figura 22. Amplificado del gen <i>Hsp60</i> en un gel de agarosa al 2%.	63
Figura 23. Amplificado del gen <i>pheS</i> en un gel de agarosa al 2%	63
Figura 24. Amplificado del gen <i>tuF</i> en un gel de agarosa al 2%.	64
Figura 25. Amplificado del gen <i>GryB</i> en un gel de agarosa al 2%.	64
Figura 26. Alineamiento múltiple de las cepas en el programa Clustal Omega	66
Figura 27. Árbol filogenético obtenido del análisis del gen 16S rRNA.....	67
Figura 28. Árbol filogenético obtenido del análisis del gen <i>pheS</i>	68
Figura 29. Árbol filogenético obtenido del análisis del gen <i>tuF</i>	69
Figura 30. Árbol filogenético obtenido del análisis del gen <i>Hsp60</i>	70
Figura 31. Árbol filogenético obtenido del análisis concatenado.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros más comunes de Bacterias ácido lácticas (BAL) y sus características	26
Tabla 3. Especies de <i>Lactobacillus</i> identificadas mediante el método MLST	31
Tabla 4. Interpretación de resultados para la prueba en medio Litmus Milk. Imagen tomada de (Leboffe y Pierce, 2012)	39
Tabla 5. Condiciones de PCR probadas para la obtención del amplicón de los genes seleccionados.	47
Tabla 6. Bacterias Lácticas utilizadas como control para el diseño del análisis Multilocus de secuencias para el género <i>Lactobacillus</i>	48
Tabla 7. Cuantificación de ADN obtenido con el kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit mediante Nanodrop.....	60
Tabla 8. Cebadores degenerados seleccionados para llevar a cabo la amplificación de los genes seleccionados.	61
Tabla 9. Temperaturas de alineamiento y tamaño del amplicón esperado bajo las condiciones de PCR estandarizadas.	62
Tabla 10. Ubicación taxonómica de las especies estudiadas.....	72

1 INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, los seres humanos han vivido relacionados con los microorganismos, de los que obtuvieron beneficios que van desde la conservación y producción de alimentos hasta mejoras en la salud. Por otro lado, también son causantes de enfermedades, tanto en humanos, animales como en las plantas pero muchos son indispensables para la sobrevivencia humana y otros, necesarios para el equilibrio de los ecosistemas.

Desde que los microorganismos se aislaron y se cultivaron por primera vez en los laboratorios de microbiología, se ha necesitado caracterizarlos para poder diferenciarlos de otros similares. Las metodologías utilizadas de rutina para describir un aislado microbiano son básicas en todas las ramas de la microbiología. Con el auge de la biología molecular en los años 80's, se desarrollaron nuevas y poderosas técnicas que han ayudado a detectar variaciones más pequeñas dentro de las diversas especies microbianas incluso pudiendo diferenciar entre cepas. Estas técnicas abrieron un nuevo campo de estudio, y eliminaron las barreras de identificación que existen en las técnicas fisiológicas y bioquímicas de identificación microbiana. Anteriormente, la diferenciación entre cepas diferentes sólo se realizaba en el campo de la epidemiología; sin embargo, en la actualidad la investigación científica, biotecnología e industrial ha incrementado la utilización de bacterias en sus procesos, donde también se han desarrollado técnicas y equipos para poder cubrir la necesidad de tipificar a la mayoría de bacterias (Info., 2014)

El análisis multilocus de secuencias (MLSA por sus siglas en inglés), se desarrolla ante la necesidad de identificar y caracterizar microorganismos muy relacionados, de manera precisa y relativamente rápida. Es una técnica filogenética que con ayuda del alineamiento de múltiples genes concatenados permite la identificación de especies que mediante pruebas bioquímicas o análisis de genes individuales no es posible determinar. El MLSA se basa en procedimientos relativamente sencillos que brindan gran exactitud: amplificación de secuencias específicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), separación por movilidad electroforética de los amplicones para determinar si la amplificación fue específica, secuenciación automatizada de los amplicones, construcción de los arboles filogenéticos utilizando las secuencias obtenidas, realización de las

secuencias concatenadas y comparación de estas secuencias para deducir la especie a la que pertenece la bacteria de interés.

1.1 Definición de especie

La primera definición de especie fue dada por Linnaeus, que agrupaba a los organismos de acuerdo con sus características fenotípicas; posteriormente, Darwin agregó la filogenia a la taxonomía y enfatizó la naturaleza arbitraria de las especies biológicas, “el término especie como una forma arbitraria dada por el bien de un conjunto de individuos que se asemeja entre sí”. Estas definiciones pueden ser utilizadas para el análisis de eucariontes pluricelulares, pero no pueden ser aplicadas fácilmente a organismos unicelulares (Chan *et al.*, 2012).

El término especie se usa tanto para representar una categoría taxonómica como para representar a los individuos que se ordenan en el sistema de clasificación. Estos términos tienen dos categorías filosóficas diferentes. La categoría taxonómica de especie es una clase, que no tiene existencia real y que se usa para ordenar objetos. Las especies como individuos, están limitadas espacial y temporalmente, tienen cohesión intrínseca, se reproducen, participan en los procesos naturales y cambian con el tiempo (Silva y Vinuesa, 2007).

La mayoría de los conceptos de especie están basados en similitud, los más conocidos son el morfológico, “poblaciones separadas por una discontinuidad en una serie de biotipos”; taxonómico, “todos los especímenes que un taxónomo considere que son miembros de una misma clase”; fenético, “el nivel de especie es aquel en el que distintos grupos fenéticos pueden ser observados” y ecológico, “son linajes que ocupan una zona adaptativa mínimamente diferente de la de otros linajes”. Estas definiciones se basan en determinar que la variación de un conjunto de caracteres es menor dentro de un grupo que entre grupos, y en que las especies son los grupos más pequeños que exhiben el grado apropiado de similitud (Silva y Vinuesa, 2007).

La biología sistemática ya tiene una definición universal de especie para los organismos eucariotas: Grupo de organismos cuya divergencia está complementada por una fuerza de cohesión; la divergencia entre las especies es irreversible; las especies son ecológicamente distintas. Sin embargo, la sistemática bacteriana aún no ha llegado a un consenso para la definición de la unidad fundamental de la diversidad biológica, la

especie. La bacteriología sistemática trata de delimitar la definición de especie como grupos genéticos y fenotípicos, pero aún no se ha desarrollado una definición teórico-práctica para este concepto (Cohan, 2002).

Dado que aún no se tiene una definición específica, algunos microbiólogos han propuesto definiciones como la siguiente: Las especies bacterianas son entidades reales que pueden ser reconocidas como grupos de genotipos claramente resueltos agrupados con sus similares (Palys *et al.*, 1997). Sin embargo, casi no hay datos para hacer válida esta afirmación, por lo que es necesario preguntarse si poblaciones de bacterias similares hacen, invariablemente (o por lo general), grupos genéticos bien resueltos y discretos que puedan considerarse como especies y evaluar qué métodos deben emplearse para resolver este problema (Hanage *et al.*, 2005).

1.1.1 Definición de especie a nivel molecular.

La delimitación de especies bacterianas se basa en la relación genética entre ellas, con hibridación ADN-ADN como medida representativa; cepas que muestran aproximadamente el 70% o más de relación DNA-DNA se considera que pertenecen a la misma especie y aquellas con menos de este valor, son especies diferentes (Wayne, 1988). La variación en el contenido de genes y el grado de diversidad de secuencia entre las cepas asignadas por hibridación ADN-ADN han llevado a considerar que esta definición es muy amplia, en comparación con la de los organismos superiores (Staley, 1997), mientras que autores otros sugieren que la relación genética por hibridación ADN-ADN como medida representativa debe relajarse aún más para los microorganismos (Vandamme *et al.*, 1996). Esta situación, en conjunto con la dificultad en la hibridación ADN-ADN para muchas cepas a la vez, así como la imposibilidad de realizarlo en bacterias que, hasta el momento, no son cultivables, lleva a la búsqueda de un enfoque más natural y más conveniente a la definición de especie que aún no ha sido dado (Gevers *et al.*, 2005).

1.1.2 Identificación de Especies

Si un aislado microbiano sólo es caracterizado hasta el nivel de género se considera como una identificación parcial, pero sigue siendo una pieza muy útil de información. La

especie es la unidad ecológica y evolutiva fundamental para el estudio de la diversidad biológica es necesaria para conocer las características básicas de las bacterias

Para identificar a nivel de género y en algunas ocasiones de especie, una metodología de rutina incluye caracterizar:

- Morfología celular y características de la colonia.
- Tinción de Gram y otras tinciones específicas.
- Requerimientos físicos.
- Requerimientos nutricionales
- Características metabólicas y bioquímicas.
- Factores de patogenicidad.

En la actualidad algunas pruebas metabólicas se distribuyen en forma de galerías, en las cuales se pueden realizar pruebas específicas para el género deseado, estas galerías son de uso relativamente fácil y los resultados experimentales obtenidos se comparan con los alojados en base de datos, como es el caso del sistema API®.

Como se observa, la metodología de identificación anterior se basa en características morfológicas, estructurales y metabólicas del microorganismo, mejor conocidas como características fenotípicas. Pero desde la invención de la técnica de PCR, la identificación microbiana ha tomado el rumbo de la identificación genotípica, como en el caso del análisis del gen del ARN ribosomal 16S (16S rRNA), uno de los genes más conservados y más estudiados hoy en día.

La importancia de este gen se debe a las siguientes propiedades:

- Este gen codifica para la subunidad pequeña de los ribosomas en eucariontes y en los procariontes se puede encontrar las subunidades 18S y 5S. Por lo tanto se encuentra en eucariontes, procariontes y archaeas (Woese *et al.*, 1990)
- Estos genes presentan regiones de secuencia conservada y regiones de secuencia variable (Woese, 1987)
- Se puede amplificar fácilmente por PCR.
- Pueden estudiarse bacterias no cultivables ya que solo se necesita el ADN para realizar la amplificación.

- Se encuentran disponibles diversas bases de datos donde están almacenadas secuencias curadas de este gen (RefSeq, Silva, RDP11, etc).
- Toda nueva especie descrita necesita por lo menos la secuencia 16S rRNA para poder ser depositada.

No obstante, ya que este gen es tan conservado, muchas bacterias relacionadas pueden tener mucha similitud en su secuencia. La precisión de esta técnica también depende de la calidad de la base de datos con la cual se compara la secuencia.

Las deficiencias en el uso de un solo gen para resolver especies similares se pueden superar mediante el uso de secuencias de genes diferentes. Este enfoque proporciona sitios de nucleótidos más informativos y un sistema amortiguador contra el efecto de distorsión de la recombinación (Hanage *et al.*, 2005). El reemplazo recombinacional homólogo entre especies de un locus, introducido de la especie B en una cepa de la especie A, no debe impedir que, a esta última, se caracterice correctamente como especie A, ya que las secuencias combinadas de los otros loci aún deben agruparla con otras cepas de la especie A. El análisis de la relación de las cepas de especies similares, utilizando secuencias de genes múltiples proporciona la forma más adecuada para la identificación de grupos genotípicos y de evaluación de la capacidad de las secuencias para resolver especies (Gevers *et al.*, 2005).

El análisis de los patrones de agrupamiento en los géneros ya bien estudiados proporciona ejemplos de cómo aplicar el mejor enfoque de multilocus para definir a las especies dentro de los grupos de bacterias similares que no han sido bien estudiados. En tales casos, la identificación de las agrupaciones resueltas proporciona una base para la búsqueda de correlatos biológicos de los grupos, en términos de diferencias fenotípicas, bioquímicas ecológicas o biogeográficas (Gevers *et al.*, 2005).

1.2 Métodos de tipificación de bacterias

En la actualidad la identificación bacteriana se divide en 2 grandes métodos, la identificación fenotípica que se basa principalmente en la morfología de la célula, procesos bioquímicos, medios en los que se puede lograr su crecimiento y condiciones físicas óptimas para ello (Kootallur *et al.*, 2011). Por otro lado, se tiene a los métodos moleculares, que con ayuda del material genético de la bacteria busca una tipificación

más exacta a la que se obtiene por métodos fenotípicos (Emerson *et al.*, 2008). Muchos laboratorios de identificación bacteriana prefieren los métodos fenotípicos ya que son más baratos y más accesibles, sin embargo, hay una mayor probabilidad de cometer errores al identificar la especie mientras que los métodos moleculares son mucho más exactos. Boivin-Jahns *et al.*, (1995) al tipificar un grupo de especies encontraron que mediante los métodos fenotípicos hubo 42 errores y con los moleculares sólo 4, los que además se debieron a la falta de secuencias de referencia en la base de datos.

1.2.1 Métodos fenotípicos

Estos métodos son los más antiguos y más estudiados, están basados en la observación de características como:

- Morfología celular, por medio de microscopia auxiliada de tinciones específicas que pueden servir para dar tonos diferenciales a la célula o teñir algunas estructuras en particular.
- Condiciones físicas de crecimiento óptimas como temperatura, salinidad, concentración de oxígeno, etc.
- Medios de cultivo, los cuales proporcionan nutrientes necesarios para ciertas especies bacterianas, también contienen ingredientes que pueden evitar el crecimiento de especies no deseadas.
- Características bioquímicas, las cuales ayudan a diferenciar bacterias gracias a moléculas que sintetizan para su protección como la catalasa, metabolismo específico de la bacteria, uso de algunos compuestos, resistencia a antibióticos entre otros.

1.2.1.1 Características microscópicas y tinción de Gram

La microscopia es el primer paso para conocer cuál es la bacteria en estudio, este paso busca observar la morfología celular (coco, bacilo, coco-bacilo, vibrio, etc.), saber si las células están dispersas o agrupadas, y el tamaño celular. Para poder observar correctamente estas características son utilizadas algunas tinciones (Bartholomew y Mittwer, 1952), quizá la más importante es la tinción de Gram la cual fue descubierta en 1844 por el bacteriólogo danés Christian Gram (Gram, 1884), esta técnica divide a las bacterias en 2 grandes grupos:

- Bacterias Gram positivas: Su pared celular es robusta y está compuesta de peptidoglicano y sirve a la célula de protección contra el medio ambiente. Esta pared es resistente a los solventes, lo cual permite que el cristal violeta permanezca dentro de la célula dándole una coloración azul.
- Bacterias Gram negativas: Su pared celular es muy delgada, también está compuesta de peptidoglicano pero al ser tan delgada no protege a la célula de los solventes, los cuales crean pequeños orificios por donde sale el cristal violeta, en este caso el colorante de contraste es la safranina, la cual da una coloración rosa a la célula diferenciándola así de las bacterias Gram positivas (Beveridge, 2001).

1.2.1.2 Características macroscópicas

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y forman colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Una colonia está constituida por los descendientes de una o unas pocas células y todas las colonias de una especie pura deben de ser aproximadamente del mismo tamaño (Pírez y Mota, 2006).

Algunas de las características que se observan de la colonia son:

- Forma: circular, irregular o filamentosa.
- Bordes: ondulados, dentados, o lisos.
- Superficie: plana, convexa, etc.
- Coloración: blanca, amarilla, gris, etc.
- Consistencia: lisa, rugosa, mucosa

1.2.1.3 Medios de cultivo y condiciones físicas

Para que una bacteria tenga un buen crecimiento y se pueda propagar es necesario que se le proporcionen las condiciones bioquímicas y biofísicas correctas. Los nutrientes o condición bioquímica se encuentran presente en el medio de cultivo y depende de las necesidades nutricionales específicas de cada bacteria, se ha desarrollado una gran variedad de medios de cultivo para diferentes usos y propósitos. Uno de los usos principales de estos medios es el aislamiento y mantenimiento de cultivos bacterianos puros y para la identificación de bacterias de acuerdo a sus propiedades fisiológicas y bioquímicas (Todar, 2006).

Los medios de cultivo se pueden ocupar con diferentes consistencias, dependiendo de cuál es el objetivo de su uso:

- Medio líquido: Utilizado para el crecimiento y reactivación de cultivos puros.
- Medio sólido: Se utiliza para aislar cultivos puros, además sirve para observar las características macroscópicas de las bacterias.
- Medio semi-sólido: Se utiliza principalmente para la realización de algunas pruebas bioquímicas.

Las bacterias necesitan diversas condiciones físicas para su correcto crecimiento, algunas de estas condiciones son: Temperatura, pH, concentración de oxígeno, disponibilidad de agua, tolerancia a la salinidad etc.

1.2.1.4 Pruebas Bioquímicas

Las pruebas bioquímicas están pensadas para determinar características metabólicas de las bacterias en estudio. Algunas son pruebas rápidas que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas, otras requieren el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia (Bou *et al.*, 2010). En la actualidad algunas de estas pruebas se encuentran prefabricadas como tiras, discos, tabletas o sistemas miniaturizados.

1.2.2 Métodos moleculares

En las décadas pasadas se han desarrollado nuevas herramientas científicas y aproximaciones para determinar a las especies bacterianas y conocer la abundancia de la microbiota y su interacción con el medio ambiente donde residen estos microorganismos. Las técnicas de estudio del genoma bacteriano desde que la técnica del PCR (Mullis y Faloona, 1987) fue implementada y hasta la actualidad han tenido un gran aumento en el número de publicaciones en los últimos años.

El primer genoma bacteriano fue secuenciado en 1995 (Fleischmann *et al.*, 1995) y tomó más de 13 meses en completar este trabajo, en el 2012 se puede secuenciar un genoma bacteriano en pocos días. (Wizemann *et al.*, 2013). Estos métodos son más rápidos y robustos que las técnicas clásicas de identificación fenotípica.

1.2.2.1 Análisis de genes específicos

Una gran variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y especies bacterianas, el análisis del 16S rRNA es el marcador inicial y en algunas situaciones es un marcador suficiente para realizar una identificación precisa. En la actualidad con tecnologías que permiten conocer más a fondo el genoma bacteriano, se siguen estudiando y perfeccionando las técnicas para el estudio de otros genes que puedan servir con mayor precisión para la identificación taxonómica. A continuación se mencionan los más estudiados. En general la metodología para el uso de estos genes es la siguiente:

- Selección del gen de interés, estos genes deben de proporcionar información relevante para la identificación bacteriana.
- Diseño de cebadores específicos para la amplificación de una región del gen de interés.
- PCR con el cual se obtendrá la amplificación de la región de interés con ayuda de los cebadores diseñados anteriormente.
- Electroforesis generalmente en geles de agarosa, en las cuales se visualizarán los amplicones obtenidos y se analizará si corresponde al tamaño esperado.
- Secuenciación con la cual se conocerá el orden en el que se encuentran las bases nitrogenadas en la región amplificada.
- Análisis del gen en bases de datos donde se compararán los resultados obtenidos con los que ya han sido reportados.

1.2.2.1.1 Gen 16S del ARN ribosomal (16S rRNA)

En 1991, poco tiempo después de la invención del PCR, Weisburg y colaboradores desarrollaron cebadores universales para la amplificación del gen 16S rRNA, dichos cebadores siguen siendo utilizados hasta la actualidad (Weisburg *et al.*, 1991). El 16S ARN es un polirribonucleótido de 1550 pb codificado por el gen *rrs* y está compuesto por regiones conservadas y variables, este gen tiene suficientes polimorfismos interespecíficos para proveer diferencias distintivas y estadísticamente válidas. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (Rodicio Mdel y Mendoza Mdel, 2004). En

GenBank están alojadas más de 90,000 secuencias del gen *rrs* secuencias contra las que se puede comparar a la bacteria en estudio (Clarridge, 2004).

En algunos estudios el análisis del 16S rRNA no tiene resolución (variación) suficiente, la gran identidad genética presente en determinados géneros bacterianos o en su asignación taxonómica, no permite realizar, solo con el ARNr 16S, una identificación a nivel de especie o de géneros (Bou *et al.*, 2011). Para los casos donde no es suficiente, se utilizan otros genes que presentan homología menor como los que se mencionan a continuación.

1.2.2.1.2 Gen 23S rRNA

El gen 23S rRNA tiene un tamaño de entre 2902 y 2905 nucleótidos y es esencial para las bacterias ya que presenta actividad de peptidil transferasa que es necesaria para la síntesis proteica (Anton *et al.*, 1999). Los intereses por el estudio de este gen han vuelto a surgir gracias a la disminución en el costo de la secuenciación y las nuevas técnicas que se están implementando para la secuenciación y amplificación de fragmentos grandes de ADN como es el caso de los microarreglos (Pei *et al.*, 2010). El gen 23S rRNA ofrece los mismos beneficios que el gen 16S rRNA: distribución universal, función conservada y regiones del genoma variables e invariables. Adicional a lo anterior, se tiene la ventaja que este gen tiene un mayor tamaño y se pueden observar inserciones o deleciones características y posiblemente una mejor resolución filogenética por su gran variabilidad en las secuencias variables (Hunt *et al.*, 2006), además ya se diseñaron cebadores universales para la amplificación de este gen por medio de PCR (Anthony *et al.*, 2000). Algunos géneros en los que se ha aplicado esta técnica son: *Escherichia* y *Salmonella* (Smith *et al.*, 1988), *Lactococcus* y *Enterococcus* (Betzl *et al.*, 1990), *Staphylococcus* (Roman *et al.*, 2013), *Streptococcus* (Sultana *et al.*, 1998), *Bacillus* (Ash y Collins, 1992), etc.

1.2.2.1.3 Región intergénica espaciadora (ITS) 16S-23S.

Entre los genes 16S y 23S rRNA se encuentra un espacio que no codifica para ninguna proteína, pero se ha sugerido que esta región puede ser una buena herramienta para la identificación a nivel de especie/cepa bacteriana. Muestra secuencias muy conservadas y regiones relativamente estables al final del espaciador (Mora *et al.*, 2003). Los operones que contienen los genes que codifican para los 3 ARNr (16S, 23S, 5S) y sus regiones ITS

asociadas normalmente están presentes en múltiples copias dentro del genoma bacteriano (7 veces en *E. coli* y *Salmonella*, 10 veces en *B. subtilis*). Se ha sugerido que este espaciador puede utilizarse en filogenia para diferencias entre especies (Boyer *et al.*, 2001, Garcia-Martinez *et al.*, 1996). Esta región espaciadora puede amplificarse fácilmente con los cebadores diseñados para la región conservada de los genes 16S y 23S ARNr (Yıldırım *et al.*, 2011). En algunas publicaciones utilizaron esta técnica para identificar géneros como: *Photobacterium* (Osorio *et al.*, 2005), *Bacillus* (Daffonchio *et al.*, 2003), *Burkholderia* (Liguori *et al.*, 2011), *Lactobacillus* (Song *et al.*, 2000), *Staphylococcus* (Sudagidan *et al.*, 2005), entre otros. Actualmente se encuentra disponible una base de datos gratuita donde se pueden comparar secuencias de este espaciador (Rodríguez-Valera y Garcia-Martinez, 2000).

1.2.2.1.4 Gen *gyrB*

El gen *gyrB* codifica para la subunidad β de la ADN girasa, que es una topoisomerasa de tipo II y juega un papel muy importante en la replicación del ADN y está distribuida universalmente en las bacterias. En estudios realizados por Yamamoto y col., (Yamamoto y Harayama, 1995), se desarrolló un cebador universal para este gen, el cual ya ha sido probado ampliamente. La evolución molecular de este gen es más rápida que el que codifica para el 16S rRNA, y es usado ampliamente en estudios filogenéticos de *Flavobacterium* (Peeters y Willems, 2011), *Pseudomonas* (Yamamoto y Harayama, 1995), *Streptococcus* (Glazunova *et al.*, 2009) entre otros. Los resultados de estos estudios demuestran que *gyrB* es un buen marcador filogenético y taxonómico para identificar bacterias a nivel de especie (Wang *et al.*, 2007).

1.2.2.1.5 Gen *rpoB*

El gen *rpoB* codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa, que es universal en todas las bacterias, la secuencia de este gen se ha utilizado en análisis filogenéticos en arqueas y bacterias (Mollet *et al.*, 1997). Se ha utilizado en estudios para la identificación de *Lactobacillus* (Shevtsov *et al.*, 2011), *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2004), *Acinetobacter* (Gundi *et al.*, 2009) y *Staphylococcus* (Drancourt y Raoult, 2002) entre otros.

En numerosas ocasiones las secuenciaciones del gen *rpoB* presentan mayor fidelidad que las del gen 16S ARNr debido al tamaño del amplicón. Adicionalmente, al ser de

reciente caracterización las secuencias del gen *rpoB*, se obtienen buenos resultados cuando se emplean como instrumento de genotipificación y de filogenia (Karah *et al.*, 2011, Bou *et al.*, 2011).

1.2.2.1.6 Gen *tuF*

El gen *tuF* codifica para el factor de elongación termoinestable (tuF), un monómero de 393 aminoácidos con actividad de GTPasa muy abundante en las células procariotas 5-10% de la proteína total celular y está involucrado en la síntesis de proteínas. Esta proteína forma un complejo con el aminoacil-tRNA entrando al ribosoma y permitiendo la síntesis proteica (Weijland *et al.*, 1992).

En 1980 fue identificada por primera vez en *E. coli* (Krab y Parmeggiani, 2002) y se ha descrito que se encuentra distribuida universalmente en bacterias Gram positivas y sólo presentan un gen *tuF* por genoma. La secuencia de este gen, se ha demostrado ideal para estudios filogenéticos donde las especies están muy relacionadas filogenéticamente (Blaiotta *et al.*, 2008).

Algunos bacterias analizados con este gen incluyen géneros y especies de *Streptococcus* (Picard *et al.*, 2004), *Lactobacillus* (Blaiotta *et al.*, 2008), *E. coli* (Maheux *et al.*, 2011), *Staphylococcus* (Hwang *et al.*, 2011) entre otros.

1.2.2.1.7 Gen *rpoA*

El gen *rpoA* codifica para la subunidad alfa de la RNA polimerasa, que presenta un tamaño de 339 aminoácidos y un 70.7% de similitud entre *E. coli* y *B. subtilis* (Cho *et al.*, 1996).

La subunidad alfa es crítica para el ensamblaje de la RNA polimerasa y funciona como control positivo durante el inicio de la transcripción en *E. coli*. Además juega un papel importante en la elongación de la transcripción (Liu *et al.*, 1996).

La secuenciación del gen *rpoA* ha sido utilizada como alternativa del gen 16S rRNA debido a su alto poder discriminatorio (Naser *et al.*, 2007). Algunas especies identificadas mediante este gen son: *Streptococcus* (Park *et al.*, 2010), *Lactobacillus* (Naser *et al.*, 2007), *Enterococcus* (Naser *et al.*, 2005), entre otros.

1.2.2.1.8 Gen *pheS*

El gen *pheS* codifica para la Fenilalanil-tRNA sintetasa, que cataliza la unión de la fenilalanina a su respectivo tRNA para ser depositado posteriormente por el ribosoma en un péptido naciente, un proceso importante en la transmisión de la información genética. En la actualidad este gen está siendo estudiado y se ha encontrado que tiene un poder discriminatorio mayor al gen 16S rRNA (Sarmiento-Rubiano *et al.*, 2010; Naser *et al.*, 2005; Naser *et al.*, 2007).

1.2.2.1.9 Gen *recA*

Este gen produce una proteína de 38 kDa que participa en la recombinación homóloga del ADN (Bazemore *et al.*, 1997), reacción que facilita el intercambio de material genético entre moléculas de ADN homologas (Savir y Tlusty, 2010) y es esencial para el mantenimiento de la integridad genómica y para generar diversidad genética, cuando esta proteína presenta 2 residuos de lisina tiene actividad de ATPasa (Chen *et al.*, 2008). Además presenta algunas funciones bioquímicas como: unión de ADN, intercambio de ADN homologo, hidrólisis de las proteínas LexA, cl y UmuD. Debido a todas estas funciones se ha propuesto este gen y su proteína como marcador filogenético para diferenciar especies relacionadas (Torriani *et al.*, 2001).

Algunas especies y géneros estudiados con este gen son: *Geobacillus* (Weng *et al.*, 2009), *Lactobacillus* (Torriani *et al.*, 2001), *Burkholderia* (Vermis *et al.*, 2002), *Acinetobacter* (Krawczyk *et al.*, 2002), entre otros.

1.2.2.1.10 Gen *Hsp60*

El gen *Hsp60* codifica para una proteína de 548 aminoácidos o 60 kDa, involucrada en la prevención del daño celular causado por altas temperaturas y tiene una amplia distribución, desde bacterias, protozoarios, hongos y humanos (Zeilstra-Ryalls *et al.*, 1991). En procariontes (*E. coli*) la proteína *Hsp60* es la más abundante, alrededor del 1.6% de la proteína celular total a una temperatura de 37°C y es esencial para el crecimiento celular. Si la temperatura es aumentada a 45°C esta proteína puede aumentar hasta el 15% de la proteína celular total (Johnson *et al.*, 1989)

Las proteínas *Hsp60* y *Hsp10* forman un operón en las bacterias, el cual está presente en todas las eubacterias y en los organelos celulares como la mitocondria y los cloroplastos

(Gupta, 1995), se ha sugerido que el gen Hsp60 es un buen candidato para la identificación de bacterias altamente relacionadas (Goh *et al.*, 1996). Algunos de los géneros y especies bacterianas que han utilizado este gen son: *Lactobacillus* (Blaiotta *et al.*, 2008), *Staphylococcus* y *Micrococcus* (Kwok y Chow, 2003), *Vibrio* (Kwok *et al.*, 2002), entre otros.

1.2.2.2 Ribotipificación o Ribotyping.

Es una técnica de biología molecular que utiliza enzimas de restricción para cortar en sitios específicos la secuencia de ADN de las diferentes especies bacterianas ayudando a generar un patrón que es muy útil para la identificación de las especies bacterianas.

Esta técnica debe su nombre al ribosoma, que es parte de la maquinaria celular que fabrica proteínas, se encuentran solamente en las células, por lo tanto la ribotipificación es un método de identificación de bacterias, y no es aplicable en los virus ya que estos no presentan estructura celular (Nelson y Bradley).

Los genes de ADN que codifican el ARNr tienen mucho en común, incluso en especies diferentes. Sin embargo, algunas regiones de los genes que codifican el ARNr son altamente variables, con secuencias muy distintas de una especie a la otra, o incluso de una cepa bacteriana a otra (Nelson y Bradley).

Los genes que codifican el ARNr se encuentran muy conservados, inclusive entre bacterias muy distantes filogenéticamente. Mientras que en los eucariontes la mayoría de los genes consta de una sola copia, en una célula procariota pueden existir varias copias del operón *rnn*, encargado de producir el ARNr; por lo tanto, entre mayor número de copias del operón *rnn* presente una especie bacteriana el ribotipado será más discriminativo. Para establecer la presencia de estos genes, generalmente suelen emplearse sondas marcadas, que contienen las secuencias de los genes ARNr 23S, 16S y 5S de *Escherichia coli* (Zhong *et al.*, 1998).

Las etapas de esta técnica son las siguientes:

- Extracción del material genético, en la actualidad muchos laboratorios comercializan kits de extracción de ADN que permiten obtenerlo con mucha calidad.

- El ADN es cortado mediante el uso de enzimas de restricción, las cuales reconocen una secuencia de 4 a 8 nucleótidos donde realizan el corte, lo que genera fragmentos de ADN de diferentes longitudes. Las enzimas mayormente empleadas son: *AvrII*, *Clal*, *EcoRI*, *HindIII*, *NarI*, *NheI*, *NotI*, *PvuI*, *RsrII*, *SacII* y *SmaI* (Björkroth y Korkeala, 1996, Svec *et al.*, 2005).
- Separación de los fragmentos obtenidos por las enzimas de restricción mediante electroforesis.
- Hibridación DNA-DNA sobre membrana (Southern Blot) para la detección de secuencias de ADN específicas. Los fragmentos obtenidos en la electroforesis se transfieren a una membrana de nylon o nitrocelulosa, y se fijan mediante un tratamiento térmico entre 80-85°C si se emplean membranas de nitrocelulosa, y con luz ultravioleta si se emplean membranas de nylon.
- Desnaturalización e hibridación del ADN con una sonda de ADNc obtenida a partir de la secuencia de un ARNr de *E. coli*.
- Marcaje radiactivo con biotina o digoxigenina. En presencia de esta sonda, cada fragmento de ADN bacteriano contenido en el gen ribosómico se podrá visualizar, obteniéndose un patrón con bandas (ribotipo), que puede compararse entre diferentes especies bacterianas y así establecer la clasificación taxonómica a nivel cepa (Zhong *et al.*, 1998).

1.2.2.3 Análisis de perfiles de ADN por amplificación aleatoria (RAPD)

La técnica se fundamenta en la amplificación al azar de regiones de ADN extraído de los microorganismos a identificar mediante la técnica de PCR. Es necesario contar con información sobre las secuencias específicas del microorganismo a tipificar para poder seleccionar cebadores o cebadores de forma aleatoria. Durante la reacción de PCR se usan temperaturas de alineamiento bajas para garantizar el alineamiento de los cebadores a los productos obtenidos aun cuando exista una o dos bases desapareadas.

El resultado de la amplificación mediante el uso de este tipo de cebadores es un conjunto de fragmentos que difieren en su longitud con base en los diferentes sitios de localización de las secuencias complementarias a estos cebadores. Dentro de las ventajas de esta técnica se puede destacar que los cebadores que utiliza son universales por lo cual no es necesario disponer de una gran cantidad de ADN, no requiere el uso de

sondas o hibridaciones; siendo un método relativamente sencillo y rápido (Ruíz y Rodarte, 2003); (Ben Amor *et al.*, 2007). Algunos perfiles de RAPD se han empleado para distinguir entes cepas de *Bifidobacterium* (Roy *et al.*, 1996) y entre cepas de *L. acidophilus* (Du Plessis y Dicks, 1995).

1.2.2.4 Número variable de repeticiones en tándem (VNTRs)

En los genomas bacterianos existen muchas secuencias repetitivas. A un grupo de repeticiones unidas cabeza con cola se le conoce como tándem las cuales tienen un tamaño de entre 8 y 90 pb. Algunos de éstos son polimórficos debido a las variaciones dadas por el número de repeticiones y el número de copias; estos locus se llaman número variable de repeticiones en tándem (VNTRs). Los VNTRs difieren de una bacteria a otra, y son unidades inestables de variación del ADN producidos por un error durante la síntesis de ADN o la reparación de la doble cadena cuando se presenta un rompimiento. Estas variaciones son fáciles de identificar cuando se presentan tándems de diferentes longitudes dentro de un mismo locus, siendo más informativos los locus mientras mayor variabilidad tengan. Lo anterior podría implicar a los VNTRs como puntos evolutivos y como resultado son utilizados como marcadores para la tipificación de un gran número de especies bacterianas (Chang *et al.*, 2007)

El diseño racional de un esquema de tipificación mediante VNTRs debería incluir marcadores con diferentes niveles de diversidad y poder discriminatorio (Hollender *et al.*, 2013). Así, se podrían agrupar los marcadores en dos conjuntos: uno compuesto por marcadores muy variables, que permitan diferenciar a las distintas cepas, y otro formado por marcadores más estables, con baja diversidad, menos discriminativos, para diferenciar a nivel especie (Whatmore *et al.*, 2006, Le Fleche *et al.*, 2006)

En este análisis se estudia el número de repeticiones de distintos *loci* VNTRs de un mismo organismo, de forma que se crea un perfil característico del mismo.

Los pasos a seguir en esta técnica son:

- Obtención del ADN del organismo en estudio, buscando tener buena calidad en el material genético obtenido.

- Amplificación por PCR, la mayoría de estudios realizados por esta metodología toman los cebadores de la bibliografía, los cuales deben de permitir la amplificación de regiones de distinto tamaño en función del número de repeticiones.
- Interpretación de resultados, se busca conocer el tamaño de los amplificadores separándolos por electroforesis, con esto se asignará el número de repeticiones de cada amplicón.
- Consulta de resultados, los resultados se compararán con los almacenados en algunas bases de datos en internet.

1.2.2.5 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

La electroforesis típica en geles de agarosa permite la separación de moléculas de ADN de hasta 20 kb, sobre este límite la movilidad decrece rápidamente debido a que la molécula se va atorando en la matriz de agarosa (Maule, 2001), si la concentración de agarosa se disminuye a 0.5% se pueden separar bandas de hasta 50 kb. Bajando la concentración antes mencionada el gel se vuelve muy frágil y el tiempo de corrida de la electroforesis aumenta drásticamente. En pruebas realizadas por Fangman (1978), se demostró que moléculas con mayor peso a 50 kb tienen poca separación en geles de 0.1 y hasta 0.4% de agarosa durante más de 18 h.

En 1984, David C. Schwartz y Charles Cantor, diseñaron una metodología con la cual se pueden separar moléculas hasta de 10 Mb. En este método se requiere la preparación del DNA sin fragmentar, digestión del ADN con endonucleasas de restricción y, posteriormente, la separación de los fragmentos por PFGE y la interpretación del bandeo (Schwartz y Cantor, 1984).

La muestra de ADN se pone en un gel de gradiente de agarosa por el cual debe pasar la molécula de ADN, se utilizan campos eléctricos donde la intensidad varía generando “pulsos” alternados. A tensiones elevadas y altas concentraciones de agarosa, las moléculas de alto peso son atraídas y elongadas hacia el campo eléctrico y comienzan a migrar en el gel, por los cambios periódicos en el campo eléctrico. Este primer campo es detenido y un segundo campo en ángulo con el primero es activado. Este cambio hace que el ADN cambie de conformación y se reoriente para poder migrar hacia el segundo campo (Kaufmann, 1998), con lo que las moléculas logran separarse.

1.2.2.6 Secuenciación de todo el genoma

La secuenciación es la metodología que se sigue para conocer el orden en el que se encuentran las bases en una cadena de ADN o en un amplicón obtenido por medio de PCR, esta metodología fue estudiada por Frederick Sanger y colaboradores en los años 70s (Sanger, 1975, Sanger *et al.*, 1977). La limitación para hacer una secuenciación correcta se encuentra en la capacidad del capilar o del equipo automatizado empleado para dicho procedimiento, se pueden secuenciar alrededor de 650-700 pares de bases con buena calidad. Para secuenciar cadenas más grandes es recomendable desarrollar iniciadores intermedios para que se puedan generar amplicones con el rango antes mencionado.

En la actualidad se busca eliminar algunas limitaciones en el proceso de secuenciación:

- Aumentando el número de pares de bases secuenciadas.
- Aumentando el número de secuenciaciones en paralelo
- Reduciendo tiempos del proceso
- Y aumentando la calidad de los datos obtenidos.

A continuación se mencionan algunas plataformas en las que se está trabajando para eliminar las limitaciones antes mencionadas (Ansorge, 2009):

1.2.2.6.1 Secuenciador de genoma FLX 454 (Roche Applied Science)

Este método se basa en la detección de pirofosfato y fue reportado en 1988 (Hyman, 1988), se comercializa para el análisis de 96 muestras en paralelo. El fragmento de ADN se ligada a adaptadores específicos, con lo cual permite que un fragmento se quede adherido al micropocillo. Se crea una mezcla de PCR con gotas de agua y los agentes de PCR inmersos en aceite. Se realiza la amplificación para obtener una buena intensidad de señal de luz generada por quimioluminiscencia. Cuando los ciclos de amplificación de PCR se completan antes de la desnaturalización, cada micropocillo con su amplificado se coloca en un chip de fibra óptica el cual permite la transmisión de luz a través de cada fibra hasta llegar a una cámara sensitiva CCD la cual permite la detección de la posición de la luz emitida. Después se agrega la polimerasa, los cebadores y un nucleótido no marcado para iniciar la síntesis de la cadena complementaria. La incorporación de una base en la cadena creciente por la polimerasa libera un grupo pirofosfato el cual es detectado por la luz emitida permitiendo conocer cuál es el nucleótido que se agrega en

cada especie. Este método puede leer alrededor de 400-500 pb y se está aplicando en la secuenciación de genomas bacteriano, animal y humano.

1.2.2.6.2 El analizador de genoma Illumina (Solexa)

Se basa en la secuenciación por síntesis química, con el uso de nucleótidos terminadores reversibles, los cuales están marcados con colorantes fluorescentes diferentes y una polimerasa especial capaz de incorporarlos. Los fragmentos de ADN se ligan por ambos extremos a los adaptadores, y después de la desnaturalización uno de los extremos se liga a un soporte sólido. Este soporte se llena de adaptadores y adaptadores complementarios. El fragmento inmovilizado crea un puente que se podrá hibridar por el extremo libre con el adaptador complementario.

Se necesita realizar PCR del amplicón para obtener suficiente intensidad en la señal luminosa, después de obtener 1000 copias del amplicón se adiciona a la mezcla de PCR los nucleótidos terminadores, marcados con colorantes fluorescentes diferentes. Después de la incorporación de los nucleótidos, éstos son identificados por la cámara CCD gracias a la fluorescencia. El grupo terminador en el extremo 3' es removido y se repiten los ciclos.

En 2008 este sistema fue mejorado con lo que se obtuvo la posibilidad de secuenciar 3Gb pareadas o 1.5 Gb no pareadas y el tiempo de corrida de 36 ciclos bajo a 2 días para una lectura simple y 4 días para una lectura pareada.

1.2.2.6.3 Secuenciación de nueva generación SOLiD (The Applied Biosystems ABI System)

En esta plataforma los fragmentos de ADN se ligan al adaptador y después se unen a perlas. Una gota de agua en aceite contiene los reactivos de amplificación y solo un fragmento unido a una perla es amplificado por PCR. Después de la desnaturalización del ADN, las perlas se depositan sobre una superficie soporte de vidrio. En un primer paso, el cebador se hibrida con el adaptador, después una mezcla de octámeros de oligonucleótidos también se hibrida a los fragmentos de ADN y se añade la mezcla de unión. En estos octámeros, el doblete de bases cuarta y quinta se caracteriza por uno de los cuatro marcadores fluorescentes al final de la octámero.

Después de la detección de la fluorescencia de las bases 4 y 5 marcadas, se determina la secuencia. Los oligonucleótidos ligados al octámero son cortados después de la quinta base, eliminando la etiqueta fluorescente, entonces los ciclos de hibridación y la ligadura se repiten, esta vez en las bases 9 y 10 en la secuencia y después en la 14 y 15 y así sucesivamente. Las secuencias se pueden determinar en paralelo para más de 50 millones de perlas, lo que resulta en un rendimiento muy alto del orden de Gb por corrida. En 2008 se lanzó una actualización de este sistema, el cual aumenta la secuenciación de 3Gb a 10Gb por corrida y reduce los tiempos de 8.5 a 4.5 días.

1.2.2.7 Secuenciación aleatoria de todo el genoma tipo escopeta (shotgun)

Este método requiere de la fragmentación del ADN en forma aleatoria, estos fragmentos se solapan entre si generando redundancia, la cual posteriormente ayuda para corregir los errores que pudieran ocasionarse durante la secuenciación. Los principales pasos de esta técnica son (Staden, 1979):

- Construcción del mapa físico: El ADN se aísla y se fragmenta alrededor de 150 kb aproximadamente por métodos físicos o enzimas de restricción. Estos fragmentos son clonados en diferentes tipos de vectores: cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC) o cromosomas artificiales del vector P1 (PAC), estas clonas se ordenan en librerías con ayuda de pequeñas secuencias únicas como los sitios de corte de las enzimas de restricción (Martínez, 2004).
- Selección de los clones: se escoge el menor número posible de clonas en las que esté contenido todo el genoma, evitando escoger los que presenten alguna delección o clonaciones quiméricas
- Construcción de las librerías al azar de subclones: se purifica el ADN de los clones escogidos, se fragmenta por sonicación, se separan y se escogen los que están en un rango de 2 a 5 kb y se clonan en vectores derivados del bacteriófago M13.
- Secuenciación al azar: el ADN de los subclones es secuenciado hasta generar una cantidad suficiente de secuencia redundante con respecto al inserto en el clon original, las secuencias se ensamblan *in silico* mediante los solapamientos detectados generando una secuencia contigua o contig.

- Fase de secuenciación dirigida: después de la generación de los contigs, se pueden presentar discontinuidades entre las secuencias, zonas donde el ensamblaje fue erróneo. Esto puede resolverse secuenciando subclones adicionales o mediante la secuenciación directa del DNA del problema con iniciadores específicos.
- Verificación de la secuencia: Se analiza la secuencia generada para determinar la presencia y el orden correcto de los marcadores conocidos de ese clon; sitios de corte de las enzimas de restricción, genes previamente localizados, etc. Y así eliminar los errores producidos en la secuenciación.
- Ensamblaje de la secuencia del genoma: se sigue el orden del mapa físico y se ensamblan las secuencias de los clones, generando la secuencia completa del genoma.

1.2.2.8 Secuenciación al azar de todo el genoma

Esta técnica es más sencilla que la anterior, ya que elimina el uso de clones y la realización de un mapa físico, esta metodología utiliza lecturas obtenidas al azar dentro de todo el genoma.

Los pasos de esta metodología son los siguientes:

- Obtención del ADN y ruptura por métodos físicos y enzimas de restricción al azar de dicho genoma.
- Construcción de librerías de diferentes tamaños (2, 10 y 50 kb). Se obtiene la secuencia de los extremo de los fragmentos clonados hasta que se ha obtenido una elevada redundancia.
- Se ensamblan las lecturas y se analizan mediante programas informáticos, sobre los fragmentos de 2 kb se realiza la mayor parte de la secuenciación, los de 10 kb suministran parejas de lecturas que son esenciales para la construcción de los contigs y para deducir la orientación y el orden, y los de 50 kb, permiten obtener parejas de lecturas muy alejadas entre sí que son necesarias para evitar los problemas derivados de bloques de secuencias repetidas.

1.2.2.9 Análisis de secuencias multilocus o MLSA (Multilocus Sequence Analysis)

La identificación y clasificación de nuevas especies bacterianas se basa en un enfoque polifásico de caracterización fenotípica (crecimiento y morfología), química taxonómica (%mol G+C, composición de lípidos y ácidos grasos), genotípica (hibridación cromosomal DNA-DNA (DDH)) y filogenética (análisis de la secuencia del gen 16S rRNA). Sin embargo, se ha evidenciado que muchas de estas técnicas no permiten la discriminación a nivel de especie, por lo cual nuevas metodologías para la sistematización de bacterias se han implementado con la finalidad de mejorar la eficiencia y precisión en la identificación de nuevas especies bacterianas (Ng *et al.*, 2013).

Recientemente el análisis de múltiples genes constitutivos que codifican para proteínas se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada para la investigación de relaciones taxonómicas. El uso de la información de la comparación y combinación de múltiples genes puede dar una visión global confiable de la relación inter-organismos (Martens *et al.*, 2008). Es así que el análisis de secuencias multilocus (MLSA) compara las secuencias de múltiples loci que codifican para proteínas para evaluar la diversidad y la relación de diferentes aislados a través de un grupo taxonómico relacionado, utilizando un enfoque filogenético o cladístico apropiado (Naser *et al.*, 2005).

Consiste en evaluar entre 5 y 7 genes constitutivos, concatenando las secuencias particionadas de un conjunto de organismos como un grupo, generando una “supermatriz” utilizada para inferir la filogenia de bacterias cercanas, tomando en consideración los criterios distancia-matriz o el de optimización. Con esta técnica, se ha demostrado una mejora en la resolución taxonómica durante la clasificación a nivel especie debido al gran número de caracteres que se analizan, disminuyendo también la sensibilidad de señales contradictorias (incongruencias filogenéticas) que se presentan por la transferencia horizontal de genes

Sin embargo, se ha resaltado que la concatenación de todos los alineamientos de secuencias disponibles, se pierde la evidencia de señales en conflicto de la filogenética en los datos particionados así como también la posibilidad de descubrir los procesos evolutivos que dieron origen a estas señales contradictorias; un punto muy importante en el ámbito microbiano donde las señales más marcadas se deben a la existencia de transferencia horizontal de genes (Vinuesa, 2010).

Algunas de los géneros estudiados por este método son: *Edwarsiella* (Abayneh *et al.*, 2012), *Enterococcus* (Naser *et al.*, 2005), *E. coli* (Danzeisen *et al.*, 2013), *Xanthomonas* (Young *et al.*, 2008) y *Bradyrhizobium* (Vinuesa *et al.*, 2008).

1.2.2.10 Tipificación por Multilocus (MLST)

En las bacterias el material genético está constituido por una molécula de ADN circular (entre 0.5 y 10 millones de pares de bases) y, además, por un conjunto variable en número de moléculas relativamente pequeñas de ADN circular (5 a 100 mil pares de bases) denominadas plásmidos (Orellana, 2002).

La MLST es un procedimiento robusto para caracterizar cepas de especies bacterianas mediante las secuencias de los fragmentos internos, en general, siete genes de mantenimiento, se utiliza principalmente en epidemiología molecular. Se utilizan fragmentos internos de aproximadamente 450-500 pb de cada gen, ya que pueden ser secuenciadas con precisión ambas cadenas usando un secuenciador de ADN automatizado. Para cada gen de mantenimiento, las secuencias diferentes presentes en una especie bacteriana son asignadas como alelos diferentes y, para cada aislamiento, los alelos en cada uno de los siete loci definen el perfil alélico o secuencia tipo (MLST). Los loci seleccionados son genes constitutivos, que evolucionan lentamente en escala de tiempo evolutivo, por lo tanto son marcadores robustos de ancestros modernos y antiguos. La secuenciación de varios locus permite un balance entre la viabilidad y resolución de la técnica (Ahmed *et al.*, 2006).

El uso de la MLST como método para la caracterización bacteriana proporciona beneficios como:

- Mejor conocimiento de la biología, población y evolución bacteriana (Maiden *et al.*, 1991).
- Aumenta disponibilidad y disminuye el costo de la determinación de la secuencia de nucleótidos (Maiden, 2000).

Los datos se pueden revisar instantáneamente en las bases de datos alojadas en Internet, permitiendo un intercambio eficaz de la información (Chan *et al.*, 2001). Estos datos son de acceso libre y permiten ser usados como guías para la comparación directa de bacterias aisladas, sin requerir el intercambio potencialmente peligroso de los aislados o reactivos especializados, brindando en general un lenguaje común para la identificación

bacteriana (Maiden, 2006). Algunas de las especies que ya han sido estudiados por este método son: *Vibrio*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus* entre otros. En las bases de datos de MLST sólo existen 2 datos para *Lactobacillus*. Se realizó una búsqueda en la página de PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) con las palabras *Lactobacillus* y MLST el cual sólo arrojó 14 resultados, de los cuales 13 corresponden a estudios donde se identificó al menos una especie de *Lactobacillus* por el método de MLST, en ningún caso los cebadores fueron universales para las especies de Lb.

1.3 Phylum firmicutes

Se encuentra conformado por aproximadamente 26 familias y 223 géneros, compartiendo como característica principal la de poseer un bajo contenido de G+C% (<50%). La mayoría de los géneros son Gram-positivos de pared celular rígida con ácidos murámicos y teicoicos, además de algunos géneros Gram- negativos. La morfología es diversa, las células pueden ser esféricas, bacilares rectas, curvadas o helicoidales, con o sin flagelos; además de presentar la capacidad de producir endosporas. El phylum engloba organismos aerobios, facultativos, anaerobios y anaerobios estrictos. Algunos miembros son termófilos y/o halófilos, la mayoría quimiorganótrofos, algunos fotoheterótrofos anoxigénicos; con crecimiento principalmente a pH neutro, mientras que otros son acidófilos o alcalinófilos (Schleifer, 2009).

Los integrantes principales que conforman este phylum, considerando la clasificación taxonómica más recientes son las clases *Bacilli* (*Firmibacteria*), *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Negativicutes*, *Thermolithobacteria* www.bacterio.cict.fr (Euzéby, 2008)

Clase I: Bacilli

Orden *Bacillales*

Dentro de éste, la familia *Bacillaceae* es la más grande, siendo el género *Bacillus* el más abundante y con la característica de ser formadores de endosporas. En general se distinguen por ser microorganismos quimioheterótrofos, de forma bacilar, con respiración aerobia (algunos utilizan los nitratos) y móviles debido a la presencia de flagelos peritricos. (Leboffe y Pierce, 2012).

Orden *Lactobacillales*

Se conforma por bacilos y cocos Gram-positivos, no formadores de endosporas, usualmente anaerobios facultativos y catalasa negativos. Incluye a las familias *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae*; las cuales forman parte del grupo de organismos ampliamente distribuidos y estudiados, las bacterias ácido lácticas (BAL).

Clase II: *Clostridia*

Esta clase resulta muy diversa desde las perspectivas fenotípica, quimiotaxonómica, fisiológica y ecológica. Contiene tanto organismos Gram- positivos como Gram-negativos; siendo representada por los órdenes *Clostridiales*, *Halanaerobiales* y *Thermoanaerobacterales*.

Clase III: *Erysipelotrichia*

En la clasificación más reciente, se incluye a este orden como parte del *phylum* debido al análisis de secuencias del 16S rRNA, debido a lo cual sólo se incluye a la familia *Erysipelotrichaceae* y sus ocho géneros. Se caracterizan por ser bacilos delgados con estructura en su pared celular característica de bacterias Gram-positivas, no producen endosporas, pueden ser aerobios y/o anaerobios facultativos, quimiorganótrofos, con metabolismo respiratorio y/o débilmente fermentativo, además de carecer de citocromos.

1.3.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) engloban un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen como característica común, la producción de ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr *et al.*, 2002). Las BAL son bacterias Gram-positivas con morfología de coco o bacilo, no formadoras de esporas, ácido tolerantes, anaerobios facultativos, carentes de catalasa y desprovistas de citocromos. Con base en la clasificación taxonómica más reciente, pertenecen al *phylum Firmicutes*, clase *Bacilli* y orden *Lactobacillales*. Las BAL incluyen a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Leuconostoc* (Giraffa *et al.*, 2010). Los más representativos y sus características principales se enlistan en la Tabla I (Salminen y Von Wright, 2004).

Tabla 1. Géneros más comunes de Bacterias ácido lácticas (BAL) y sus características

Familia	Género	Características								
		Forma	CO ₂ a partir de glucosa	Crecimiento						Ácido Láctico
				10°C	45°C	6.5% NaCl	18% NaCl	pH 4.4	pH 9.0	
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i>	Cocos (tétrada)	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Carnobacterium</i>	Bacilos	-	+	-	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	Cocos	-	+	+	+	-	+	+	L
	<i>Tetragenococcus</i>	Cocos (tétrada)		+	-	+	+	Variable	+	
	<i>Vagococcus</i>	Cocos		+	-	-	-		-	
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	Variable	Variable	Variable	Variable	-	Variable	-	D, L, DL
	<i>Pediococcus</i>	Cocos (tétrada)	-	Variable	Variable	Variable	-	+	-	L, DL
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	Cocos	+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Oenococcus</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D
	<i>Weisella</i>		+	+	-	Variable	-	Variable	-	D, DL
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	Cocos	-	+	-	-	-	Variable	-	L
	<i>Streptococcus</i>		-	-	Variable	-	-	-	-	L

ND= No determinado

Con excepción de algunas especies, a los miembros que conforman las BAL se les considera como organismos seguros, no patógenos y son conocidos como GRAS (por sus siglas en inglés, Generally Recognized as Safe) por la FDA, principalmente aquellos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc* (Mayo *et al.*, 2010). Desde un punto de vista bioquímico, las BAL incluyen organismos tanto homofermentativos cuyo principal producto es ácido láctico, como heterofermentativos, producen adicionalmente otros compuestos como ácido acético, etanol, CO₂ y ácido fórmico como producto de la fermentación (Kleerebezem y Hugenholtz, 2003).

Son organismos fermentativos, que residen de forma natural o se añaden intencionalmente en ambientes ricos donde los carbohidratos y proteínas se encuentran en proporciones altas; de tal manera que pueden encontrarse en medios como la leche, productos lácteos, vegetales y plantas, cereales, carnes y sus derivados, etc. Adicionalmente, muchas especies se emplean en la elaboración y preservación de alimentos fermentados, donde pueden estar presentes como microorganismos contaminantes o ser añadidos como cultivos iniciadores para llevar un control del proceso fermentativo; teniendo los procesos enzimáticos de las BAL un papel muy importante, al contribuir con las características organolépticas, reológicas y nutricionales de éstos alimentos (Mesas *et al.*, 2006). Las BAL genéticamente modificadas son utilizadas ampliamente para la producción de alimentos fermentados, probióticos y vacunas vivas (Yang y Chang, 2011).

1.3.2 Género *Lactobacillus*

Este género representa el grupo más grande dentro de la familia *Lactobacillaceae* con más de 150 especies y subespecies www.bacterio.cict.fr (Euzéby, 2008). Los miembros del género son inmóviles, no productores de esporas, tienen forma bacilar que puede ser desde células alargadas y muy delgadas hasta cocobacilos cortos dependiendo de las condiciones de crecimiento, a menudo se encuentran organizados en cadenas.

En general, los lactobacilos son microaerófilicos, teniendo un mejor crecimiento bajo condiciones de anaerobiosis o con baja presión de oxígeno y un pequeño porcentaje de CO₂ (De Vuyst, 2000, Klein *et al.*, 1998). Con base en la fermentación de los

carbohidratos, se pueden distinguir tres grupos: (Pot *et al.*, 1994, Hammes y Vogel, 1995, Curry y Crow, 2002).

- Homofermentativos obligados: fermentan las hexosas casi por completo produciendo ácido láctico, mientras que las pentosas y el gluconato no son fermentados.
- Heterofermentativos facultativos: fermentan las hexosas generando ácido láctico, pero bajo condiciones limitantes producen adicionalmente también ácido acético, etanol y ácido fórmico; asimismo las pentosas son fermentadas en ácido láctico y acético.
- Heterofermentativos obligados: fermentan las hexosas y producen ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol; mientras que las pentosas generan ácido láctico y acético.

Debido a su actividad metabólica toleran los medios ácidos y crecen en un rango de pH que va desde 6.8 a 4.5. Se pueden encontrar en gran variedad de nichos ecológicos, plantas, animales y leche cruda (Hammes y Vogel, 1995), además de algunos insectos. Su amplia distribución se debe, principalmente, a su gran versatilidad metabólica. Los hábitats naturales son el tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales, el suelo, las plantas y alimentos fermentados; como un organismo deseable (leche, carne, vegetales, cereales) o como contaminante (cerveza, algunos productos cárnicos y lácteos fermentados, pescados, mezclas de frutas y verduras) (Limsowtin *et al.*, 2002). Además, se le atribuyen propiedades profilácticas, terapéuticas y probióticas. En los últimos años ha tenido una gran aplicación biotecnológica para la obtención de productos de alto valor agregado, el uso de algunas cepas de éste género permite aprovechar subproductos del camarón como quitina y quitosano (Shirai Matsumoto, 1999).

1.4 Importancia de la bacteria spB2

En México y en el mundo se produce una gran cantidad de desechos de camarón; su captura alcanza internacionalmente 3.4 millones de toneladas (Gillett, 2008). En nuestro país esta cifra va desde 62,000 a 74,000 toneladas anualmente (Anónimo, 2011), y se calcula que los desechos (cabeza y tórax) son del 35-45% del peso total (Cira *et al.*, 2002).

De estos subproductos, solamente el 5% es utilizado en la alimentación animal, el resto, es desechado, provocando un serio problema de contaminación (Cira *et al.*, 2002). Los desechos de camarón representan una fuente rica en productos con alto valor agregado como: pigmentos, proteínas (Gimeno *et al.*, 2007), quitina y quitosano (Pacheco *et al.*, 2011).

En los desechos de camarón la quitina está combinada con proteínas que forman una matriz, que se encuentra calcificada y forma exoesqueletos duros; también contiene lípidos provenientes de residuos de músculo, pigmentos como astaxantina y algunos ésteres.

El método químico tradicional para la extracción de quitina y quitosano consta de 3 pasos básicos:

- Desproteínización: separación de proteínas, con un tratamiento álcali, principalmente se utiliza NaOH 1 M, con duración de 1 a 72 h y un rango de temperatura de 65-100°C.
- Desmineralización: eliminación de carbonato y fosfato de calcio por un tratamiento con HCl 0.27-2 M durante 1- 48 h y con un rango de temperatura 0-100°C.
- Blanqueamiento químico para la obtención de un producto incoloro. Mezcla de cloroformo:metanol:agua, 1:2:4 a 25°C, para la remoción de pigmentos.

Para la producción de 1 kg de quitosano 70% desacetilado a partir de desecho de camarón se requieren: 6.3 kg de HCl, 1.8 kg de NaOH, 0.5 toneladas de agua para el proceso y 0.9 toneladas de agua para enfriamiento. Debido al alto costo de producción el precio del quitosano en pequeñas cantidades en el año 2000 era de 7.5 USD/10 g (Ravi Kumar, 2000). La quitina y el quitosano son comercialmente importantes debido a su alto contenido de nitrógeno (6,89%). Además son sustituyentes potenciales de algunos polímeros sintéticos debido a sus excelentes propiedades, tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, toxicidad nula, entre otras (Parada *et al.*, 2004).

Como una opción para disminuir la contaminación por los desechos químicos se utiliza el ensilaje o fermentación biológica que permite la recuperación de los demás productos de valor agregado, siendo una alternativa menos nociva para el medio ambiente (Islas-Enríquez, 2010) y de menor costo además permite mejorar la calidad del polímero

obtenido (mayor peso molecular e índice de cristalinidad) comparado con el método químico tradicional (Pacheco *et al.*, 2011). En este proceso es necesario el uso de bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* como la bacteria spB2, las cuales producen ácido láctico in situ. El ensilado y producción de ácido láctico inducen la licuefacción de los desechos de camarón, además de disminuir el pH. Un efecto colateral es la desmineralización y precipitación parcial de los iones de calcio como lactato de calcio (Gimeno *et al.*, 2007). Este proceso da como resultado un licor rico en proteínas, minerales y carotenoides, además de una fracción sólida rica en quitina (Islas-Enríquez, 2010).

Se ha propuesto la posible sustitución de álcalis y ácidos por proteasas y exoenzimas bacterianas (Xu *et al.*, 2008, Sini *et al.*, 2007), lo cual ayudaría a abaratar costos y eliminar la contaminación producida al medio ambiente por el uso del método químico.

2 ANTECEDENTES

- Se ha demostrado que la identificación por el MLSA es un método muy robusto y se está volviendo indispensable para la identificación bacteriana.
- La base de datos LPSN, (Lista de Nombres de Procariontes con Base en la Nomenclatura, <http://www.bacterio.cict.fr>), muestra que existen, hasta la fecha, 212 especies y 29 subespecies del género *Lactobacillus*, de las cuales, solo 158 tienen secuencias de referencia del gen 16S rRNA.
- Existen muy pocos estudios de MLSA, dentro de los cuales aún no se desarrolla un método universal para la identificación de *Lactobacillus*. En una búsqueda realizada en la base de datos de publicaciones Pubmed del NIH, solo se encontraron 2 estudios, el primero para *L. fermentum* y *L. plantarum* utilizando los genes *rpoA*, *pheS* y *atpA* (Oguntoyinbo y Narbad, 2012), y el segundo mas parecido a MLST donde identificaron a *L. reuteri* utilizando los genes *ddl*, *pkt*, *leuS*, *gyrB*, *dltA*, *rpoA* y *recA* (Oh *et al.*, 2010) y 3 estudios que plantean el cambio de nombre de algunas especies.
- Se han desarrollado estudios de MLST para los siguientes lactobacilos

Tabla 2. Especies de *Lactobacillus* identificadas mediante el método MLST

Espece estudiada	Referencia
<i>L. acidophilus</i>	(Ramachandran <i>et al.</i> , 2013)
<i>L. casei</i>	(Cai <i>et al.</i> , 2007)
<i>L. delbrueckii</i>	(Adimpong <i>et al.</i> , 2013, Tanigawa y Watanabe, 2011)
<i>L. johnsonii</i>	(Buhnik-Rosenblau <i>et al.</i> , 2012)
<i>L. paracasei</i>	(Parolo <i>et al.</i> , 2011)
<i>L. plantarum</i>	(Gosiewski <i>et al.</i> , 2012, Strus <i>et al.</i> , 2012, Tanganurat <i>et al.</i> , 2009, de Las Rivas <i>et al.</i> , 2006)
<i>L. sakei</i>	(Chaillou <i>et al.</i> , 2013)
<i>L. salivarius</i>	(Raftis <i>et al.</i> , 2011)
<i>L. sanfranciscensis</i>	(Picozzi <i>et al.</i> , 2010)

- El uso de la bacteria spB2 para la obtención de quitina, ayuda a disminuir la contaminación generada por los desechos y el uso del método químico en la extracción de este polímero. El método biológico, que involucra la utilización de la bacteria spB2 ha demostrado ser una buena alternativa frente al método químico para la extracción de productos de alto valor agregado.
- Estudios de MLST, realizados en 2012, con cebadores específicos para *L. plantarum* y *O. oenos*, no permitieron la amplificación de ningún gen.

3 JUSTIFICACIÓN O RELEVANCIA DEL ESTUDIO

- La identificación de una bacteria y, en especial, de una que presente beneficios económicos es determinante para la publicación de los resultados y el posible desarrollo de patentes.
- La gran mayoría de las especies de *Lactobacillus* reportadas sólo se han identificado por métodos bioquímicos tradicionales, lo que ha ocasionado que la información sea redundante y con bajo grado de confiabilidad. Por ello, la implementación de la MLSA para la identificación bacteriana permitirá la identificación más exacta y con mayor confiabilidad de posibles nuevas especies; además de la reubicación taxonómica de aquellas que han sido indebidamente clasificadas.
- El MLSA en la actualidad es uno de los mejores sistemas de identificación bacteriana, ya que permite caracterizar e identificar con buena efectividad especies de un género específico.
- El desarrollo de sistemas MLSA para todos los tipos bacterianos es una prioridad, científica e industrial ya que se evitarían problemas de propiedad industrial y de resultados de investigaciones científicas.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante los estudios de recuperación de productos de alto valor agregado a partir de desechos de camarón, mediante la fermentación con una bacteria ácido-láctica realizados en el laboratorio de Biopolímeros de la UAM, no se ha podido determinar hasta la fecha, la localización taxonómica de la bacteria láctica utilizada en dicho proceso, ya que presenta similitudes bioquímicas con especies relacionadas.

En el año 2012, se intentó realizar una caracterización molecular mediante amplificación de la región 16S ribosomal y algunos genes constitutivos, de acuerdo a de Las Rivas *et al.* (de Las Rivas *et al.*, 2006), en donde se obtuvo solamente la amplificación de la región 16S y se comprobó que se trata de un lactobacilo, sin poder determinar la especie.

5 HIPÓTESIS

El desarrollo de una estrategia *MLSA para Lactobacillus sp.* permitirá caracterizar e identificar la especie de la cepa bacteriana utilizada para la fermentación de residuos de camarón y otras bacterias lácticas que no han sido caracterizadas plenamente.

6 OBJETIVO GENERAL

Diseñar y montar la técnica *MLSA* para caracterizar bacterias lácticas del genero *Lactobacillus*.

7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Re-aislamiento de la cepa de *Lactobacillus spB2*.
- Determinar el mejor medio de crecimiento para la bacteria *spB2*.
- Determinar por pruebas bioquímicas y de fermentación de carbohidratos el género de la bacteria *spB2*
- Determinar el mejor método para la extracción y almacenamiento de material genético.
- Hacer un estudio *in silico* para determinar a los mejores blancos de amplificación, diseño de cebadores para la amplificación de genes “house keeping” y desarrollo de la amplificación de locus múltiples.
- Estandarizar la amplificación de los genes escogidos.
- Análisis *in silico* de los resultados obtenidos para confirmar el género y determinar la especie bacteriana.

8 MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Preparación de medios

Se utilizaron dos medios de cultivo diferentes para seleccionar aquel que permitiera obtener el mayor crecimiento bacteriano: MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (De Man *et al.*, 1960) y M17 (Terzaghi y Sandine, 1975), los componentes se muestran en la Tabla 1 (Anexo 1). Asimismo, el medio MRS se probó como medio basal, suplementado con los carbohidratos; lactosa y glucosa.

8.2 Crecimiento de las cepas

Las cepas se cultivaron en medios líquidos M17 y MRS pH 6.8, a 37°C, sin agitación, durante 24 horas para su reactivación. Posteriormente se sembraron por estría cruzada en medios sólidos para el correcto aislamiento de las mismas.

8.3 Tinción de Gram

De la caja proporcionada para el estudio se realizó la tinción de Gram. En un portaobjetos se agregó una gota de agua. Con el asa bacteriológica se tomó una colonia aislada y depositó en la gota de agua para esparcir la muestra. Finalmente se fijó la preparación bacteriana pasándola por la flama de un mechero para agregar los colorantes en el siguiente orden:

- Cristal violeta 1 gota, se dejó actuar durante 1 minuto. Se lavó con agua.
- Lugol 1 gota, la cual se dejó actuar durante 1 minuto.
- Mezcla Alcohol/Acetona 70/30, se inclinó el portaobjetos y se agregó la mezcla gota a gota, se lavó inmediatamente con agua.
- Safranina 1 gota, actuando durante 1 minuto, se lavó, seco y observaron al microscopio los frotis bacterianos.

8.4 Aislamiento de la cepa bacteriana

A partir de la caja proporcionada, se tomó una colonia de la bacteria láctica, se puso a crecer en medio MRS líquido durante 24 h, se resembró en una caja de agar MRS para tener colonias aisladas. Debido a que la muestra observada presentaba dos

morfologías diferentes, cocos y bacilos, se realizaron los pasos de dilución y tinción de Gram hasta que se logró obtener una caja con colonias puras aisladas.

8.5 Cinética de crecimiento

A partir de un cultivo puro, se tomaron varias colonias y diluyeron en 3 ml de medio MRS hasta una turbidez correspondiente al 0.5 de McFarland. Se inocularon 50 μ l en un matraz con 50 ml de medio MRS. El crecimiento fue monitoreado durante cada hora a una longitud de 620 nm hasta las 24 h (se realizaron diluciones decimales a partir de la 10^a h), y registrando la densidad después de transcurrir 36 y 40 h de crecimiento. El descenso en el pH fue monitoreado durante el mismo tiempo. Ambos ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

8.6 Pruebas Bioquímicas

Con el propósito de identificar el género de la especie problema se realizaron pruebas bioquímicas tradicionales que permitieran corroborar su pertenencia al grupo de las BAL y para establecer la correspondencia con el género *Lactobacillus* se evaluó la motilidad y fermentación de diferentes azúcares; determinándose el perfil bioquímico con base en el manual de Bergey's. La bacteria problema y la bacteria referencia (*L. plantarum*) se propagaron previamente en dos ocasiones en caldo MRS, usándose en las pruebas un cultivo con 12-18 h de crecimiento. Se corroboró la morfología mediante la tinción de Gram.

8.6.1 Catalasa

Esta prueba detecta la producción de la enzima catalasa, la cual rompe el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, que se aprecia por la generación de burbujas. Una colonia aislada fue colocada en un portaobjetos, se agregaron 3 gotas de H₂O₂ al 3% y observó la presencia y/o ausencia de burbujeo durante dicha reacción (Taylor y Achanzar, 1972).

8.6.2 Oxidasa

La prueba está diseñada para identificar la presencia de la enzima citocromo C oxidasa. Esta enzima tiene la capacidad no sólo de oxidar el Citocromo C, sino también de

catalizar la reducción de los citocromo c por acción de un agente cromogénico reductor llamado tetrametil-p-fenilendiamina, que desarrolla un color azul cuando esta oxidado. Por lo tanto, un cambio repentino en el color se produce en segundos si el agente reductor es oxidado, indicando que la enzima citocromo c oxidasa está presente. La ausencia de cambio de color dentro de un tiempo designado significa que la enzima no está presente y la prueba se considera negativa (Leboffe y Pierce, 2012).

Para realizar la prueba, se emplearon los discos comerciales de oxidasa (Fluka 70439), y con un asa bacteriológica se esparció una colonia aislada en el disco impregnado del reactivo de oxidasa. Se observó el desarrollo de un color morado oscuro después de 2 minutos, que indicará la presencia o ausencia de la enzima (Jurtshuk y McQuitty, 1976).

8.6.3 Crecimiento en medio MRS a 20° y 45 °C

La habilidad que presentan las bacterias lácticas para desarrollarse a diferentes temperaturas permite una primera discriminación a nivel género que permita una aproximación mayor para la identificación de una especie bacteriana. Las temperaturas que más se emplean en esta primera caracterización son el crecimiento a 4°C, 10°C, 20°C, 37°C y 45°C en medio MRS durante 7-10 días en el caso de las menores temperaturas y de 48 hh-5 días para las temperaturas restantes.

Tubos con medio MRS se inocularon a partir de cultivos de las bacterias en estudio. Se colocaron en incubadoras a la temperatura seleccionada y se observó la presencia y/o ausencia de crecimiento durante 24 h.

8.6.4 Producción de gas en medio MRS a 20° y 45°C

La producción de gas (CO₂) a partir de glucosa, permite la clasificación de las bacterias ácido lácticas como homofermentativas y heterofermentativas. La prueba se realiza generalmente en medio MRS modificado (con citrato diamónico que reemplaza al sulfato de amonio) conteniendo tubos invertidos de Durham (Samelis *et al.*, 1994).

Para la prueba, tubos con medio MRS con campanas de Durham fueron inoculados a partir de cultivos de las bacterias en estudio. Se colocaron en incubadoras a la temperatura seleccionada, se registró el crecimiento y la presencia y/o ausencia de burbujas de gas (CO₂) en el interior de las campanas de Durham durante 24-48 h.

8.6.5 Crecimiento en medio MRS en presencia de 6.5% de NaCl

La tolerancia de las bacterias lácticas a diferentes concentraciones salinas se evalúa al adicionar un porcentaje de cloruro de sodio (NaCl; 4-10%p/v) en medio MRS y determinando el crecimiento celular incluso después de transcurrir 5-7 días. Aquellas cepas tolerantes podrán desarrollarse durante las 24 h, requiriéndose un mayor tiempo en el caso de otras.

Para evaluar esta capacidad, las bacterias en estudio fueron inoculadas en medio MRS adicionado con 6.5% de NaCl, durante 24-48 h a una temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

8.6.6 Crecimiento en condiciones de anaerobiosis

Se inocularon los tubos con medio MRS a partir de un cultivo no mayor a 18 h de crecimiento de las bacterias estudiadas. Los tubos se incubaron en jarras bajo condiciones de anaerobiosis (GasPak System, BBL) durante 24-48 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

8.6.7 Capacidad de Acidificación y coagulación en medio Litmus Milk (leche tornasol)

La Leche Tornasol o Litmus Milk, es un medio indefinido que contiene leche descremada y el indicador de pH azolitmin. La leche descremada proporciona nutrientes para el crecimiento, lactosa para la fermentación y proteínas en forma de caseínas. El azolitmin (litmus) es de color rosa a pH 4.5 y azul a pH 8.3, entre estos extremos presenta una coloración morada.

En este medio se producen cuatro reacciones básicas: 1) Fermentación de la lactosa, 2) Reducción del Litmus, 3) Coagulación de caseínas e 4) Hidrólisis de caseínas. En combinación estas reacciones producen una variedad de resultados, cada uno de los cuales se utilizan para diferenciar bacterias.

La fermentación de la lactosa acidifica el medio y torna el Litmus rosa. Esta reacción ácida, inicia con la hidrólisis del disacárido en sus monosacáridos constituyentes, glucosa y galactosa, por acción de la enzima galactosidasa. El ácido acumulado puede ocasionar la precipitación de las caseínas y la formación de un **coagulo ácido**, que solidifican el medio y pueden aparecer de color rosa o blanco con una banda de color rosa en la parte superior, dependiendo del estado de óxido-reducción del Litmus. Los

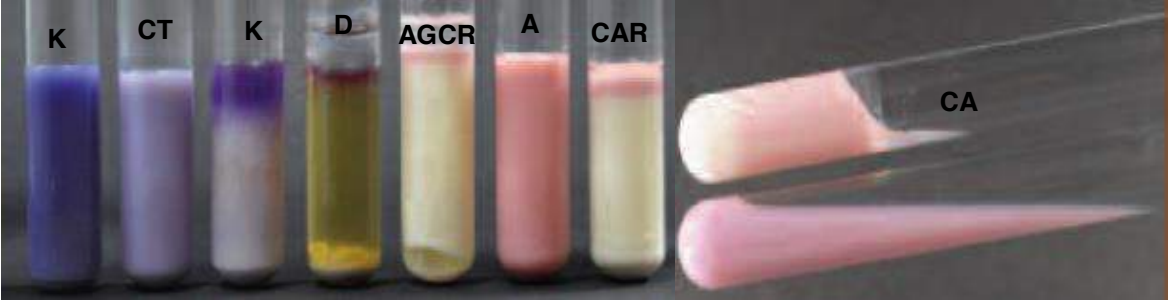
coágulos ácidos se pueden disolver en condiciones alcalinas. La visualización de grietas o fisuras en el coágulo, evidencian la **producción de gas**. La producción excesiva de gas rompe los coágulos, y produce el fenómeno denominado **fermentación tempestuosa**.

Además de ser un indicador de pH, el Litmus, es un indicador de potencial E_h (oxidación-reducción), en estado reducido es de color blanco mientras que oxidado es morado o púrpura. Si el Litmus se reduce durante la fermentación de la lactosa, el medio se volverá blanco en la parte inferior del tubo donde la tasa de reducción es mayor.

Algunas bacterias producen enzimas proteolíticas como la renina, pepsina o quimiotripsina que coagulan la caseína y producen una **cuajada**. Esta última se diferencia de un coágulo ácido en que no se disuelve en condiciones alcalinas y tiende a replegarse en los lados del tubo revelando un líquido de color paja denominado **suero**. Ciertas proteasas pueden digerir tanto coágulos ácidos como cuajadas, una **reacción de digestión** genera un líquido marrón claro por detrás. Las bacterias que sólo son capaces de digerir parcialmente la caseína, producen amoníaco (NH_3) que eleva el pH del medio y torna azul al Litmus. La formación de un anillo blanco o púrpura en la parte superior del fluido claro o tonalidad índigo en todo el medio indica una **reacción alcalina**. En la Tabla 3 se describen y visualizan los resultados a interpretar con la prueba de Litmus Milk.

La prueba se realizó inoculando los tubos de medio Litmus Milk con 20 μ L de un cultivo bacteriano con no más de 18 h de crecimiento. Una vez inoculados se sumergieron en un baño de agua a la temperatura a ensayar y se monitoreó el cambio registrado en cada uno de los tubos durante 5-7 días.

Tabla 3. Interpretación de resultados para la prueba en medio Litmus Milk. Imagen tomada de (Leboffe y Pierce, 2012)

RESULTADO	INTERPRETACIÓN	SÍMBOLO
		
Color rosa	Reacción ácida	A
Coloración rosa y sólida (blanco en la parte baja si el Litmus se ha reducido), coagulo no móvil.	Coagulación ácida	CA
Fisuras o grietas en coagulo	Producción de gas	G
Coagulo roto	Fermentación tempestuosa	S
Color blanco (en la porción inferior del medio)	Reducción del Litmus	R
Medio semisólido no rosa, presencia de un fluido claro a grisáceo en la parte superior	Cuajada	C
Clarificación del medio, pérdida de "cuerpo"	Digestión de peptonas, peptonización	D o P
Medio azulado o presencia de banda azul en la parte superior	Reacción alcalina	K
Sin cambios	Ninguna reacción anterior	NC

8.6.8 Movilidad en medio Sulfuro Indol Movilidad (SIM)

Se trata de un medio semisólido con una concentración de agar de 0.4% diseñado para detectar la motilidad bacteriana, la reducción de sulfuro y producción de indol. El medio está formulado con caseína y tejido animal como fuente de aminoácidos, además de tiosulfato de sodio como fuente de hierro y azufre. La producción de indol se evidencia por la presencia de triptófano (contenido en la caseína y proteína animal) Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa hidrolizan el triptófano en piruvato, amoniacó (por deaminación) e indol.

Por su parte la reducción de azufre a H_2S es una actividad anaeróbica y puede ser llevada a cabo por las bacterias en dos distintas formas dependiendo de las enzimas presentes: 1) La enzima cisteína desulfuronasa cataliza la putrefacción del aminoácido cisteína a piruvato. 2) La enzima tiosulfato reductasa cataliza la reducción del azufre (en forma de sulfato) al final de la cadena de transporte de electrones anaeróbica. Ambos sistemas producen el gas sulfuro de hidrógeno (H_2S).

Cuando se produce H_2S en el medio, se combina con el hierro (sulfato de amonio ferroso) y forma sulfuro férrico (FeS), un precipitado negro; por lo tanto cualquier ennegrecimiento del medio es indicativo de la reducción del azufre y una prueba positiva; mientras que la ausencia de oscurecimiento indica que la prueba es negativa. La motilidad en el medio SIM es detectable cuando se observa un crecimiento difuso que va desde el centro de la picadura. La hidrólisis de triptófano se detecta por la adición del reactivo de Kovac's (dimetilamino benzaldehído y HCl disuelto en alcohol amílico) después de un periodo de incubación, que forma una capa sobre el medio sólido que en presencia de indol genera un compuesto colorido rojo en ella. La formación de color rojo indica una reacción positiva y la presencia de triptofanasa, sino hay color rojo la prueba es negativa (Leboffe y Pierce, 2012).

La prueba fue realizada al inocular el medio por picadura directa con un cultivo de 18 h, se incubó a $35\pm 2^\circ C$ registrándose los cambios ocurridos durante 24-48 h y finalmente adicionando los reactivos para detectar la presencia de indol.

8.6.9 Reacción bilis esculina (Facklam y Moody, 1970).

El Agar Bilis Esculina es un medio no definido, selectivo y diferencial que contiene extracto de carne, digerido de gelatina, esculina, bilis de buey y citrato férrico. La esculina es extraída de la corteza del árbol de castaña de caballo, un glucósido conformado por glucosa y esculetina. El extracto de carne y la gelatina proveen la fuente de nutrientes y energía, mientras que la bilis brinda selectividad al medio y el citrato férrico es añadido como fuente de hierro oxidado e indicador de una prueba positiva. Muchas bacterias pueden hidrolizar la esculina bajo condiciones ácidas, mientras que otras demuestran su tolerancia ante la bilis.

En esta prueba, cuando las moléculas de esculina se separan, la esculetina reacciona con el Fe^{3+} del citrato y forma un precipitado marrón oscuro, que puede incluso oscurecer el medio alrededor del crecimiento. Un organismo que oscurece el medio aun ligeramente, es Bilis esculina positivo; en contraparte un organismo que no oscurece el medio, es negativo (Leboffe y Pierce, 2012).

Se inocularon los picos de flauta de tubos inclinados con Agar Bilis Esculina a partir de un cultivo de 18 h de las bacterias en estudio. Se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, registrando los cambios ocurridos en el medio a las 24 y 48 h.

8.6.10 Hidrólisis de arginina en medio MRS modificado

La producción de amónico como resultado de la hidrólisis de arginina se llevó a cabo en medio MRS modificado sin extracto de carne (Shaw y Harding, 1984, Schillinger y Lücke, 1987) conteniendo L-arginina al 0.3% p/v, y 0.2% de citrato de sodio (sustituye al citrato de amonio). Se usó una concentración de glucosa del 0.5% p/v. Se incubó a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y una vez transcurrido el tiempo se adicionaron unas gotas del reactivo de Nessler. El desarrollo de un color naranja o marrón indica la presencia de amonio y por lo tanto la hidrólisis de la arginina.

Se inocularon tubos con caldo MRS modificado (según la descripción anterior) con un cultivo de 18 h de las bacterias en estudio, se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24-48 h y se reveló la prueba agregando el reactivo de Nessler.

8.6.11 Fermentación de carbohidratos en caldo rojo de fenol y MRS modificado

La fermentación de carbohidratos es el proceso metabólico por el cual una molécula orgánica actúa como donador de electrones y uno o más de sus productos orgánicos actúa como el aceptor final de electrones. La fermentación de la glucosa inicia con la producción de piruvato, aunque otros organismos emplean vías alternas, la mayoría de las bacterias consiguen este proceso mediante la glucólisis. Los productos finales de la fermentación del piruvato incluyen una variedad de ácidos, alcoholes, gases como el H₂ o CO₂; los cuales dependen específicamente del organismo y el sustrato a fermentar.

El caldo Rojo de fenol, está conformado por una peptona y un indicador de pH, rojo de fenol, el cual es de color amarillo por debajo de un pH de 6.8, rosa por encima de pH 7.4 y rojo entre estos valores. Cualquier carbohidrato puede ser empleado para las pruebas de fermentación colocándose tubos invertidos de Durham como indicador de la producción de gas. La producción de ácido como consecuencia de la fermentación de los carbohidratos, disminuye el pH por debajo del intervalo neutro del indicador, tornando a amarillo el medio. La desaminación de los aminoácidos de la peptona, producen amoníaco (NH₃), que elevan el pH del medio y lo tornan de un color rosado. La producción de gas se visualiza por la presencia de una burbuja dentro del tubo de Durham, donde ha sido desplazado el medio.

El caldo MRS puede ser empleado para las pruebas de fermentación de carbohidratos (Sharpe *et al.*, 1979) excluyendo el extracto de carne y la glucosa del medio original. Se adiciona 0.05% de rojo de fenol como indicador de pH. Los carbohidratos a analizar se esterilizan por filtración y se adicionan a una concentración del 2.0% p/v. Se incuban a temperatura óptima hasta por 48 horas (Sanchez *et al.*, 2000). Estas condiciones han sido sugeridas debido a los requerimientos nutricionales de las BAL, manteniendo la composición básica del medio tradicionalmente empleado para su estudio.

Para ambas variantes de pruebas de fermentación de carbohidratos, los azúcares a ensayar (xilosa, galactosa, lactosa, fructosa y manitol) se esterizaron mediante filtración de 0.22 µm, siendo incorporados en el medio MRS base modificado a una concentración final del 2.0%. Los tubos fueron inoculados con un cultivo de 18 h e incubados a 35±2°C durante 5-7 días, registrándose los cambios producidos.

8.7 Pruebas de fermentación API

Una caracterización más profunda de las bacterias en estudio se realizó mediante el sistema API 50 CH (API System, bioMérieux). Las células usadas como inóculo se prepararon siguiendo las indicaciones del proveedor. En un tubo conteniendo solución salina isotónica se inóculó el cultivo bacteriano de 18 h, gota a gota hasta alcanzar una turbidez equivalente al tubo 2 de la escala de McFarland. Posteriormente, en una ampolla con el medio API 50 CHL se inóculó el doble de gotas requeridas para alcanzar la turbidez antes mencionada. Este último se homogenizó con el vórtex, y se tomaron aproximadamente 200 μ l con los cuales se inóculó cada pozo de la galería API 50. Finalmente, se agregaron 5 gotas de aceite mineral estéril para extraer el aire remanente en la galería y crear un sistema de anaerobiosis. Todo este proceso se llevó en condiciones de esterilidad para no crear falsos positivos. Los resultados fueron registrados después de 24 y 48 h, realizando la identificación con ayuda del programa APILAB PLUS (bioMérieux).

8.8 Obtención de DNA cromosomal

Se tomó 1 ml del cultivo a la mitad de la fase exponencial. Se centrifugó durante 2 minutos a 16,000 g se lavó con buffer de fosfato 100 mM pH 7.6 de 2 a 3 veces y centrifugó durante 2 minutos. El pellet se resuspendió en buffer de fosfatos pH 7.6. A estas células se le realizó la extracción de DNA por medio del kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit de SIGMA-ALDRICH, siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. El material genético obtenido se cuantificó en Nanodrop Thermo Scientific en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular, UAM-I

8.9 Conservación de la cepa bacteriana

La cepa pura se conservó de 2 formas diferentes:

Agar inclinado. Se prepararon tubos con 3 ml de agar inclinado, en los cuales se inóculó la cepa bacteriana pura, se dejó crecer durante 18 horas y se guardó en refrigeración a 8°C.

Glicerol: a un tubo de crioconservación se le agregaron 500 μ l de cultivo bacteriano de 18 horas de crecimiento y 500 μ l de glicerol. Los cuales se guardaron a 2 temperaturas diferentes: a 0°C y -85°C

8.10 Selección de genes candidatos para el estudio.

Los genes candidatos para este estudio de MLSA fueron seleccionados tomando en consideración los siguientes parámetros:

- Número de secuencias por locus almacenados en la base de datos GenBank (Figura 1A), ya que es importante contar con un buen número de secuencias almacenadas en la base de datos para realizar la comparación con las bacterias problema. Se seleccionaron todos aquellos genes que tuvieran más de 50 secuencias de referencia.
- Número de especies por locus en la base de datos GenBank (Figura 1B). Este dato es muy importante para la realización del estudio ya que entre mayor sea el número de especies se puede realizar una comparación más completa dentro del género de *Lactobacillus*.

Es importante cumplir estos parámetros, ya que si se escogen genes que tienen muchas secuencias pero pertenecen a pocas especies el análisis multilocus no será completo.

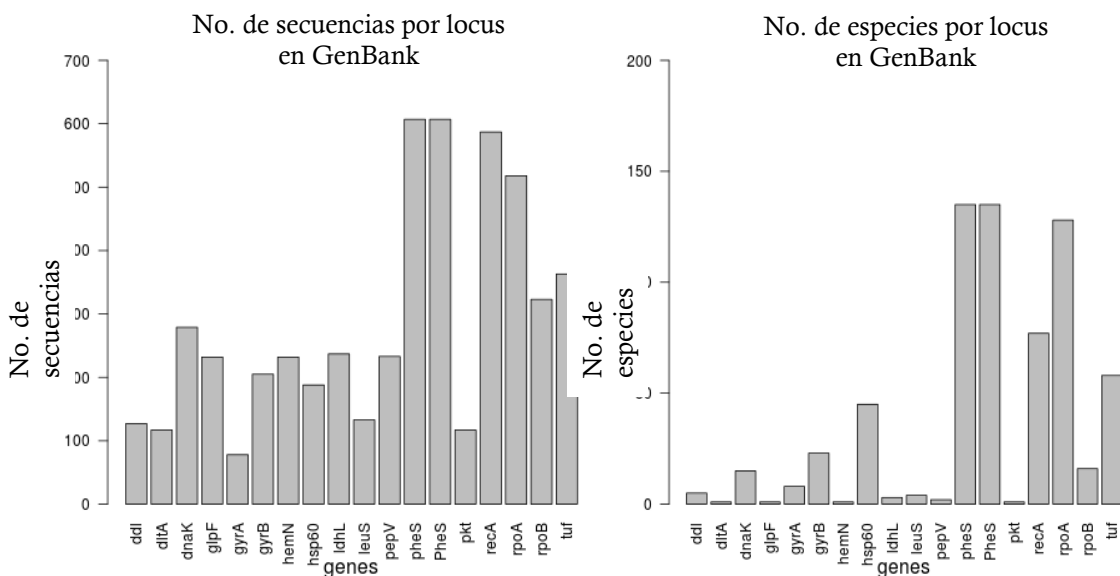


Figura 1. La Fig. 1A muestra los marcadores más usados en la identificación de especies de *Lactobacillus*. La Fig. 1B el número de especies secuenciadas con cada gen

Con los datos anteriores se determinó que los mejores genes para realizar este estudio sean: *pheS*, *tuf*, *recA*, *rpoA*, *Hsp60* y *gyrB*.

En la figura 2A se muestra la distribución de los genes escogidos para este estudio, el modelo tomado es el de *Lactobacillus brevis* ATCC 14869, en la figura 2B se muestra la variación de tamaños entre las secuencias para cada gen depositadas en GenBank.

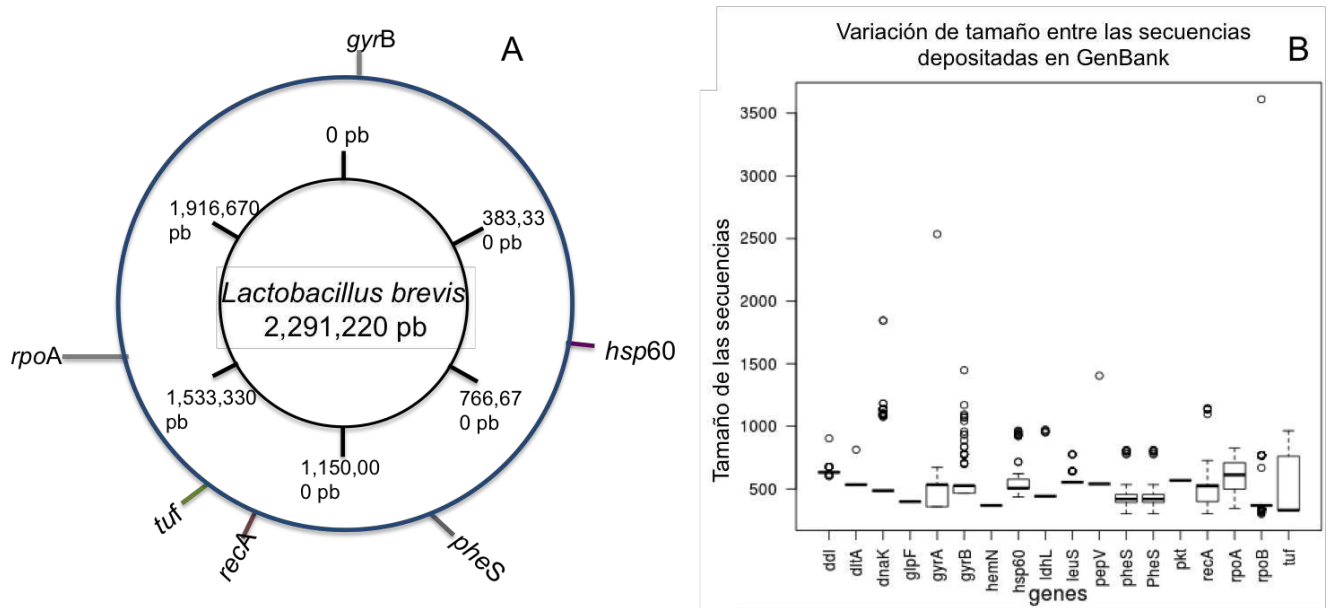


Figura 2. Distribución de los genes seleccionados a lo largo de un genoma de *Lactobacillus brevis* ATCC14869 almacenado en GenBank (A). Variación de los tamaños de las secuencias almacenadas en la base de datos de GenBank (B).

Los datos para la selección de los genes por el número de secuencias por locus, número de especies por locus y tamaño de las secuencias almacenadas en GenBank se obtuvieron utilizando la base de datos EntrezNt de NCBI-GenBank con ayuda de un programa de análisis elaborado por el Dr. P. Vinuesa (Comunicación personal).

8.11 Análisis *in silico* de los genomas de lactobacilos reportados

La información de las secuencias 16S rRNA fue descargada desde la base de datos de referencia <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq> (Pruitt *et al.*, 2002), en total se descargaron 342 referencias, de las cuales fueron seleccionadas las pertenecientes a cepas de referencia y las totalmente curadas, de manera que al final sólo se utilizaron 158 referencias. Las secuencias de los genes constitutivos de los lactobacilos se descargaron desde (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (Benson *et al.*, 2013).

Para los genes constitutivos seleccionados:

- *tuF*, se descargaron 715 referencias. Después de seleccionar las secuencias de referencia tipo, y eliminar las secuencias de genomas completos quedaron 57 referencias.
- *Hsp60*, se descargaron 277 referencias. Después de seleccionar las secuencias de referencia tipo, y eliminar las secuencias de genomas completos quedaron 50 referencias.
- *pheS*, se descargaron 1092 referencias. Después de seleccionar las secuencias de referencia tipo, y eliminar las secuencias de genomas completos quedaron 87 referencias.
- *gyrB*, se descargaron 48 referencias (solamente de *L. plantarum* y *L. brevis*). Después de seleccionar las secuencias de referencia tipo, y eliminar las secuencias de genomas completos quedaron 10 referencias.

8.12 Depuración de archivos fasta y alineamiento múltiple

Las secuencias de los genes se descargaron en formato Fasta, dentro de dichos archivos se eliminó la información redundante, dejando únicamente la descripción del gen, la especie perteneciente y la secuencia de nucleótidos. Se realizó un alineamiento múltiple con el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Fredslund *et al.*, 2005, Sievers *et al.*, 2011)

8.13 Amplificación de secuencias por PCR

Se estandarizó el proceso de amplificación siguiendo las instrucciones del fabricante para la polimerasa PCR Master Mix (Promega), cuya composición es la siguiente en 25 μ l de reacción: *Taq* polimerasa 1.25U, 400 μ M dNTP's; 3mM MgCl₂ (para el gen *rpoA* se ocuparon 4 mM de Mg⁺²). Además se realizaron gradientes de temperatura (para el gen *rpoA* de 40-46°C; gen *pheS* de 42-49°C; gen *tuF* de 51-57°C, gen *Hsp60* de 32-38°C; gen *gyrB* de 52-56°C; *recA* de 50-60°C) y de concentración de magnesio (únicamente en los genes *recA* y *rpoA* en un rango de 3.0, 3.25, 3.50, 3.75 y 4.0 mM de Mg⁺²) (Tabla 4) que permitieran obtener la correcta amplificación de los genes seleccionados. Para todas las reacciones de PCR se emplearon 10 ng de ADN molde y 1 μ mol de cada primer.

Tabla 4. Condiciones de PCR probadas para la obtención del amplicón de los genes seleccionados.

Cebador	Gradiente de temperatura de alineamiento (°C)	Gradiente de concentración de MgCl ₂ (mM)	Tamaño del amplicón esperado (pb)
<i>rpoA</i>	40-46	3-4 incremento de 0.25	530
<i>pheS</i>	42-49	3	450
<i>tuF</i>	51-57	3	800
<i>Hsp60</i>	32-38	3	600
<i>GyrB</i>	52-56	3	250
<i>recA</i>	50-60	3-4 incremento de 0.25	350
16S rRNA	52	3	1540

8.14 Electroforesis de los amplicones obtenidos

Los amplificadores resultantes se corrieron en geles de agarosa, para el amplicón del 16S rRNA la concentración fue del 1% y para los demás genes constitutivos al 2%. Para este procedimiento se utilizó buffer TBE 1x de Thermo Scientific (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3) a un voltaje constante de 90 mV.

8.15 Purificación de los amplicones obtenidos

Los amplicones obtenidos por PCR fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo las instrucciones del fabricante, se enviaron al laboratorio Divisional de Biología Molecular para su secuenciación.

8.16 Análisis de los datos obtenidos y construcción del árbol filogenético

Los amplicones fueron secuenciados en un sistema automatizado de secuenciación de ADN. Los datos obtenidos se añadieron junto con los datos de referencia para realizar el alineamiento múltiple nuevamente en el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Para el análisis de comparación entre las diferentes especies y para la generación de los árboles filogenéticos tanto de genes individuales como el análisis concatenado se utilizó el programa PhyML con la interface SeaView (Gouy *et al.*, 2010). Finalmente, el árbol se construyó comparando las secuencias descargadas y las secuencias de los

amplicones obtenidas, posteriormente se analizaron los procesos evolutivos generados en las diversas especies reportadas.

8.17 Bacterias estudiadas

Con el fin de comparar especies diferentes dentro del género *Lactobacillus* fueron empleadas 6 bacterias, cuyas características y procedencia se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Bacterias Lácticas utilizadas como control para el diseño del análisis Multilocus de secuencias para el género *Lactobacillus*

Numero de bacteria en este estudio	Nombre de adquisición	Lugar de adquisición	¿De dónde se aisló?
Cepa 1	<i>Lactobacillus plantarum</i> CDBB-1115	CINVESTAV	Cepa referencia
Cepa 2	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	Facultad de Química UNAM	Cepa referencia
Cepa 3	<i>Lactobacillus plantarum</i> -1	UAM-I	Producción de queso
Cepa 4	<i>Lactobacillus casei</i>	Facultad de Química UNAM	Bebidas fermentadas
Cepa 5	<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i>	Facultad de Química UNAM	Bebidas fermentadas
Cepa 6	<i>Lactobacillus plantarum</i> -2	UAM-I	Producción de queso
Cepa 7	spb2	UAM-I	Desechos de camarón

9 RESULTADOS

9.1 Preparación de medios y crecimiento de las cepas

Los medios preparados presentaron un color amarillo claro. El medio M17 mostró una tonalidad un poco más oscura con respecto al medio MRS. Como control de esterilidad 1 tubo con medio líquido y 1 caja con agar recién preparados, fueron incubados a 37°C durante 48 horas, no registrando crecimiento bacteriano después de dicho período de incubación. El medio MRS favoreció la propagación con mayor rapidez de los lactobacilos objeto de este estudio, evidenciándose crecimiento después de las 6 horas de su inoculación, mientras que en el medio M17 se necesitaban de 12 a 14 horas para observar indicios de crecimiento.

9.2 Tinción de Gram y aislamiento de la cepa

En la Fig. 3A, es posible apreciar la presencia de dos morfologías distintas, cocoides y bacilares, las cuales provienen de la caja problema del lactobacilo aislado a partir de desechos de camarón; siendo indicativo de una contaminación o impureza en la cepa, por lo cual fue necesario realizar un nuevo aislamiento. Después de llevar a cabo el aislamiento de la bacteria spB2, una nueva imagen de microscopia mediante tinción de Gram, muestra la presencia de células Gram positivas con morfología bacilar alargada (Fig. 3B).

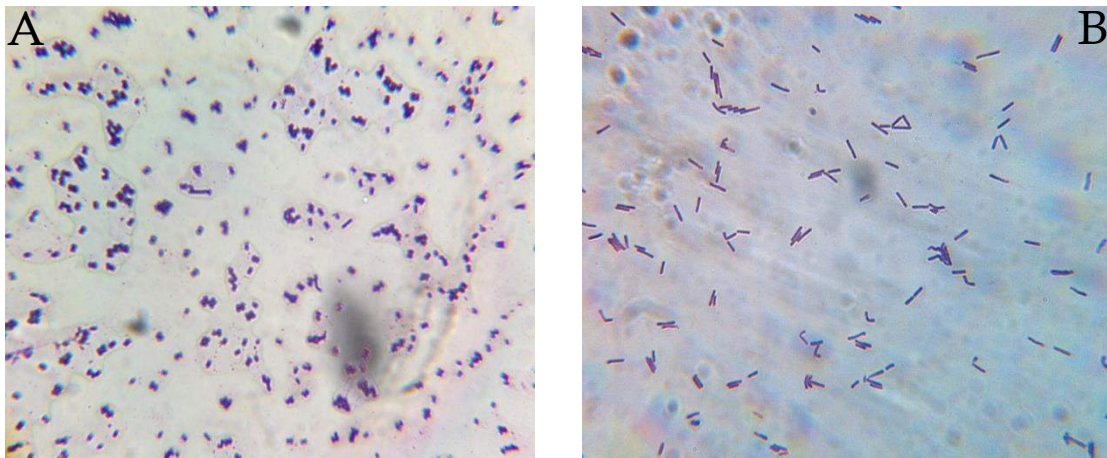


Figura 3. Tinción de Gram realizada a la cepa spB2: A) Proveniente de desechos de camarón, B) Lactobacilos aislados

9.3 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento y variación del pH en el medio durante el crecimiento del lactobacilo aislado se muestra en la Fig. 4. El lactobacilo presenta una fase exponencial entre la 5ª y 14ª hora; la fase estacionaria se observa a partir de la 23ª h, alcanzando una densidad óptica máxima de 3.84. El pH inicial de 6.8 en el medio de cultivo, comienza a disminuir conforme se intensifica la producción de ácido láctico que baja el pH del medio como resultado del crecimiento bacteriano; obteniéndose un pH mínimo de 4.5.

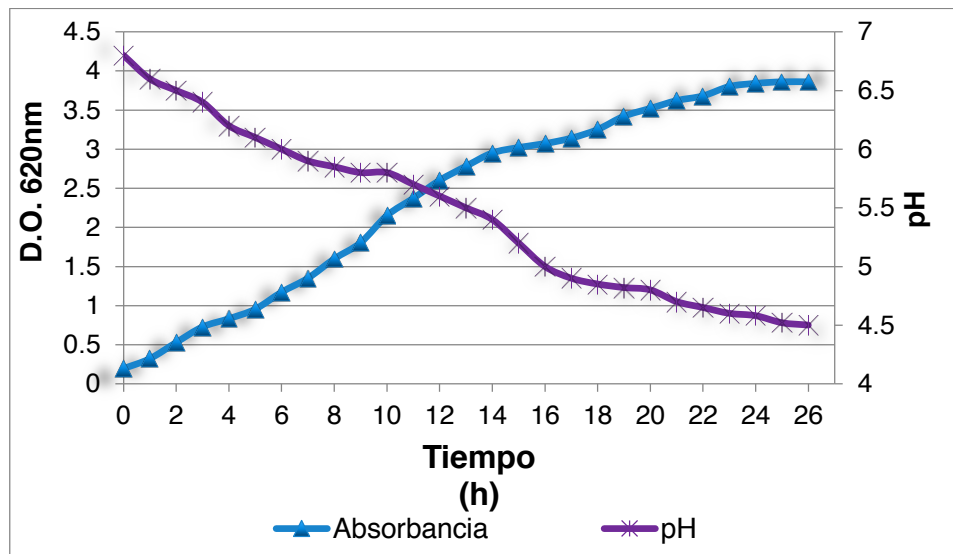


Figura 4 . Curva de crecimiento y disminución de pH en medio MRS durante el monitoreo en el crecimiento de *Lactobacillus* spB2.

9.4 Pruebas bioquímicas

9.4.1 Oxidasa

La prueba resultó negativa tanto para la bacteria spB2 como para la cepa referencia, ya que ninguno reaccionó ante la presencia del reactivo impregnado en los discos prueba, es decir no se registró una coloración azul intensa (Fig. 5).

9.4.2 Catalasa

El resultado de la prueba fue negativa para ambas cepas analizadas, no se detectó la producción de burbujas en los cultivos puros de ambas bacterias en presencia de peróxido de hidrógeno al 3%.



Figura 5. Prueba de Oxidasa, negativa para bacteria spB2 (izquierda) y cepa referencia *L. plantarum* (derecha).

9.4.3 Crecimiento en medio MRS a 20°C y 45°C durante 24 hrs.

La Fig. 6 muestra que a una temperatura de 20°C se registró crecimiento abundante en la cepa en estudio y la de referencia, *L. plantarum* (izquierda); mientras que un incremento de la temperatura a 45°C no permitió el crecimiento de ninguna de las dos cepas ensayadas.

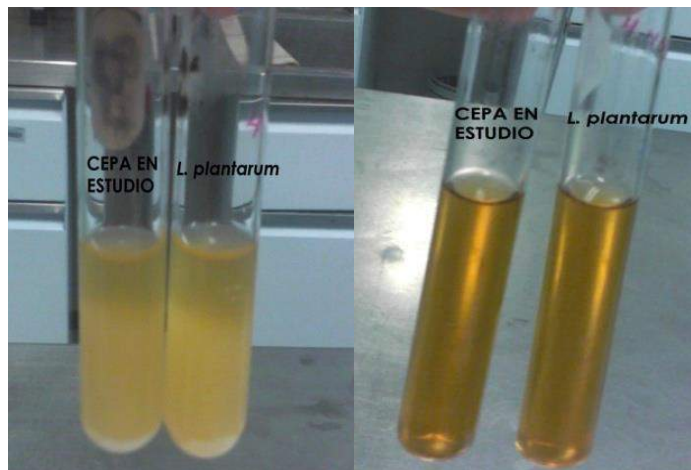


Figura 6 . Crecimiento en Medio MRS a 20 °C (izquierda, abundante) y 45°C (derecha, sin desarrollo) por parte de la cepa en estudio spB2 y el lactobacilo referencia, *L. plantarum*.

9.4.4 Producción de gas en medio MRS con campana de Durham a 35±2.0°C y 45 °C durante 24 h

Se detectó crecimiento abundante para ambas cepas ensayadas a una temperatura de 35°C, en ninguno de los dos casos se registró la presencia de burbujas de gas en el interior de los tubos invertidos de Durham, por lo que se descarta el carácter

heterofermentativo en ambas cepas. No se registró crecimiento a 45°C por parte de las bacterias ensayadas, ni la presencia de gas en ambos casos.

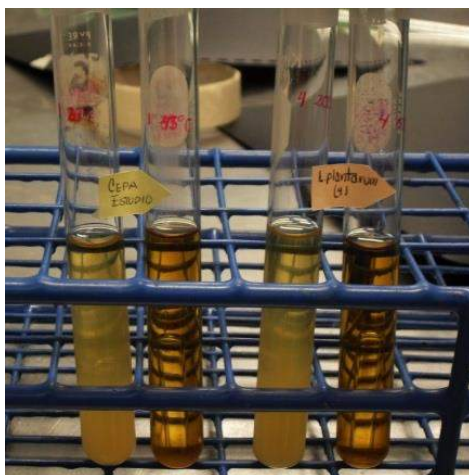


Figura 7. Evaluación de la producción de gas a partir de glucosa a 35° y 45°C por las bacterias spB2 (izquierda) y *L. plantarum* (derecha)

9.4.5 Crecimiento en medio MRS en presencia de 6.5% de NaCl a $35 \pm 2.0^\circ\text{C}$

Se registró crecimiento muy abundante en ambas bacterias a las 24 h de incubación, que se evidenció por la gran cantidad de células depositadas de color blanquecino en el fondo de los (Fig. 8). Lo anterior, indica que tanto la bacteria spB2 como la referencia presentan una habilidad para tolerar esta concentración salina en el medio.



Figura 8. Crecimiento en presencia de 6.5% de NaCl, bacteria spB2 (izquierda); cepa referencia *L. plantarum* (derecha)

9.4.6 Crecimiento en condiciones de anaerobiosis

Se presentó crecimiento abundante después de las 24 h de incubación en ambas cepas ensayadas, y se evidenció la formación de un precipitado blanquecino en el fondo de los tubos.

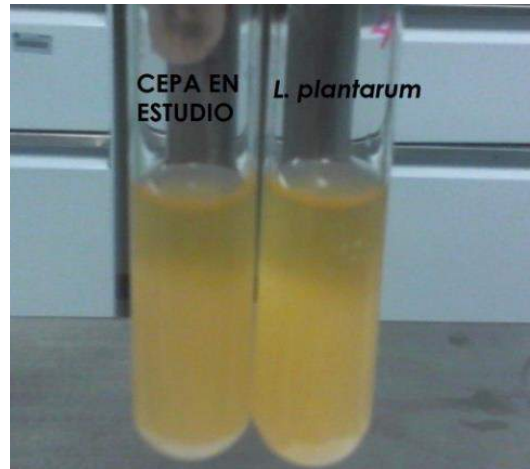


Figura 9. Crecimiento celular en condiciones de anaerobiosis cepa spB2 (izquierda) cepa referencia (derecha).

9.4.7 Capacidad de acidificación y coagulación en medio Litmus Milk a 20° y 37°C durante 5 días.

Día 1 (20°C): se observa un cambio en la coloración del medio respecto al tubo control (sin inocular) virando de morado a blanco, lo que indica la reducción del Litmus como resultado del crecimiento microbiano. No hay coagulación ácida, ni producción de ácido (Fig. 10, izquierda)

Día 2-Día 5 (20°C): Persiste la coloración blanca en la parte inferior de los tubos, la parte superior adquirió una tonalidad rosada, indicando una ligera acidez del medio. No se presentó coagulación del medio, ni mayor cambio durante el tiempo de incubación para ninguna de las bacterias ensayadas (Fig. 10, derecha).

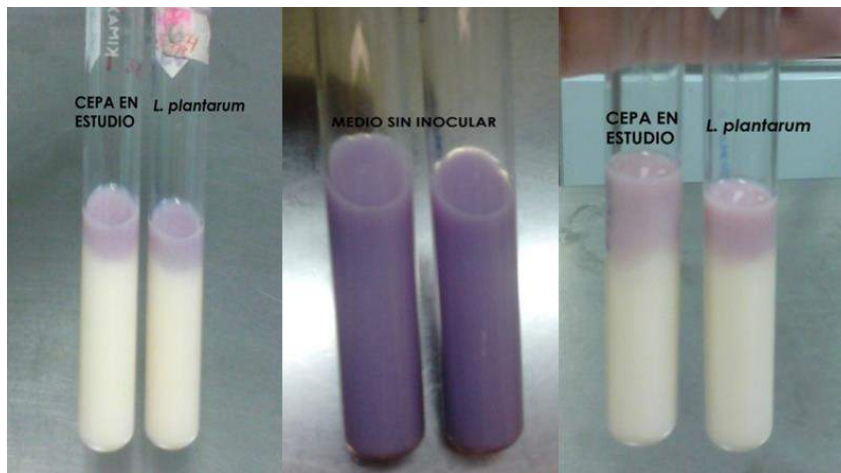


Figura 10. Resultados en medio Litmus Milk durante 1 día de incubación (izquierda) y durante 2-5 días (derecha) para las cepas spB2 y *L. plantarum*. La parte central, es el control del medio sin inocular.

Día 1 (37°C): Para ambas cepas se observó un cambio en la coloración del medio respecto al tubo control (sin inocular) virando de morado a blanco, lo que indica que se ha llevado la reducción del indicador Litmus. Se evidenció la formación de un coagulo en el fondo de ambos tubos, mientras que el resto del contenido continuo líquido. La bacteria en estudio mostró una coloración violeta traslucida en la parte superior; mientras que *L. plantarum* una ligera tonalidad rosada (Fig. 11 izquierda).

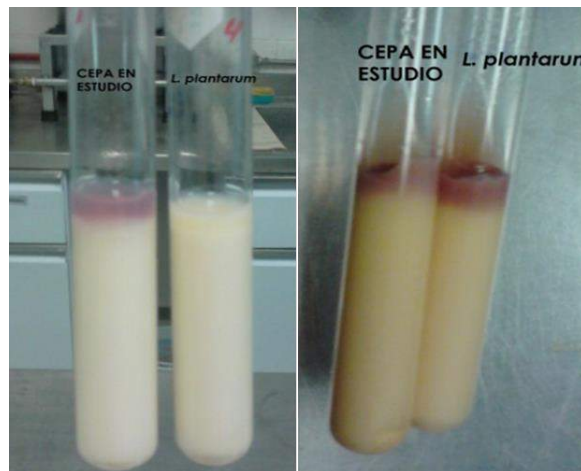


Figura 11. Resultados medio Litmus Milk durante 1 día (Izquierda) y durante 2-5 días (derecha) a 45°C para las cepas spB2 y *L. plantarum*.

Día 2 (45°C): Ambas cepas presentaron la formación de un coagulo o cuajada en el fondo del tubo. En la parte superior de cada tubo se presentó una coloración violeta traslucida en estado líquido que se puede separar del resto del medio al inclinarlo ligeramente.

Día 3-5 (45°C): La cuajada persistió, presentando de un coagulo muy firme que con el paso del tiempo adquirió una coloración ligeramente café, sin embargo, la parte superior continuo siendo líquida (Fig. 11, derecha).

9.4.8 Movilidad en medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad) 24-48 h a 35±2.0°C

Con este medio fue posible evaluar tres características de las bacterias spB2 y *L. plantarum*. (Fig. 12).

- a) Prueba de Movilidad negativa: el crecimiento bacteriano se registró únicamente en la zona donde se efectuó la punción del medio.
- b) Producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) negativa: durante el tiempo de incubación de la prueba (24 h o 48 h), no se detectó la presencia de una coloración negra en la zona de inoculación que indicara la formación de este compuesto.

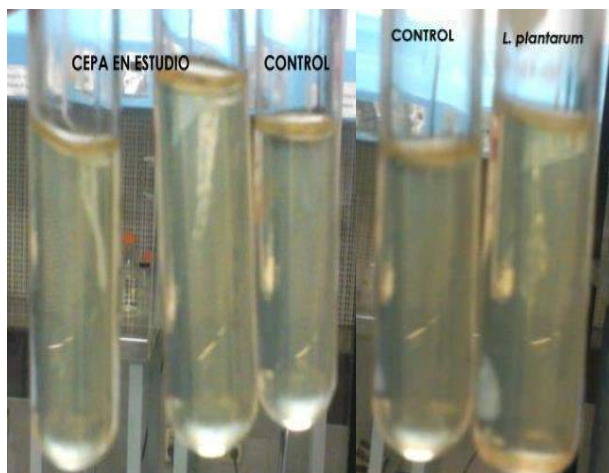


Figura 12. Resultados de la prueba en medio SIM para la bacteria spB2 (izquierda); parte central medio sin inocular; bacteria referencia *L. plantarum* (derecha).

- c) Producción de Indol negativo: después de registrar los resultados de las dos pruebas previas, se adicionaron los reactivos para revelar la posible presencia de Indol en los medios inoculados con cada bacteria. Una vez adicionados, se observó la ausencia del anillo rojizo en la parte superior del tubo, por lo que se descartó la presencia de la enzima triptofanasa.

9.4.9 Reacción Bilis Esculina en Agar Bilis Esculina 35±2.0°C durante 2 días

Dentro de las primeras 24 h de incubación, se apreció una reacción positiva para la hidrólisis de la esculina que se evidencia por la aparición de una coloración negra en el pico de flauta y en aproximadamente la mitad del tubo (Fig. 13 A).

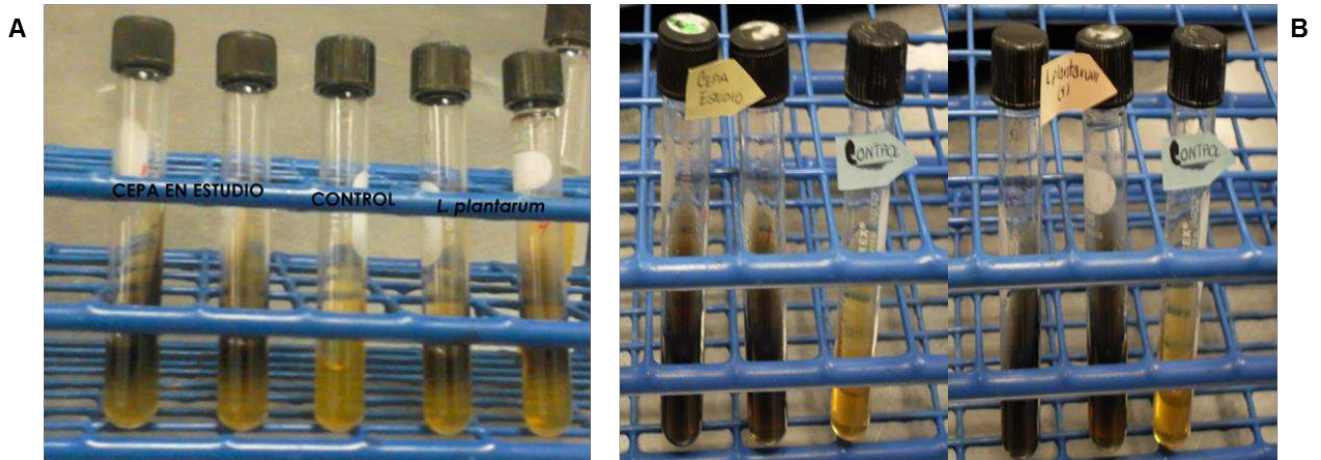


Figura 13. Reacción Bilis Esculina. (A) Después de 24 h de incubación: bacteria spB2 (izquierda); medio Control (centro); bacteria referencia (derecha). (B) Reacción a las 48 h bacteria spB2 (izquierda); bacteria referencia (derecha)

Transcurridas 48 h de incubación, la coloración negra se apreció en todo el tubo, lo que mostró la capacidad de ambas cepas para crecer en presencia de sales biliares e hidrolizar la esculina (Fig. 13 B).

9.4.10 Hidrólisis de Arginina en Medio MRS modificado

Se obtuvo crecimiento abundante a las 24 h de incubación para ambas bacterias. Una vez adicionado el reactivo de Nessler no se registró cambio alguno (Figura 14).

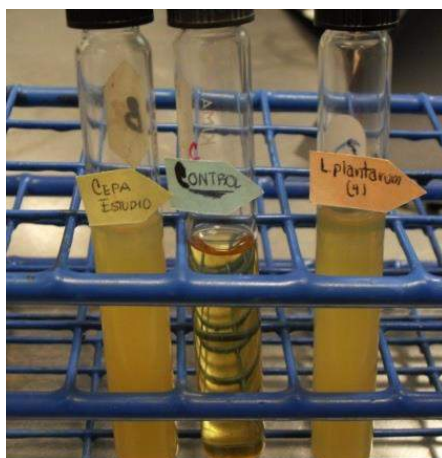


Figura 14. Hidrólisis de Arginina en medio MRS modificado cepa spB2 (izquierda), *L. plantarum* (derecha)

9.4.11 Fermentación de Carbohidratos en medio MRS modificado

Desde las 24 y hasta las 48 h de incubación, el crecimiento de ambas cepas con los diferentes carbohidratos se evidenció por la turbidez y la presencia de un precipitado blanco en el fondo, con respecto al tubo control (Figura 15).

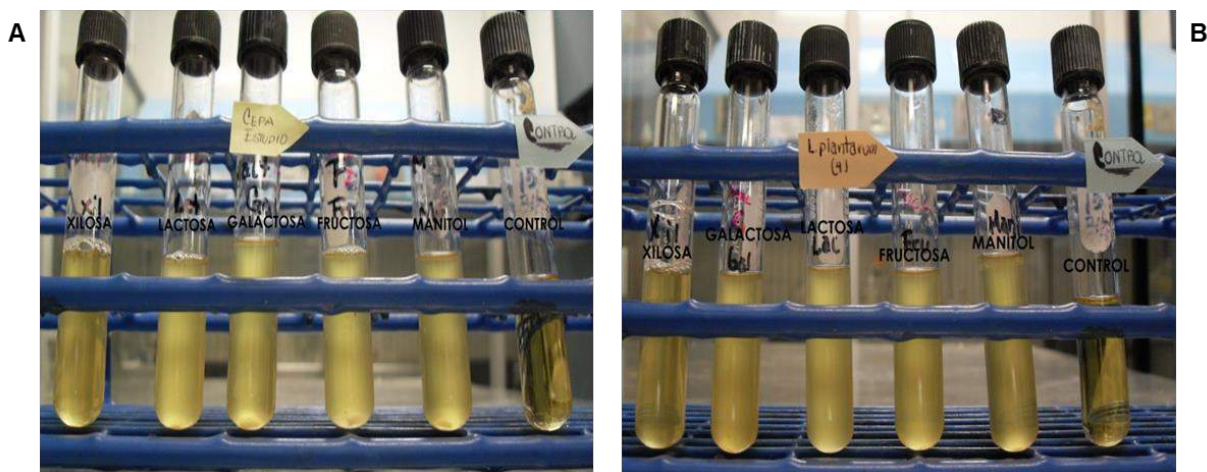


Figura 15. Fermentación de carbohidratos en medio MRS modificado. Carbohidratos ensayados de izquierda a derecha: xilosa, lactosa, galactosa, fructosa, manitol. (A) Patrón de fermentación bacteria spB2; (B) Patrón de fermentación bacteria *L. plantarum*.

El medio suplementado con xilosa como fuente de carbono, mostro la menor turbidez con respecto a los carbohidratos fermentados para ambas bacterias ensayadas. Asimismo, se observó mayor turbidez en aquellos tubos donde el crecimiento bacteriano fue más abundante, lo que podría deberse a la presencia del indicador de pH rojo de fenol, que en medio ácido se torna amarillo.

9.4.12 Fermentación de carbohidratos en medio base Caldo Rojo de Fenol

Para la cepa en estudio, después de 24 h de incubación no se presentó turbidez evidente en los tubos que contenían los carbohidratos ensayados; sin embargo los medios suplementados con lactosa, fructosa y galactosa presentaron una coloración naranja respecto al rojo del tubo control (sin inocular), lo que indica un crecimiento lento de la cepa spB2 bajo estas condiciones posiblemente debido a la ausencia de los nutrientes que tiene el medio base MRS (Fig. 16).



Figura 16. Patrón de fermentación de carbohidratos en medio base caldo rojo de fenol después de 24 h por parte de la bacteria spB2. Carbohidratos ensayados: xilosa, lactosa, manitol, fructosa, galactosa, tubo control (de izquierda a derecha).

A partir de las 48 h y hasta las 72 h de incubación, se pudo observar crecimiento de la cepa spB2 en los medios suplementados con manitol y fructosa principalmente, en los que se presentó un viraje en el color debido a la acidificación como resultado del crecimiento bacteriano.

El medio con galactosa, presentó una coloración amarilla turbia, mientras que el medio suplementado con lactosa registró una coloración anaranjada ligeramente turbia, que podría interpretarse como una asimilación parcial de estas fuentes de carbono por parte de la cepa en estudio. Finalmente el medio suplementado con xilosa, permaneció con la tonalidad naranja y ausencia de turbidez durante las primeras 72 h de incubación, lo que indica que no es una fuente de carbono que permita el crecimiento de la cepa en estudio (Fig. 17).



Figura 17. Patrón de fermentación de carbohidratos en medio base caldo rojo de fenol después de 48-72 h por parte de la bacteria spB2. Carbohidratos ensayados: xilosa, lactosa, manitol, fructosa, galactosa, tubo control (de izquierda a derecha).

En el caso de la bacteria referencia, el medio suplementado con fructosa presentó una coloración naranja más clara respecto a los tubos suplementados con lactosa y galactosa, indicando una posible asimilación de estos carbohidratos por parte de *L. plantarum*. Por su parte, los medios con xilosa y manitol presentaron una coloración muy similar a la del tubo control (sin inocular) (Fig. 18).

A partir de las 48 h y hasta las 72 h de incubación, se pudo observar el crecimiento de *L. plantarum* en los medios con galactosa y fructosa principalmente, donde se registró un vire en el indicador de pH a un color amarillo, indicando la acidificación del medio como resultado del crecimiento bacteriano. El medio con lactosa, presentó una coloración naranja turbia.

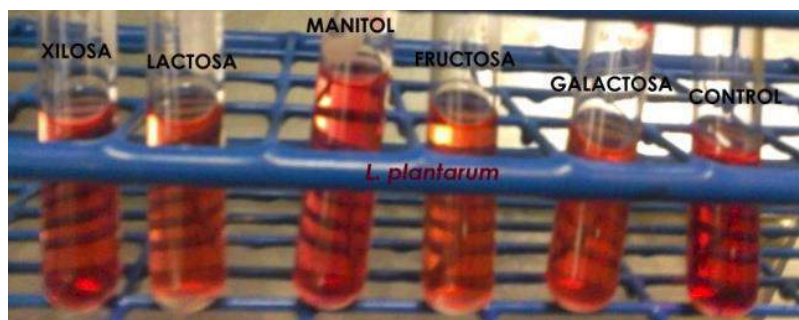


Figura 18. Patrón de fermentación en carbohidratos en medio base caldo rojo de fenol después de 24 h por parte de la bacteria referencia Carbohidratos ensayados: xilosa, lactosa, manitol, fructosa, galactosa, tubo control.

De manera similar, el medio suplementado con manitol como fuente de carbono, registró una coloración naranjada pero sin turbidez, lo cual se podría interpretar como un crecimiento lento en esta fuente de carbono con una acidificación lenta como para registrarse un vire en el indicador de pH. El medio suplementado con xilosa, mostró una tonalidad rosada, evidenciado una alcalinización del medio por lo cual no resulta ser una fuente de carbono que permita el crecimiento de *L. plantarum* (Fig. 19).



Figura 19. Patrón de fermentación en carbohidratos en medio base caldo rojo de fenol después de 48-72h por parte de la bacteria referencia. Carbohidratos ensayados: xilosa, lactosa, manitol, fructosa, galactosa, tubo control

9.5 Pruebas API

Las pruebas API positivas se detectaron por un vire en el color del indicador de pH púrpura de bromocresol. Los carbohidratos que fue capaz de fermentar el lactobacilo en estudio fueron: L-Arabinosa, D-Ribosa, D-Xilosa, D-Galactosa, D-Glucosa, D-Fructosa, D-Manosa, D-Manitol, Metil- α -D-Glucopiranosida, N-AcetilGlucosamina, Esculina, D-Celobiosa, D-Maltosa, D-Melibiosa, Gluconato Potásico, 5-CetoGluconato Potásico. Al acceder al programa API web, para ingresar los datos de los carbohidratos fermentados, se obtuvo como resultado que el lactobacilo desconocido corresponde a *Lactobacillus brevis* con un 96.6% de confiabilidad.

9.6 Obtención del ADN cromosomal.

El mejor método para la obtención del ADN fue por el kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit, con el cual obtuvimos valores mayores que por el método tradicional de fenol-cloroformo, en la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos con el kit (Tabla 6):

Tabla 6. Cuantificación de ADN obtenido con el kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit mediante Nanodrop

Cepa	Concentración (ng/ μ l)	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	23.6	0.473	0.268	1.76
2	24.9	0.498	0.291	1.71
3	22.3	0.445	0.266	1.68
4	23.7	0.473	0.282	1.68
5	16	0.320	0.172	1.86
6	45.5	0.909	0.552	1.65
7	49.5	0.989	0.567	1.74

9.7 Análisis *in silico* de los genomas reportados de *Lactobacillus*

Con la ayuda del estudio de genes de lactobacilos antes realizado se pudieron escoger cebadores degenerados universales para el género *Lactobacillus*, los cuales se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Cebadores degenerados seleccionados para llevar a cabo la amplificación de los genes seleccionados.

Gen	Cebadores	Región	Bibliografía
RNA polimerasa subunidad alfa (<i>rpoA</i>)	FWD 5'-ATGATYGARTTTGAAAAACC-3'	1,633,390-1,634,340	(Naser <i>et al.</i> , 2007)
	REV 5'-ACYTTVATCATNTCWGVYTC-3'		
Fenilalanil-tRNA sintetasa subunidad Alfa (<i>pheS</i>)	FWD 5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3'	1,027,724-1,028,770	(Naser <i>et al.</i> , 2007)
	REV 5'-CCWARVCCRAARGCAAARCC-3'		
	REV 5'-GGRTGRACCATVCCNGCHCC-3'		
Factor de elongación tu (<i>tuF</i>)	FWD 5'-AAYATGATIACIGGIGCIGCICARATGGA-3'	1,357,914-1,359,104	(Chavagnat <i>et al.</i> , 2002)
	REV 5'-AYRTTITCICCIGGCATIACCAT-3'		
Proteínas de choque térmico de 60 kDa (<i>Hsp60</i>)	FWD 5'-GAATTCGAIIIIIGCIGGIGAYGGIACIACIAC-3'	645,454-647,079	(Blaiotta <i>et al.</i> , 2008)
	REV 5'-CGCGGGATCCYKIYKITCICCRAAICCIGGIGCYTT-3'		
Recombinación homóloga de ADN (<i>recA</i>)	FWD 5'-TTYATHGAYGCNGARCAYGC-3'	1,210,628-1,211,761	(Torriani <i>et al.</i> , 2001)
	REV 5'-CCWCCWGKWGTHGTYTCNGG-3'		
Girasa B (<i>gyrB</i>)	FWD 5'-CGGGAAGTGGCCTTCTTAAA-3'	4,686-6,629	Este estudio
	REV 5'-GTGGTAGTCGTCCGTGTATTG-3'		
16S rRNA	FWD 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	86,149-87,711	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
	REV 5'- ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'		

9.8 Amplificación de los genes por PCR

El PCR se realizó siguiendo las temperaturas y concentraciones anteriormente descritas, en la Tabla 8 se muestran las condiciones ideales para la amplificación y el tamaño aproximado del fragmento obtenido.

Tabla 8. Temperaturas de alineamiento y tamaño del amplicón esperado bajo las condiciones de PCR estandarizadas.

Cebador	Temperatura de alineamiento (°C)	Concentración de MgCl ₂ (mM)	Tamaño del amplicón obtenido (pb)
<i>rpoA</i>	46 *	4mM	530
<i>pheS</i>	48	3mM	450
<i>tuF</i>	56	3mM	800
<i>Hsp60</i>	37	3mM	600
<i>GyrB</i>	55	3mM	250
<i>recA</i>	--	--	--
16S rRNA	52	3mM	1540

9.9 Electroforesis de los amplificados.

Para todos los genes seleccionados se obtuvieron resultados específicos, excepto para el gen *rpoA* el cual mostro de 2 a 3 bandas inespecíficas dependiendo la bacteria en estudio y para el gen de *gyrB* que solo amplificó para las bacterias 1, 2, 3, 6 y 7 y no amplificó para las bacterias 4 y 5. En las siguientes imágenes se muestran los amplificados obtenidos para cada gen.

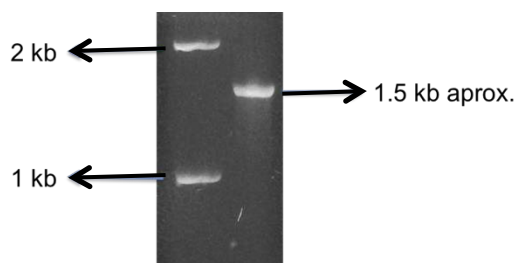


Figura 20 . Amplificado del gen 16S rRNA en un gel de Agarosa al 1%, donde se observa un amplicón de aproximadamente 1.5 kB

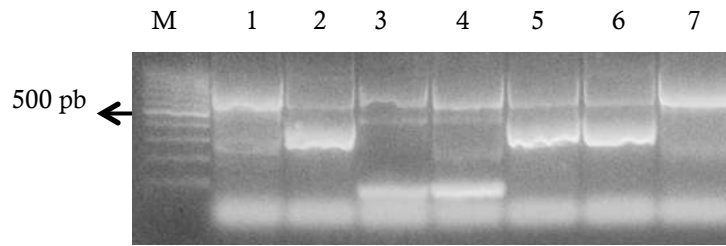


Figura 21. Amplificado del gen *rpoA* en un gel de agarosa al 2%. En la imagen se observan varios amplificones inespecíficos, el deseado es el que se encuentra en la región de 600 pb aproximadamente. El carril M corresponde al marcador, los carriles 1 a 7 muestran los amplicones obtenidos para las cepas 1 a 7 respectivamente.

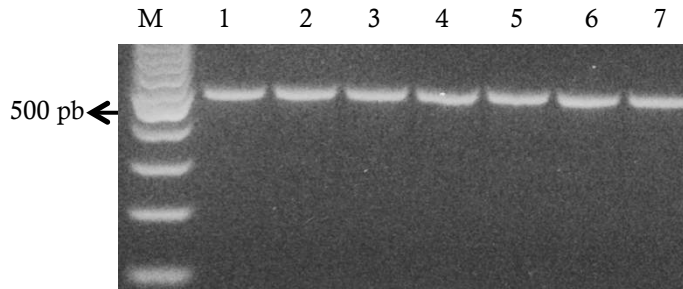


Figura 22. Amplificado del gen *Hsp60* en un gel de agarosa al 2%. Amplicón de 600 pb aproximadamente. El carril M corresponde al marcador, los carriles 1 a 7 muestran los amplicones obtenidos para las cepas 1 a 7 respectivamente.

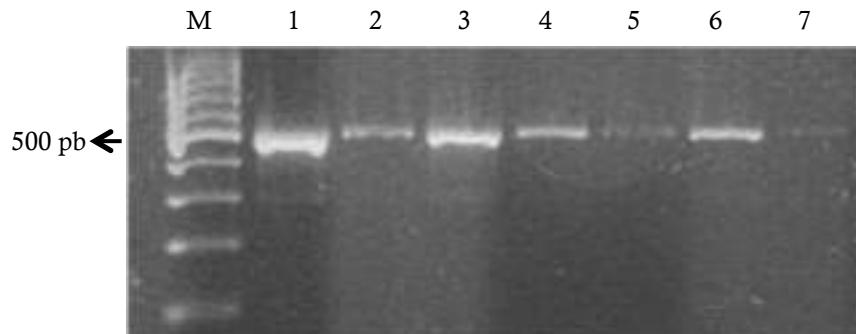


Figura 23. Amplificado del gen *pheS* en un gel de agarosa al 2%. Amplicón de 450 pb aproximadamente. El carril M corresponde al marcador, los carriles 1 a 7 muestran los amplicones obtenidos para las cepas 1 a 7 respectivamente.

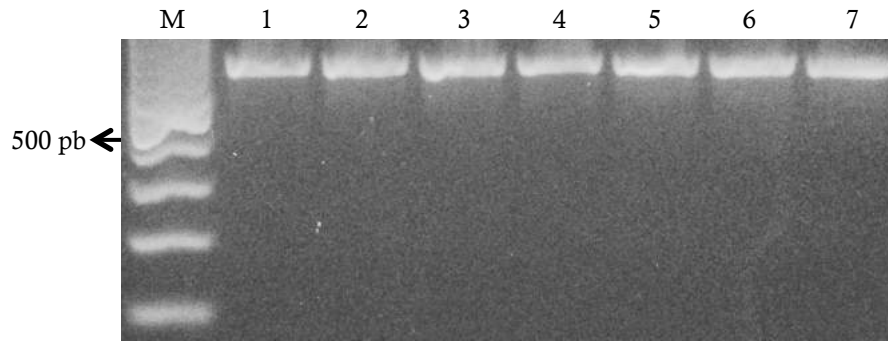


Figura 24. Amplificado del gen *tuF* en un gel de agarosa al 2%. Amplicón de aproximadamente 800 pb. El carril M corresponde al marcador, los carriles 1 a 7 muestran los amplicones obtenidos para las cepas 1 a 7 respectivamente

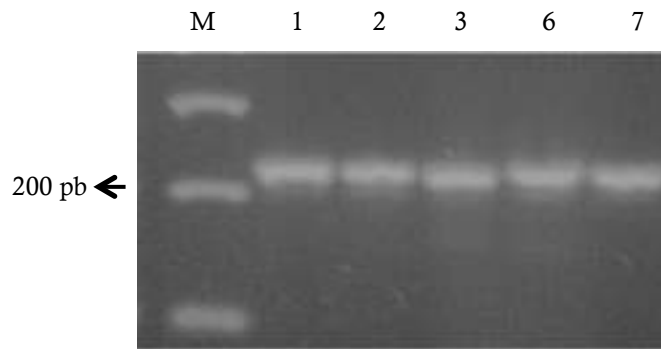


Figura 25. Amplificado del gen *GryB* en un gel de agarosa al 2%. Amplicón de aproximadamente 200 pb. El carril M corresponde al marcador, los carriles 1 a 7 muestran los amplicones obtenidos para las cepas 1 a 7 excepto las cepas 4 y 5 que no amplificaron con el cebador diseñado.

9.10 Secuenciación de los amplificados obtenidos

Los resultados de secuenciación obtenidos fueron analizados con el programa 4Peak (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>), pero debido a la capacidad del secuenciador los extremos que no pudieron ser leídos correctamente fueron eliminados. Los resultados correspondientes a cada gen fueron los siguientes (las secuencias obtenidas se muestran en el Anexo 1).

9.10.1 Gen 16S rRNA

Con el cebador sentido se obtuvo una secuenciación de alrededor de 650 pares de bases, con el cebador contra-sentido se obtuvo una secuenciación de alrededor de 755. Al realizar la secuencia contigua y eliminar los extremos de baja calidad nos dio como resultado una secuencia de aproximadamente 1300 pb.

9.10.2 Gen *pheS*

Con el cebador sentido se obtuvo una secuenciación de alrededor de 405 pb, y con el contrasentido de aproximadamente 407 pb, las cuales al realizar el análisis contiguo y eliminar los extremos de baja calidad nos dio una secuencia de alrededor de 390 pb.

9.10.3 Gen *Hsp60*

En este caso, ambos cebadores arrojaron una secuencia de alrededor de 560 pb, al realizar el análisis contiguo y eliminar los extremos de baja calidad se obtuvo una secuencia de alrededor de 490 pb.

9.10.4 Gen *tuF*

Para este gen se obtuvo una secuenciación de alrededor de 650 pb para ambos genes y al realizarse la eliminación de los extremos y la secuencia contigua se obtuvo una región útil de alrededor de 580 pb.

9.10.5 Gen *gyrB*

Para este gen la secuenciación que se obtuvo fue de muy baja calidad, por lo cual no se pudo realizar el contig para este gen. Esta situación puede deberse a que el primer utilizado no era muy específico y por lo mismo no fue útil para realizar la secuenciación.

9.11 Alineamientos Múltiples

El alineamiento múltiple realizado en el programa Clustal Omega para determinar que partes de la secuencia son idénticas o similares entre las secuencias analizadas. La interface gráfica del programa arrojó un alineamiento como el que se observa en la Fig. 26.

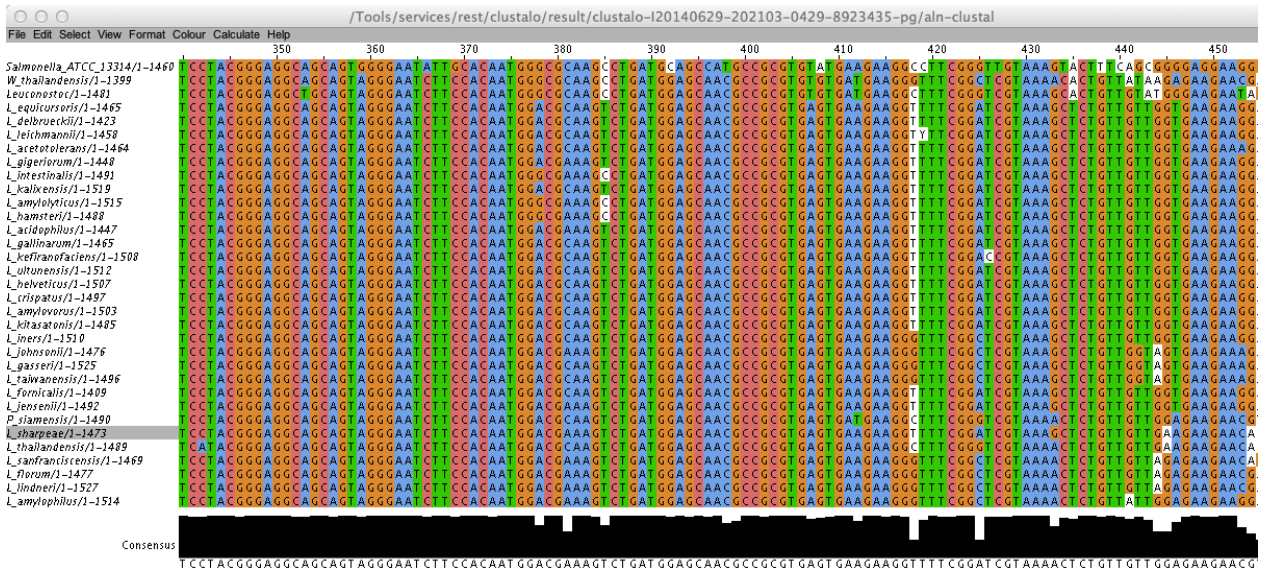


Figura 26 . Alineamiento múltiple de las cepas en el programa Clustal Omega

Posteriormente las secuencias alineadas se transfirieron a la interfase SeaView para la realización del árbol filogenético del género *Lactobacillus*.

9.12 Análisis Filogenético

Con las secuencias de los amplicones obtenidos se realizaron análisis filogenéticos de máxima verosimilitud con el programa PhyML a través de la interface SeaView bajo el modelo GTR+G. Se obtuvieron los arboles filogenéticos correspondientes a los genes propuestos en este estudio.

9.12.1 Análisis filogenético del gen 16S rRNA

Produjo un árbol (Fig. 27) donde las ramas horizontales muestran la evolución de los linajes con relación al tiempo y las líneas verticales muestran las conexiones entre los linajes. Este análisis agrupó a las bacterias estudiadas con las secuencias de referencia quedando de la siguiente manera:

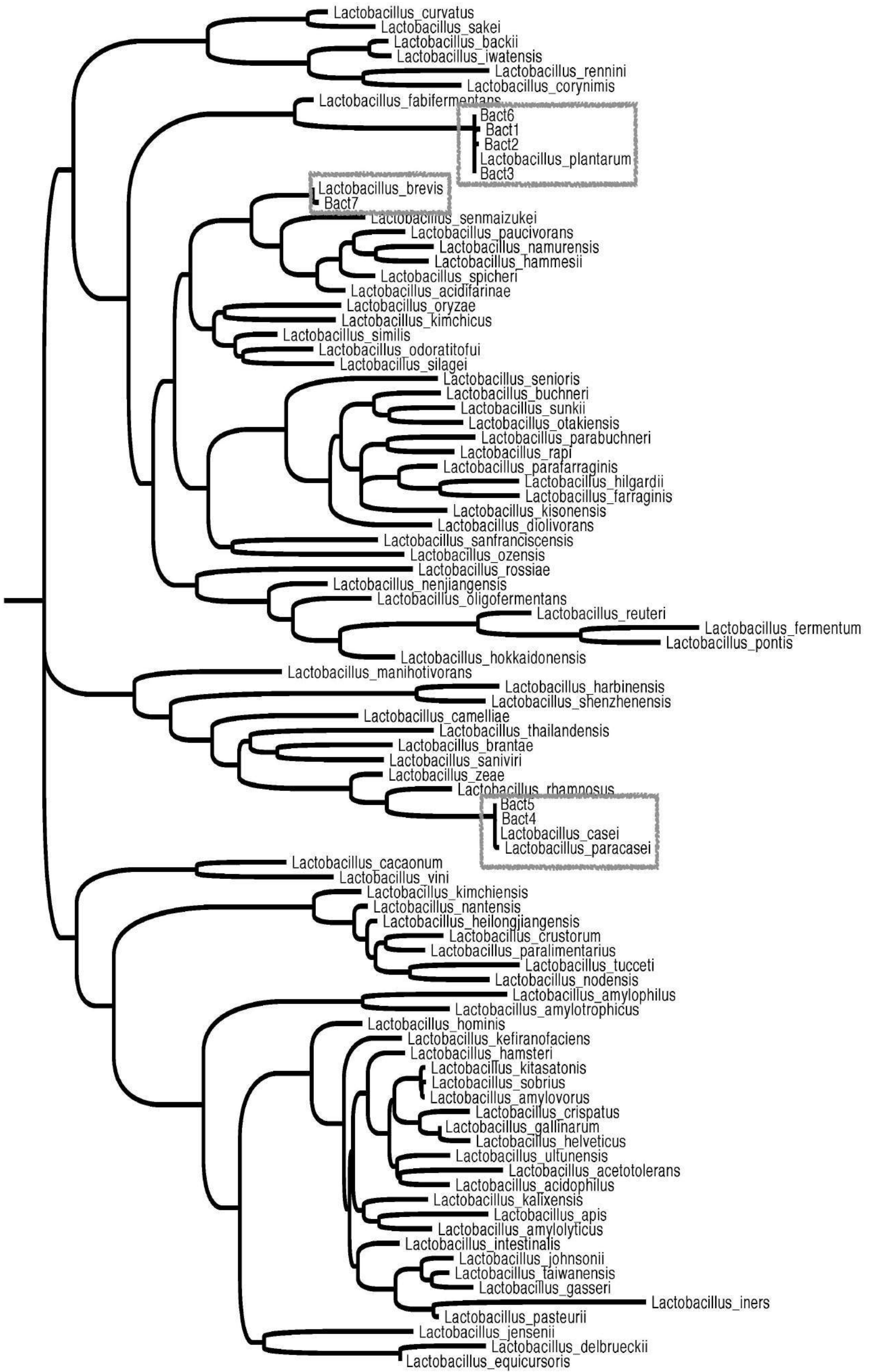
- Las cepas 2, 3 y 6, se agruparon junto con las especies *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* y *L. xianfangensis*.
- Las cepas 4 y 5, con *L. zeae*, *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*.
- Finalmente, la 7 quedo solo agrupada con *L. brevis*.



0.05

Debido a que las cepas de referencia no quedan en un grupo aislado unas de otras se concluye que no es suficiente el análisis del gen 16S rRNA para la identificación a nivel de especie para este género de bacterias.

Figura 27. Árbol filogenético obtenido del análisis del gen 16S rRNA, encerrado en recuadros se observa la ubicación de las cepas en estudio y su agrupamiento con las cepas de referencia



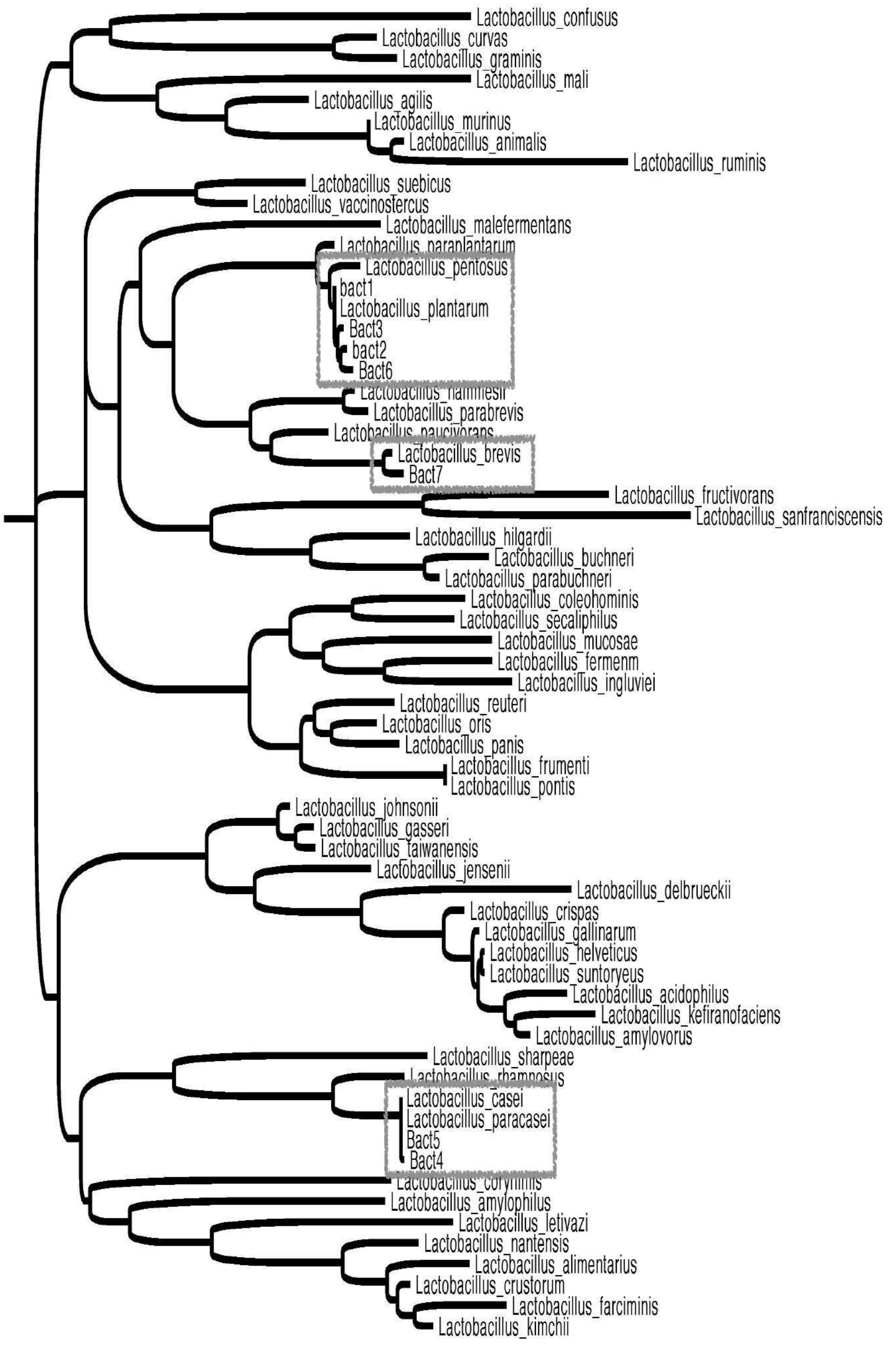
0.2

9.12.2 Análisis filogenético del gen *pheS*

El análisis de gen *pheS* (Fig. 28) permitió una asociación mejor de las bacterias del estudio con las cepas referencia. La relación filogenética quedo de la siguiente manera:

- Las bacterias 1, 2, 3 y 6 quedaron agrupadas solamente con la bacteria referencia *L. plantarum*.
- La bacteria 4 y 5, presentaron mayor similitud con *L. casei*, pero aún está muy cercana la especie *L. paracasei*.
- La bacteria 7, únicamente quedo agrupada con la referencia de *L. brevis*.

Figura 28. Árbol filogenético obtenido del análisis del gen *pheS*, encerrado en recuadros se observa la ubicación de las cepas en estudio y su agrupamiento con las cepas de referencia



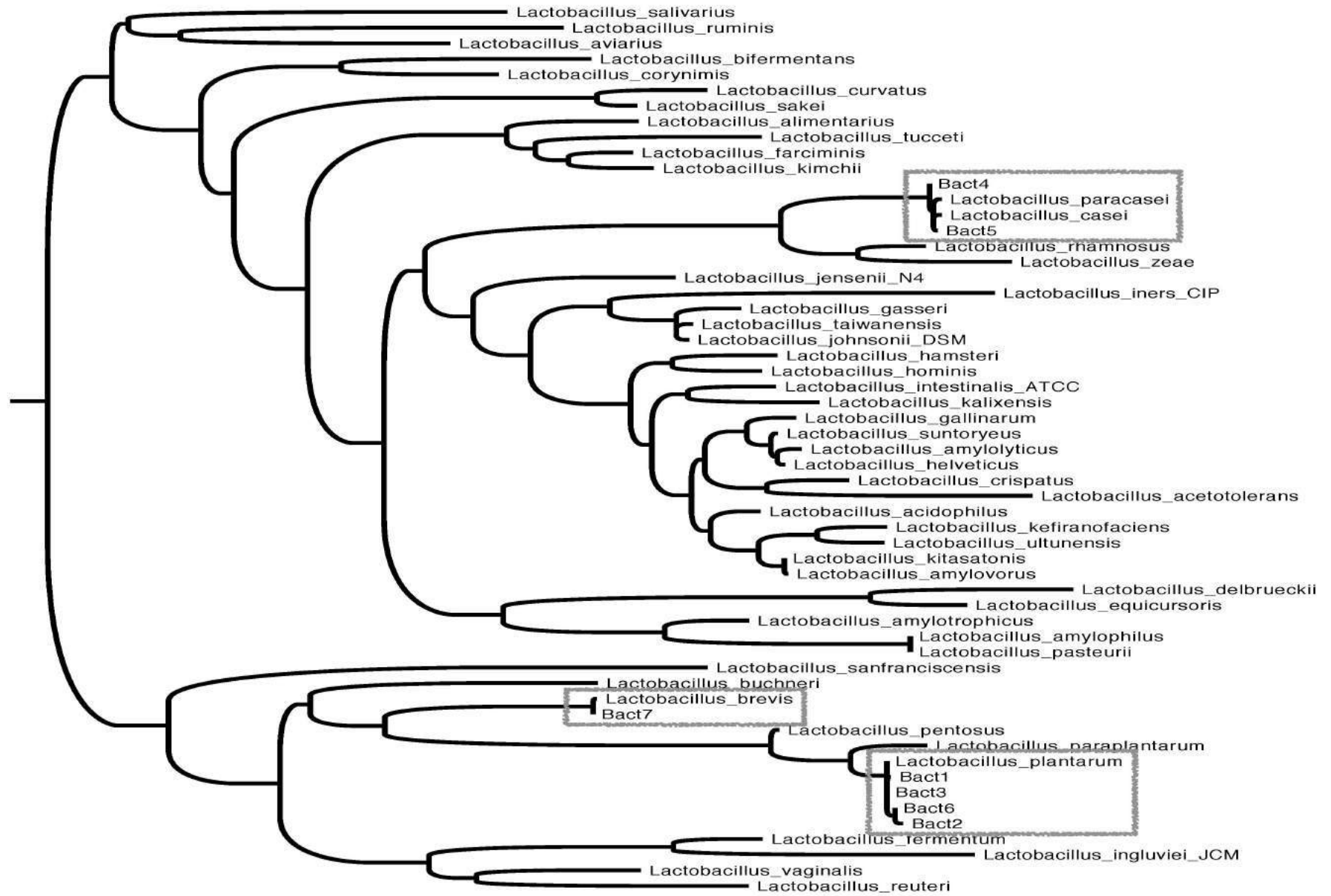
0.04

9.12.3 Análisis filogenético del gen *tuF*

Los resultados del análisis filogenético del gen *tuF* (Fig. 29) muestran la siguiente relación filogenética:

- Las cepas 1, 2, 3 y 6 también se agruparon junto con la bacteria referencia *L. plantarum*, aunque en este caso, las cepas se encuentran más distantes respecto que lo calculado con el gen *pheS*
- Las cepas 4 y 5 siguen estando relacionadas con *L. casei* y *L. paracasei*, aunque en este caso la bacteria 4 es más cercana a *L. paracasei*, mientras que la cepa 5 es más cercana a *L. casei*.
- La bacteria 7 sigue agrupándose solamente con *L. brevis*.

Figura 29. Árbol filogenético obtenido del análisis del gen *tuF*, encerrado en recuadros se observa la ubicación de las cepas en estudio y su agrupamiento con las cepas de referencia



0.05

9.12.4 Análisis filogenético del gen *Hsp60*

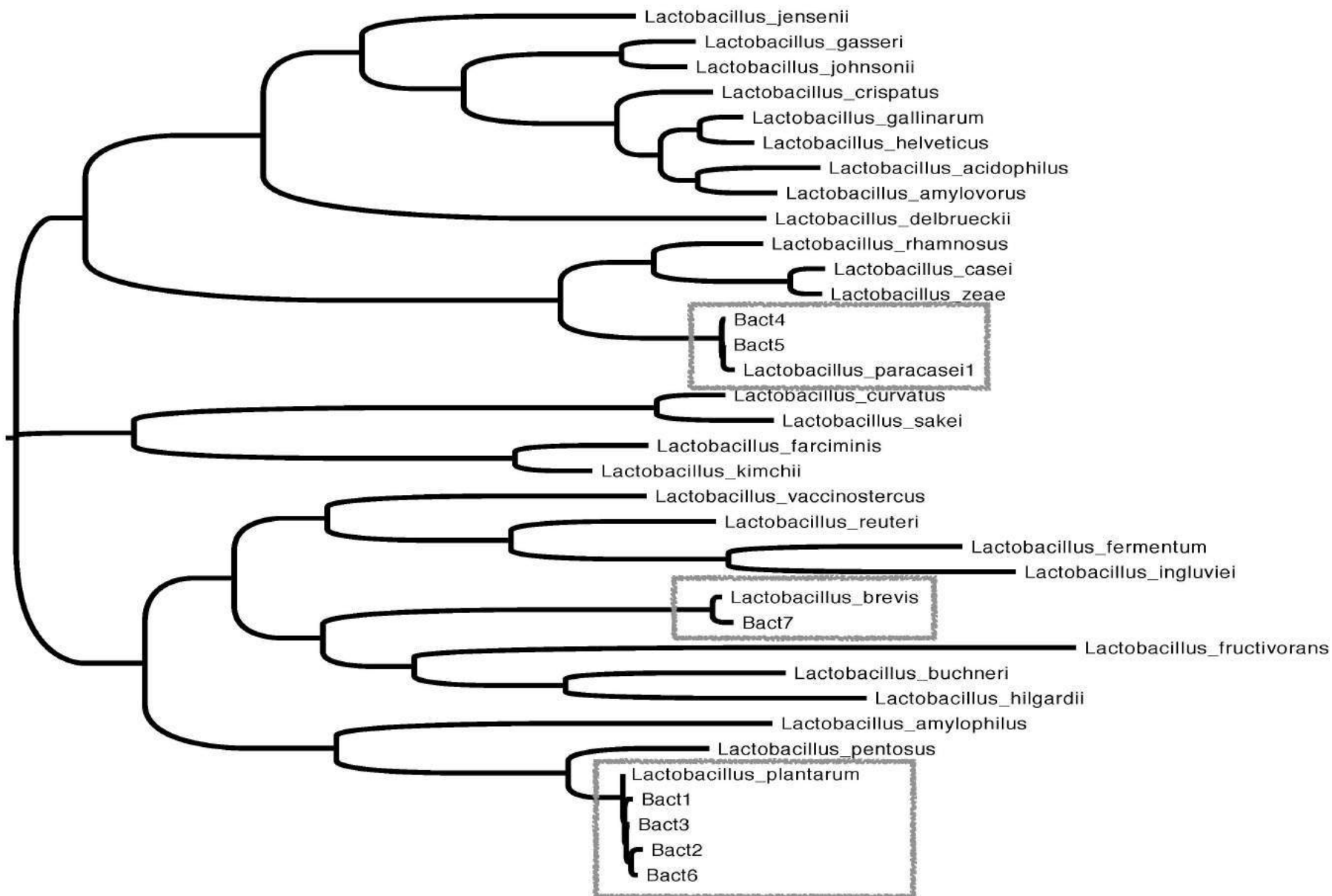
Los resultados del análisis filogenético del gen *Hsp60* de *Lactobacillus* (Fig. 30) muestran la siguiente relación filogenética:

- Las cepas 1, 2, 3 y 6 se encuentran agrupadas nuevamente con la cepa de *L. plantarum* de referencia.
- La cepa 4 se encontró relacionada con *L. casei* mientras que la cepa 5 más con *L. paracasei*, comportamiento opuesto al observado con el gen *tuF*.
- La cepa 7, continúa relacionada únicamente con la referencia de *L. brevis*.

Los resultados obtenidos permiten establecer que el análisis de los genes constitutivos *tuF*, *pheS* y *Hsp60* genera mayor información permitiendo que la discriminación entre especies sea mayor, comparado con lo encontrado únicamente con el gen 16S rRNA ribosomal. Sin embargo, en los genes *pheS* y *Hsp60*, se encontró inversión de la distancia entre las cepas 4 y 5 con *L. casei* y *L. paracasei*.

El análisis de las secuencias concatenadas permitirá valorar la distancia filogenética agrupada de los genes por lo que se realizó este análisis y los resultados se describen a continuación.

Figura 30. Árbol filogenético obtenido del análisis del gen *Hsp60*, encerrado en recuadros se observa la ubicación de las cepas en estudio y su agrupamiento con las cepas de referencia



0.05

9.12.5 Análisis concatenado de los genes *pheS*, *tuF* y *Hsp60*.

Los resultados del análisis filogenético concatenado de los genes constitutivos escogidos para *Lactobacillus* se muestran en el árbol filogenético concatenado (Fig. 31):

- Las cepas 1, 2, 3 y 6 se agruparon junto con la bacteria referencia *L. plantarum*, aunque en este caso, las cepas se encuentran más distantes respecto que lo calculado con el gen *pheS*.
- Las cepas 4 y 5 con este análisis se lograron agrupar con *L. paracasei*, la cepa de *L. casei* con ayuda de este estudio fue separada en otro grupo.
- La bacteria 7 sigue agrupándose solamente con *L. brevis*.

Con la realización de este análisis, se logró identificar la especie perteneciente de las bacterias 4 y 5, que no logró ser identificada mediante los análisis individuales anteriores.

Figura 31. Árbol filogenético obtenido del análisis concatenado, encerrado en recuadros se observa la ubicación de las cepas en estudio y su agrupamiento con las cepas de referencia

En la Tabla 9 se muestra de forma resumida la posición filogenética de los *Lactobacillus* analizados en este estudio.

Tabla 9. Ubicación taxonómica de las especies estudiadas.

Cepa/Análisis	16s rRNA	pheS	tuF	Hsp60	Concatenado
1	--	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
2	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. paraplantarum</i> <i>L. xianfangensis</i> Complex	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
3	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. paraplantarum</i> <i>L. xianfangensis</i> Complex	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
4	<i>L. zaeae</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> y <i>L. rhamnosus</i> Complex	<i>L. casei</i> y <i>L. Paracasei</i> Complex	<i>L. casei</i> y <i>L. Paracasei</i> Complex	<i>L. casei</i> y <i>L. Paracasei</i> Complex	<i>L. paracasei</i>
5	<i>L. zaeae</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> y <i>L. rhamnosus</i> Complex	<i>L. casei</i> y <i>L. paracasei</i> Complex	<i>L. casei</i> y <i>L. paracasei</i> Complex	<i>L. casei</i> y <i>L. paracasei</i> Complex	<i>L. paracasei</i>
6	<i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. paraplantarum</i> <i>L. xianfangensis</i> Complex	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
7	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>

10 DISCUSIÓN

El género *Lactobacillus* es un grupo bacteriano que tiene un gran número de aplicaciones, como son la producción de alimentos y bebidas fermentadas, cultivos iniciadores, probióticos, recuperación de productos de valor agregado, aprovechamiento de metabolitos secundarios, entre muchas otros. Debido a esto, es necesario identificar de manera confiable a cada una de las especies de este género para aprovechar todos sus beneficios y establecer posibles nuevas aplicaciones. De esta manera, se generarían beneficios económicos, la certeza en los resultados para publicar y obtener patentes. En este estudio se utilizaron métodos fenotípicos y moleculares para identificar algunas cepas del género *Lactobacillus* mediante una metodología más exacta, de menor costo y más rápida.

Los métodos fenotípicos y bioquímicos tradicionales realizados permitieron un acercamiento hacia la identidad de la bacteria spB2. En primera instancia, se realizaron pruebas rápidas y sencillas como fue la tinción de Gram que ayudó en la identificación morfológica de la bacteria en estudio, las pruebas de oxidasa y catalasa; así como la habilidad de desarrollarse en atmosferas de incubación diferentes permitieron situar a la bacteria dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL). En seguida, mediante pruebas de fermentación y movilidad se discriminó el género. Finalmente, la galería API que presenta una batería más específica de pruebas bioquímicas, permitió comparar algunos datos obtenidos mediante las pruebas preliminares y cotejar estos resultados en la base de datos correspondiente al sistema, con el cual se obtuvo un valor numérico correspondiente al grado confiabilidad con el que se logró identificar a la bacteria spB2 como *L. brevis*.

Cabe resaltar que ningún método de identificación fenotípica proporciona un resultado absoluto, únicamente permite indicar cuál es el género y, en algunos casos, la especie a la que la bacteria tiene la probabilidad más alta de pertenecer. Esto, debido a que mutaciones puntuales pueden llevar a errores durante las pruebas de identificación que se realizan, generando una identificación equivocada, resultando en pérdida de tiempo y costos mayores en el proceso de identificación; ya que depende de la pureza, edad y buen desarrollo del cultivo bacteriano. En este estudio la identificación preliminar de la bacteria spB2 se tuvo con una confiabilidad del 97%; presentándose un 3% de

probabilidad de errar en la discriminación principalmente a nivel especie, asociado con la gran versatilidad que presenta el género *Lactobacillus*.

En la mayoría de los laboratorios de investigación se requiere la identificación rápida y precisa de aquellos microorganismos que presentan un interés particular, razón por la cual se ha optado por la implementación de métodos moleculares. Lo anterior debido a que, en general, estas metodologías acortan el tiempo en la obtención de una identificación confiable al no depender del cultivo de la bacteria si ya se tiene el ADN almacenado.

Además de las pruebas bioquímicas tradicionales para el género *Lactobacillus* y pruebas de fermentación para tratar de aproximar la especie a la que pertenecen los microorganismos estudiados, se utilizaron dos metodologías moleculares para la identificación de las especies bacterianas; el análisis del gen 16S rRNA y el análisis de la secuencia de varios genes (MLSA).

El análisis del gen 16S rRNA es una de las metodologías moleculares más estudiadas, éste gen se encuentra muy conservado en todas las especies bacterianas ya que produce la subunidad pequeña del ribosoma, componente esencial para la síntesis de proteínas. A pesar de lo anterior, también presenta regiones hipervariables que pueden servir para la diferenciación entre géneros bacterianos. Algunos autores argumentan que, debido a la conservación del gen, solo sirve para la identificación a nivel de género y no es posible llegar a nivel de especie utilizando únicamente esta metodología (Rachman *et al.*, 2003, Torriani *et al.*, 2001, Fox *et al.*, 1992). A pesar de esta limitante, es considerado como una buena herramienta para realizar un análisis rápido, sobre todo en estudios en donde se comparen varios géneros pero sin que se requiera una identificación hasta nivel de especie.

El método MLSA ha demostrado ser muy robusto para identificar bacterias a nivel de especie, ha tenido gran aceptación y sigue enriqueciendo las bases de datos caracterizando nuevas especies. En la actualidad, existen pocos estudios de identificación del género *Lactobacillus* utilizando la técnica MLSA, el sitio <http://pubmlst.org> reporta que en los últimos 2 años solo se han publicado 4 estudios donde se identifica por esta metodología alguna especie del género. Estos estudios sólo identifican un número pequeño de especies entre las que se puede mencionar a

Lactobacillus delbrueckii (Adimpong *et al.*, 2013), *Lactobacillus sakei* (Chaillou *et al.*, 2013), especies pertenecientes al complejo de *L. acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, y *L. johnsonii*) (Ramachandran *et al.*, 2013) y *Lactobacillus plantarum* (Gosiewski *et al.*, 2012). En el caso del estudio desarrollado por Ramachandran se utilizaron cebadores diferentes para cada gen dependiendo de la especie que se estaba identificando.

En contraste, en este estudio se compararon especies no emparentadas (*L. plantarum*, *L. casei*. y *L. brevis*) utilizando cebadores universales para los genes constitutivos designados, que permitió identificar 7 especies de las cuales sólo una (*Lactobacillus plantarum*) ha sido reportada mediante MLSA. Además, el uso de cebadores universales para la identificación de especies diferentes del género *Lactobacillus* mediante MLSA tiene ventajas como permitir realizar en una sola corrida de PCR la identificación del gen objetivo a una sola temperatura de alineamiento, y por lo mismo que se puedan identificar un mayor número de especies en vez de que se utilizaran cebadores específicos para cada especie.

11 CONCLUSIÓN

- Mediante pruebas bioquímicas se identificó de manera preliminar el género de la bacteria estudiada spB2.
- Se seleccionaron cebadores universales para los genes que amplifican en el género *Lactobacillus*
- Se identificó a la cepa spB2 como *Lactobacillus brevis* mediante técnicas moleculares
- La aplicación y estandarización del método MLSA para la identificación no sólo de la bacteria spB2 perteneciente al género *Lactobacillus*, sino de las especies de referencia utilizadas durante este proceso, se propone como una metodología que puede implementarse en aquellos estudios donde se requiera identificar una o varias bacterias con importancia industrial, alimentaria y /o clínica; debido a la rapidez con la cual esta identificación puede obtenerse y el bajo índice de error asociado con su uso.
- A largo plazo la identificación con el uso de los genes pheS, tuF y Hsp60 permitirá identificar de manera más exacta y a bajo costo especies de bacterias ácido-lácticas.
- Se demostró que con la secuenciación de *loci* de genes constitutivos se pueden obtener resultados reproducibles de manera rápida, relativamente sencilla y con alto grado de confiabilidad.

12 PERSPECTIVAS

- Establecer como procedimiento indispensable el uso de MLSA/MLST para la identificación de bacterias ácido lácticas, evitando la redundancia de secuencias de referencia.
- Buscar implementar que las bases de datos donde se encuentran almacenadas las secuencias de referencias establezcan mejores protocolos y lineamientos, además de que aquellas secuencias ya existentes sean curadas para evitar la distribución de información no útil.
- Se requiere el desarrollo de una base de datos especializada, donde se pueda almacenar y compartir de forma gratuita las secuencias utilizadas para el análisis

MLSA/MLST de especies de *Lactobacillus* y otros géneros de bacterias ácido-lácticas.

13 BIBLIOGRAFÍA

- ABAYNEH, T., COLQUHOUN, D. J. & SORUM, H. 2012. Multi-locus Sequence Analysis (MLSA) of *Edwardsiella tarda* isolates from fish. *Vet Microbiol.* Netherlands.
- ADIMPONG, D. B., NIELSEN, D. S., SORENSEN, K. I., VOGENSEN, F. K., SAWADOGO-LINGANI, H., DERKX, P. M. & JESPERSEN, L. 2013. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *jakobsenii* subsp. nov., isolated from dolo wort, an alcoholic fermented beverage in Burkina Faso. *Int J Syst Evol Microbiol.* England.
- AHMED, N., DEVI, S. M., VALVERDE MDE, L., VIJAYACHARI, P., MACHANG'U, R. S., ELLIS, W. A. & HARTSKEERL, R. A. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5, 28.
- ANÓNIMO 2011. Infografía Captura 2011. In: CONAPESCA (ed.). Mazatlán, Sinaloa: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/infografia_captura2011.
- ANSORGE, W. J. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol.* Netherlands.
- ANTHONY, R. M., BROWN, T. J. & FRENCH, G. L. 2000. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol*, 38, 781-8.
- ANTON, A. I., MARTINEZ-MURCIA, A. J. & RODRIGUEZ-VALERA, F. 1999. Intraspecific diversity of the 23S rRNA gene and the spacer region downstream in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181, 2703-9.
- ASH, C. & COLLINS, M. D. 1992. Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of *Bacillus anthracis* and emetic *Bacillus cereus* determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett*, 73, 75-80.
- BARTHOLOMEW, J. W. & MITTWER, T. 1952. The Gram stain. *Bacteriol Rev*, 16, 1-29.
- BAZEMORE, L. R., FOLTA-STOGNIEW, E., TAKAHASHI, M. & RADDING, C. M. 1997. RecA tests homology at both pairing and strand exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11863-8.

- BEN AMOR, K., VAUGHAN, E. E. & DE VOS, W. M. 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J Nutr.* United States.
- BENSON, D. A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J. & SAYERS, E. W. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* England.
- BETZL, D., LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. H. 1990. Identification of lactococci and enterococci by colony hybridization with 23S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, 56, 2927-9.
- BEVERIDGE, T. J. 2001. Use of the gram stain in microbiology. *Biotech Histochem*, 76, 111-8.
- BJÖRKROTH, K. J. & KORKEALA, H. J. 1996. Evaluation of *Lactobacillus* sake contamination in vacuum-packaged sliced cooked meat products by ribotyping. *Journal of Food Protection®*, 59, 398-401.
- BLAIOTTA, G., FUSCO, V., ERCOLINI, D., APONTE, M., PEPE, O. & VILLANI, F. 2008. *Lactobacillus* strain diversity based on partial Hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. *Appl Environ Microbiol.* United States.
- BOIVIN-JAHNS, V., BIANCHI, A., RUIMY, R., GARCIN, J., DAUMAS, S. & CHRISTEN, R. 1995. Comparison of phenotypical and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. *Appl Environ Microbiol*, 61, 3400-6.
- BOU, G., FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., SÁEZ-NIETO, J. A. & VALDEZATE, S. 2010. Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 37.
- BOU, G., FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., SÁEZ-NIETO, J. A. & VALDEZATE, S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29, 601-608.
- BOYER, S. L., FLECHTNER, V. R. & JOHANSEN, J. R. 2001. Is the 16S–23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 1057-1069.

- BUHNIK-ROSENBLAU, K., MATSKO-EFIMOV, V., JUNG, M., SHIN, H., DANIN-POLEG, Y. & KASHI, Y. 2012. Indication for Co-evolution of *Lactobacillus johnsonii* with its hosts. *BMC Microbiol.* England.
- CAI, H., RODRIGUEZ, B. T., ZHANG, W., BROADBENT, J. R. & STEELE, J. L. 2007. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology.* England.
- CARR, F. J., CHILL, D. & MAIDA, N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*, 28, 281-370.
- CHAILLOU, S., LUCQUIN, I., NAJJARI, A., ZAGOREC, M. & CHAMPOMIER-VERGES, M. C. 2013. Population genetics of *Lactobacillus sakei* reveals three lineages with distinct evolutionary histories. *PLoS One.* United States.
- CHAN, J. Z., HALACHEV, M. R., LOMAN, N. J., CONSTANTINIDOU, C. & PALLEN, M. J. 2012. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiol.* England.
- CHAN, M. S., MAIDEN, M. C. & SPRATT, B. G. 2001. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*, 17, 1077-83.
- CHANG, C. H., CHANG, Y. C., UNDERWOOD, A., CHIOU, C. S. & KAO, C. Y. 2007. VNTRDB: a bacterial variable number tandem repeat locus database. *Nucleic Acids Res.* England.
- CHAVAGNAT, F., HAUETER, M., JIMENO, J. & CASEY, M. G. 2002. Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiol Lett.* Netherlands.
- CHEN, Z., YANG, H. & PAVLETICH, N. P. 2008. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature.* England.
- CHO, E. J., BAE, J. B., KANG, J. G. & ROE, J. H. 1996. Molecular analysis of RNA polymerase alpha subunit gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nucleic Acids Res.* England.

- CIRA, L. A., HUERTA, S., HALL, G. M. & SHIRAI, K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37, 1359-1366.
- CLARRIDGE, J. E., 3RD 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. United States.
- COHAN, F. M. 2002. What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol*. United States.
- CURRY, B. & CROW, V. 2002. LACTOBACILLUS spp. I General Characteristics. In: ROGINSKI, H. (ed.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Oxford: Elsevier.
- DAFFONCHIO, D., CHERIF, A., BRUSETTI, L., RIZZI, A., MORA, D., BOUDABOUS, A. & BORIN, S. 2003. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl Environ Microbiol*, 69, 5128-37.
- DANZEISEN, J. L., WANNEMUEHLER, Y., NOLAN, L. K. & JOHNSON, T. J. 2013. Comparison of multilocus sequence analysis and virulence genotyping of *Escherichia coli* from live birds, retail poultry meat, and human extraintestinal infection. *Avian Dis*, 57, 104-8.
- DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A. & MUNOZ, R. 2006. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology*, 152, 85-93.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M. & SHARPE, M. E. 1960. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- DE VUYST, L. 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 105-112.
- DRANCOURT, M. & RAOULT, D. 2002. rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol*, 40, 1333-8.
- DU PLESSIS, E. M. & DICKS, L. M. 1995. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus johnsonii*. *Curr Microbiol*, 31, 114-8.

- EMERSON, D., AGULTO, L., LIU, H. & LIU, L. 2008. Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *BioScience*, 58, 925-936.
- EUZÉBY, J. P. 2008. List of prokaryotic names with standing in nomenclature-genus. *Staphylococcus*. [Consultado en Octubre 2014]. Available online: <http://www.bacterio.cict.fr>.
- FACKLAM, R. R. & MOODY, M. D. 1970. Presumptive identification of group D streptococci: the bile-esculin test. *Appl Microbiol*, 20, 245-50.
- FANGMAN, W. L. 1978. Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 5, 653-65.
- FLEISCHMANN, R. D., ADAMS, M. D., WHITE, O., CLAYTON, R. A., KIRKNESS, E. F., KERLAVAGE, A. R., BULT, C. J., TOMB, J. F., DOUGHERTY, B. A., MERRICK, J. M. & ET AL. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269, 496-512.
- FOX, G. E., WISOTZKEY, J. D. & JURTSCHUK, P., JR. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*, 42, 166-70.
- FREDSLUND, J., SCHAUSER, L., MADSEN, L. H., SANDAL, N. & STOUGAARD, J. 2005. PriFi: using a multiple alignment of related sequences to find primers for amplification of homologs. *Nucleic Acids Res*. England.
- GARCIA-MARTINEZ, J., MARTINEZ-MURCIA, A., ANTON, A. I. & RODRIGUEZ-VALERA, F. 1996. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. *J Bacteriol*, 178, 6374-7.
- GEVERS, D., COHAN, F. M., LAWRENCE, J. G., SPRATT, B. G., COENYE, T., FEIL, E. J., STACKEBRANDT, E., VAN DE PEER, Y., VANDAMME, P., THOMPSON, F. L. & SWINGS, J. 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol*, 3, 733-9.
- GILLETT, M. 2008. Global study of shrimp fisheries. In: FAO. (ed.). Roma, Italia: Fisheries Technical Paper.

- GIMENO, M., RAMIREZ-HERNANDEZ, J. Y., MARTINEZ-IBARRA, C., PACHECO, N., GARCIA-ARRAZOLA, R., BARZANA, E. & SHIRAI, K. 2007. One-solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *J Agric Food Chem*, 55, 10345-50.
- GIRAFFA, G., CHANISHVILI, N. & WIDYASTUTI, Y. 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res Microbiol*. France.
- GLAZUNOVA, O. O., RAOULT, D. & ROUX, V. 2009. Partial sequence comparison of the rpoB, sodA, groEL and gyrB genes within the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. England.
- GOH, S. H., POTTER, S., WOOD, J. O., HEMMINGSEN, S. M., REYNOLDS, R. P. & CHOW, A. W. 1996. Hsp60 gene sequences as universal targets for microbial species identification: studies with coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, 34, 818-23.
- GOSIEWSKI, T., CHMIELARCZYK, A., STRUS, M., BRZYCHCZY-WLOCH, M. & HECZKO, P. B. 2012. The application of genetics methods to differentiation of three *Lactobacillus* species of human origin. *Ann Microbiol*.
- GOUY, M., GUINDON, S. & GASCUEL, O. 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*. United States.
- GRAM, H. C. 1884. Uber die isolirte Färbung der Schizomy- ceten in Schnitt- und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185-89.
- GUNDI, V. A., DIJKSHOORN, L., BURIGNAT, S., RAOULT, D. & LA SCOLA, B. 2009. Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology*. England.
- GUPTA, R. S. 1995. Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Mol Microbiol*, 15, 1-11.
- HAMMES, W. P. & VOGEL, R. F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B. & HOLZAPFEL, W. H. (eds.) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer US.
- HANAGE, W. P., FRASER, C. & SPRATT, B. G. 2005. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol*, 3, 6.

- HOLLENDER, D., CONDE, S. B., SALUSTIO, E. & SAMARTINO, L. E. 2013. Detección de un complejo clonal con el genotipo de *Brucella abortus* biovariedad 2 como fundador en aislamientos de *B. abortus* de Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 45, 229-239.
- HUNT, D. E., KLEPAC-CERAJ, V., ACINAS, S. G., GAUTIER, C., BERTILSSON, S. & POLZ, M. F. 2006. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol*. United States.
- HWANG, S. M., KIM, M. S., PARK, K. U., SONG, J. & KIM, E. C. 2011. Tuf gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*. United States.
- HYMAN, E. D. 1988. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem*, 174, 423-36.
- INFO., F. S. 2014. *Microbial Identification and Strain Typing Using Molecular Techniques* [Online]. Available: <http://www.rapidmicrobiology.com/test-method/molecular-techniques-for-microbial-identification-and-typing/>.
- ISLAS-ENRÍQUEZ, R. P. 2010. *Tratamiento microbiano de residuos de camarón para obtención de quitina y astaxantina*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- JOHNSON, R. B., FEARON, K., MASON, T. & JINDAL, S. 1989. Cloning and characterization of the yeast chaperonin Hsp60 gene. *Gene*, 84, 295-302.
- JURTSHUK, P., JR. & MCQUITTY, D. N. 1976. Use of a quantitative oxidase test for characterizing oxidative metabolism in bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 31, 668-79.
- KARAH, N., HALDORSEN, B., HEGSTAD, K., SIMONSEN, G. S., SUNDSFJORD, A. & SAMUELSEN, O. 2011. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *J Antimicrob Chemother*. England.
- KAUFMANN, M. E. 1998. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med*, 15, 33-50.
- KHAMIS, A., RAOULT, D. & LA SCOLA, B. 2004. rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol*. United States.

- KLEEREBEZEM, M. & HUGENHOLTZ, J. 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol*. England.
- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C. & REUTER, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. Netherlands.
- KOOTALLUR, B. N., THANGAVELU, C. P. & MANI, M. 2011. Bacterial identification in the diagnostic laboratory: how much is enough? *Indian J Med Microbiol*. India.
- KRAB, I. M. & PARMEGGIANI, A. 2002. Mechanisms of EF-Tu, a pioneer GTPase. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press.
- KRAWCZYK, B., LEWANDOWSKI, K. & KUR, J. 2002. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the *recA* sequences. *Mol Cell Probes*. England.
- KWOK, A. Y. & CHOW, A. W. 2003. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *Hsp60* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 87-92.
- KWOK, A. Y., WILSON, J. T., COULTHART, M., NG, L. K., MUTHARIA, L. & CHOW, A. W. 2002. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial *Hsp60* gene sequences. *Can J Microbiol*, 48, 903-10.
- LE FLECHE, P., JACQUES, I., GRAYON, M., AL DAHOUK, S., BOUCHON, P., DENOEUDE, F., NOCKLER, K., NEUBAUER, H., GUILLOTEAU, L. A. & VERGNAUD, G. 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol*. England.
- LEBOFFE, M. J. & PIERCE, B. E. 2012. *A photographic atlas for the microbiology laboratory*, Morton Publishing Company.
- LIGUORI, A. P., WARRINGTON, S. D., GINTHER, J. L., PEARSON, T., BOWERS, J., GLASS, M. B., MAYO, M., WUTHIEKANUN, V., ENGELTHALER, D., PEACOCK, S. J., CURRIE, B. J., WAGNER, D. M., KEIM, P. & TUANYOK, A. 2011. Diversity of 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Reveals Phylogenetic Relationships in *Burkholderia pseudomallei* and Its Near-Neighbors. *PLoS ONE*, 6, e29323.

- LIMSOWTIN, G. K. Y., BROOME, M. C. & POWELL, I. B. 2002. LACTIC ACID BACTERIA, TAXONOMY. In: ROGINSKI, H. (ed.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Oxford: Elsevier.
- LIU, K., ZHANG, Y., SEVERINOV, K., DAS, A. & HANNA, M. M. 1996. Role of Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit in modulation of pausing, termination and anti-termination by the transcription elongation factor NusA. *EMBO J*, 15, 150-61.
- MAHEUX, A. F., BERUBE, E., BOUDREAU, D. K., CANTIN, P., BOISSINOT, M., BISSONNETTE, L., RODRIGUE, L. & BERGERON, M. G. 2011. Ability of three DNA-based assays to identify presumptive Escherichia coli colonies isolated from water by the culture-based mFC agar method. *Water Res.* England.
- MAIDEN, M. C. 2000. High-throughput sequencing in the population analysis of bacterial pathogens of humans. *Int J Med Microbiol*, 290, 183-90.
- MAIDEN, M. C. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 60, 561-88.
- MAIDEN, M. C., SUKER, J., MCKENNA, A. J., BYGRAVES, J. A. & FEAVERS, I. M. 1991. Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of Neisseria meningitidis. *Mol Microbiol*, 5, 727-36.
- MARTENS, M., DAWYNDT, P., COOPMAN, R., GILLIS, M., DE VOS, P. & WILLEMS, A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus Ensifer (including former Sinorhizobium). *Int J Syst Evol Microbiol*. England.
- MARTÍNEZ, J. R. 2004. Secuenciación de genomas. *Arbor: Ciencia, pensamiento y cultura*, 285-310.
- MAULE, J. C. 2001. Pulsed-field Gel Electrophoresis. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- MAYO, B., ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T., FERNÁNDEZ, M., KOWALCZYK, M., ÁLVAREZ-MARTÍN, P. & BARDOWSKI, J. 2010. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Wiley-Blackwell.

- MESAS, J. M., RODRÍGUEZ, M. & ALEGRE, M. 2006. Prs4: Un Vector de Clonación Idóneo Para Bacterias Ácidolácticas de Uso Alimentario. *Cienc Tecnol Aliment*, 5, 118-123
- MOLLET, C., DRANCOURT, M. & RAOULT, D. 1997. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol*, 26, 1005-11.
- MORA, D., RICCI, G., GUGLIELMETTI, S., DAFFONCHIO, D. & FORTINA, M. G. 2003. 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology*, 149, 807-13.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. United States.
- NASER, S. M., DAWYNDT, P., HOSTE, B., GEVERS, D., VANDEMEULEBROECKE, K., CLEENWERCK, I., VANCANNEYT, M. & SWINGS, J. 2007. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol*. England.
- NASER, S. M., THOMPSON, F. L., HOSTE, B., GEVERS, D., DAWYNDT, P., VANCANNEYT, M. & SWINGS, J. 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on rpoA and pheS genes. *Microbiology*. England.
- NELSON, A. & BRADLEY, L. Diagnóstico de Laboratorio: Técnicas Moleculares. *Focus on Field Epidemiology* [Online], 4. Available: http://cphp.sph.unc.edu/focus/vol4/issue4/4-4LabTechniques_espanol.pdf [Accessed Noviembre 2014].
- NG, H. J., WEBB, H. K., CRAWFORD, R. J., MALHERBE, F., BUTT, H., KNIGHT, R., MIKHAILOV, V. V. & IVANOVA, E. P. 2013. Updating the taxonomic toolbox: classification of *Alteromonas* spp. using multilocus phylogenetic analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, 265-275.
- OGUNTOYINBO, F. A. & NARBAD, A. 2012. Molecular characterization of lactic acid bacteria and in situ amylase expression during traditional fermentation of cereal foods. *Food Microbiol*. England.

- OH, P. L., BENSON, A. K., PETERSON, D. A., PATIL, P. B., MORIYAMA, E. N., ROOS, S. & WALTER, J. 2010. Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. *ISME J*. England.
- ORELLANA, O. 2002. Perspectivas de la secuenciación de genomas bacterianos: nuevas estrategias en el desarrollo de terapias antimicrobianas. *Revista chilena de infectología*, 19, S46-S49.
- OSORIO, C. R., COLLINS, M. D., ROMALDE, J. L. & TORANZO, A. E. 2005. Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions in *Photobacterium damsela*: a mosaic-like structure. *Appl Environ Microbiol*. United States.
- PACHECO, N., GARNICA-GONZALEZ, M., GIMENO, M., BARZANA, E., TROMBOTTO, S., DAVID, L. & SHIRAI, K. 2011. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules*, 12, 3285-90.
- PALYS, T., NAKAMURA, L. K. & COHAN, F. M. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 1145-56.
- PARADA, L. G., CRESPIÓN, G. D., MIRANDA, R. & KATIME, I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5, 16.
- PARK, H. K., YOON, J. W., SHIN, J. W., KIM, J. Y. & KIM, W. 2010. *rpoA* is a useful gene for identification and classification of *Streptococcus pneumoniae* from the closely related viridans group streptococci. *FEMS Microbiol Lett*. England.
- PAROLO, C. C., DO, T., HENSSGE, U., ALVES, L. S., DE SANTANA GIONGO, F. C., CORCAO, G., MALTZ, M. & BEIGHTON, D. 2011. Genetic diversity of *Lactobacillus paracasei* isolated from in situ human oral biofilms. *J Appl Microbiol*, 111, 105-13.
- PEETERS, K. & WILLEMS, A. 2011. The *gyrB* gene is a useful phylogenetic marker for exploring the diversity of *Flavobacterium* strains isolated from terrestrial and aquatic habitats in Antarctica. *FEMS Microbiol Lett*, 321, 130-40.

- PEI, A. Y., OBERDORF, W. E., NOSSA, C. W., AGARWAL, A., CHOKSHI, P., GERZ, E. A., JIN, Z., LEE, P., YANG, L., POLES, M., BROWN, S. M., SOTERO, S., DESANTIS, T., BRODIE, E., NELSON, K. & PEI, Z. 2010. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Appl Environ Microbiol.* United States.
- PICARD, F. J., KE, D., BOUDREAU, D. K., BOISSINOT, M., HULETSKY, A., RICHARD, D., OUELLETTE, M., ROY, P. H. & BERGERON, M. G. 2004. Use of tuf sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *J Clin Microbiol.* United States.
- PICOZZI, C., BONACINA, G., VIGENTINI, I. & FOSCHINO, R. 2010. Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *Microbiology.* England.
- PÍREZ, M. & MOTA, M. 2006. Temas de Bacteriología y Virología Médica: Morfología y Estructura Bacteriana. Universidad de la República Montevideo.
- POT, B., LUDWIG, W., KERSTERS, K. & SCHLEIFER, K.-H. 1994. Taxonomy of Lactic Acid Bacteria. In: DE VUYST, L. & VANDAMME, E. (eds.) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.* Springer US.
- PRUITT, K., BROWN, G., TATUSOVA, T. & MAGLOTT, D. 2002. The Reference Sequence (RefSeq) Database. *The NCBI Handbook*, 18.
- RACHMAN, C. N., KABADJOVA, P., PREVOST, H. & DOUSSET, X. 2003. Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminis* with 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. *J Appl Microbiol.* England.
- RAFTIS, E. J., SALVETTI, E., TORRIANI, S., FELIS, G. E. & O'TOOLE, P. W. 2011. Genomic diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Appl Environ Microbiol.* United States.
- RAMACHANDRAN, P., LACHER, D. W., PFEILER, E. A. & ELKINS, C. A. 2013. Development of a tiered multilocus sequence typing scheme for members of the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Appl Environ Microbiol.* United States.

- RAVI KUMAR, M. N. V. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- RODICIO MDEL, R. & MENDOZA MDEL, C. 2004. [Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Spain.
- RODRIGUEZ-VALERA, F. & GARCIA-MARTINEZ, J. 2000. Spacers online. *ASM News*, 66.
- ROMAN, F., ROLDAN, C., TRINCADO, P., BALLESTEROS, C., CARAZO, C. & VINDEL, A. 2013. Detection of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* with 23S rRNA and novel L4 riboprotein mutations in a cystic fibrosis patient in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. United States.
- ROY, D., WARD, P. & CHAMPAGNE, G. 1996. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*. Netherlands.
- RUÍZ, G. D. & RODARTE, C. W. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*.
- SALMINEN, S. & VON WRIGHT, A. 2004. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, CRC Press.
- SAMELIS, J., MAUROGENAKIS, F. & METAXOPOULOS, J. 1994. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int J Food Microbiol*. Netherlands.
- SANCHEZ, I., PALOP, L. & BALLESTEROS, C. 2000. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants. *Int J Food Microbiol*. Netherlands.
- SANGER, F. 1975. The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 191, 317-33.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.

- SARMIENTO-RUBIANO, L. A., BERGER, B., MOINE, D., ZUNIGA, M., PEREZ-MARTINEZ, G. & YEBRA, M. J. 2010. Characterization of a novel *Lactobacillus* species closely related to *Lactobacillus johnsonii* using a combination of molecular and comparative genomics methods. *BMC Genomics*. England.
- SAVIR, Y. & TLUSTY, T. 2010. RecA-mediated homology search as a nearly optimal signal detection system. *Mol Cell*. United States.
- SCHILLINGER, U. & LÜCKE, F.-K. 1987. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, 4, 199-208.
- SCHLEIFER, K.-H. 2009. Phylum XIII.Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] Gibbons and Murray 1978, 5). In: DE VOS, P., GARRITY, G., JONES, D., KRIEG, N., LUDWIG, W., RAINEY, F., SCHLEIFER, K.-H. & WHITMAN, W. (eds.) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Springer New York.
- SCHWARTZ, D. C. & CANTOR, C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. United States.
- SHARPE, M. E., FRYER, T. F. & SMITH, D. G. 1979. Identification of the lactic acid bacteria. *Identification methods for microbiologists*, 14, 233-259.
- SHAW, B. G. & HARDING, C. D. 1984. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *J Appl Bacteriol*, 56, 25-40.
- SHEVTSOV, A. B., KUSHUGULOVA, A. R., TYNBYAEVA, I. K., KOZHAKHMETOV, S. S., ABZHALELOV, A. B., MOMYNALIEV, K. T. & STOYANOVA, L. G. 2011. Identification of phenotypically and genotypically related *Lactobacillus* strains based on nucleotide sequence analysis of the groEL, rpoB, rplB, and 16S rRNA genes. *Microbiology*, 80, 672-681.
- SHIRAI MATSUMOTO, C. K. 1999. *Utilización de desperdicios de camarón para recuperación de quitina, proteínas y pigmentos por vía microbiana*. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- SIEVERS, F., WILM, A., DINEEN, D., GIBSON, T. J., KARPLUS, K., LI, W., LOPEZ, R., MCWILLIAM, H., REMMERT, M., SODING, J., THOMPSON, J. D. & HIGGINS,

- D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*. England.
- SILVA, C. & VINUESA, P. 2007. Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: el caso de los Rizobios. *Eguiarte, LE, V. Souza y X. Aguirre (Comps.): Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 351-392.*
- SINI, T. K., SANTHOSH, S. & MATHEW, P. T. 2007. Study on the production of chitin and chitosan from shrimp shell by using *Bacillus subtilis* fermentation. *Carbohydr Res*, 342, 2423-9.
- SMITH, N. H., CRICHTON, P. B., OLD, D. C. & HIGGINS, C. F. 1988. Ribosomal-RNA patterns of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and related Enterobacteriaceae. *J Med Microbiol*, 26, 223-8.
- SONG, Y., KATO, N., LIU, C., MATSUMIYA, Y., KATO, H. & WATANABE, K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett*. Netherlands.
- STADEN, R. 1979. A strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic Acids Res*, 6, 2601-10.
- STALEY, J. T. 1997. Biodiversity: are microbial species threatened? *Curr Opin Biotechnol*, 8, 340-5.
- STRUS, M., CHMIELARCZYK, A., KOCHAN, P., ADAMSKI, P., CHELMICKI, Z., CHELMICKI, A., PALUCHA, A. & HECZKO, P. B. 2012. Studies on the effects of probiotic *Lactobacillus* mixture given orally on vaginal and rectal colonization and on parameters of vaginal health in women with intermediate vaginal flora. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. Ireland.

- SUDAGIDAN, M., YENIDUNYA, A. F. & GUNES, H. 2005. Identification of staphylococci by 16S internal transcribed spacer rRNA gene restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol*. England.
- SULTANA, F., KAWAMURA, Y., HOU, X. G., SHU, S. E. & EZAKI, T. 1998. Determination of 23S rRNA sequences from members of the genus *Streptococcus* and characterization of genetically distinct organisms previously identified as members of the *Streptococcus anginosus* group. *FEMS Microbiol Lett*. Netherlands.
- SVEC, P., DRAB, V. & SEDLACEK, I. 2005. Ribotyping of *Lactobacillus casei* group strains isolated from dairy products. *Folia Microbiol (Praha)*, 50, 223-8.
- TANGANURAT, W., QUINQUIS, B., LEELAWATCHARAMAS, V. & BOLOTIN, A. 2009. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables. *J Basic Microbiol*, 49, 377-85.
- TANIGAWA, K. & WATANABE, K. 2011. Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii*. *Microbiology*. England.
- TAYLOR, W. I. & ACHANZAR, D. 1972. Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae. *Appl Microbiol*, 24, 58-61.
- TERZAGHI, B. E. & SANDINE, W. E. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol*, 29, 807-13.
- TODAR, K. 2006. *Todar's online textbook of bacteriology: Nutrition and Growth of Bacteria*, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
- TORRIANI, S., FELIS, G. E. & DELLAGLIO, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol*, 67, 3450-4.
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K. & SWINGS, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, 60, 407-38.
- VERMIS, K., COENYE, T., MAHENTHIRALINGAM, E., NELIS, H. J. & VANDAMME, P. 2002. Evaluation of species-specific *recA*-based PCR tests for genomovar level

- identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *J Med Microbiol*, 51, 937-40.
- VINUESA, P. 2010. *Multilocus sequence analysis and bacterial species phylogeny estimation*, Caister Academic Press.
- VINUESA, P., ROJAS-JIMENEZ, K., CONTRERAS-MOREIRA, B., MAHNA, S. K., PRASAD, B. N., MOE, H., SELVARAJU, S. B., THIERFELDER, H. & WERNER, D. 2008. Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the asiatic continent. *Appl Environ Microbiol*. United States.
- WANG, L. T., LEE, F. L., TAI, C. J. & KASAI, H. 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Microbiol*. England.
- WAYNE, L. G. 1988. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 268, 433-4.
- WEIJLAND, A., HARMARK, K., COOL, R. H., ANBORGH, P. H. & PARMEGGIANI, A. 1992. Elongation factor Tu: a molecular switch in protein biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 6, 683-688.
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173, 697-703.
- WENG, F. Y., CHIOU, C. S., LIN, P. H. & YANG, S. S. 2009. Application of *recA* and *rpoB* sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species. *J Appl Microbiol*. England.
- WHATMORE, A. M., SHANKSTER, S. J., PERRETT, L. L., MURPHY, T. J., BREW, S. D., THIRLWALL, R. E., CUTLER, S. J. & MACMILLAN, A. P. 2006. Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*. United States.
- WIZEMANN, T., OLSEN, L. & CHOFFNES, E. R. 2013. *The Science and Applications of Microbial Genomics:: Workshop Summary*, National Academies Press.

- WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 51, 221-71.
- WOESE, C. R., KANDLER, O. & WHEELIS, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4576-9.
- XU, Y., GALLERT, C. & WINTER, J. 2008. Chitin purification from shrimp wastes by microbial deproteination and decalcification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79, 687-97.
- YAMAMOTO, S. & HARAYAMA, S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol*, 61, 1104-9.
- YANG, E. J. & CHANG, H. C. 2011. Construction and evaluation of shuttle vector, pGYC4alpha, based on pYC2 from *Lactobacillus sakei*. *Biotechnol Lett*, 33, 599-605.
- YILDIRIM, İ. H., YILDIRIM, S. C. & KOÇAK, N. 2011. Molecular methods for bacterial genotyping and analyzed gene regions. *Journal of Microbiology & Infectious Diseases*, 1.
- YOUNG, J. M., PARK, D. C., SHEARMAN, H. M. & FARGIER, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol*. Germany.
- ZEILSTRA-RYALLS, J., FAYET, O. & GEORGOPOULOS, C. 1991. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annu Rev Microbiol*, 45, 301-25.
- ZHONG, W., MILLSAP, K., BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H. & REID, G. 1998. Differentiation of *Lactobacillus* Species by Molecular Typing. *Appl Environ Microbiol*, 64, 2418-23.

14 ANEXOS

Secuencias obtenidas de los amplicones.

Secuencia 16S rRNA

1
Bact2 AGGGGAGGAGAAAGCGGGAAAGCGCCCGAAGCGGGGGAAACAGCGGAAACGAGGCAATACCGCAATACACCTGGACCGAAGGGCCGAGCGAAAGGAGG
Bact3 AGGGCGAGCGGAGAAACCGGGAAACCGCCCGAAGCGGGGGAAACAGCGGAAACGAGGCAATACCGCAATACACCTGGACCGAAGGGCCGAGCGAAAGGAGG
Bact4 AGGGGGAGGGGAGAAACCGGGAAACCGCCCGAAGCGGGGGAAACAGCGGAAACGAGGCAATACCGCAATACACCTGGACCGAAGGGCCGAGCGAAAGGAGG
Bact5 AGGGGGAGGGGAGAAACCGGGAAACCGCCCGAAGCGGGGGAAACAGCGGAAACGAGGCAATACCGCAATACACCTGGACCGAAGGGCCGAGCGAAAGGAGG
Bact6 AGGGCGAGCGGAGAAACCGGGAAACCGCCCGAAGCGGGGGAAACAGCGGAAACGAGGCAATACCGCAATACACCTGGACCGAAGGGCCGAGCGAAAGGAGG
Bact7 AGGGGAGGAGAAAGCGGGGAAAGCGCCCGAAGCGGGGGAAACAGCGGAAACGAGGCAATACCGCAATACACCTGGACCGAAGGGCCGAGCGAAAGGAGG

118
Bact2 GCGGGGAAAGCGGGAGCGCCGCGGGGAAAGAGAGAGGGGGAAAGGGCGAGCAAGGAGAGCGCGACCGAGAGGGGAAAGGGCCAGCGGGAGCGG
Bact3 GCGGGGAAAGCGGGAGCGCCGCGGGGAAAGAGAGAGGGGGAAAGGGCGAGCAAGGAGAGCGCGACCGAGAGGGGAAAGGGCCAGCGGGAGCGG
Bact4 GCGGGGAAAGCGGGAGCGCCGCGGGGAAAGAGAGAGGGGGAAAGGGCGAGCAAGGAGAGCGCGACCGAGAGGGGAAAGGGCCAGCGGGAGCGG
Bact5 GCGGGGAAAGCGGGAGCGCCGCGGGGAAAGAGAGAGGGGGAAAGGGCGAGCAAGGAGAGCGCGACCGAGAGGGGAAAGGGCCAGCGGGAGCGG
Bact6 GCGGGGAAAGCGGGAGCGCCGCGGGGAAAGAGAGAGGGGGAAAGGGCGAGCAAGGAGAGCGCGACCGAGAGGGGAAAGGGCCAGCGGGAGCGG
Bact7 GCGGGGAAAGCGGGAGCGCCGCGGGGAAAGAGAGAGGGGGAAAGGGCGAGCAAGGAGAGCGCGACCGAGAGGGGAAAGGGCCAGCGGGAGCGG

235
Bact2 GAAACGGCCCAAGCCAGGGGAGGAGCGAGGGGAAAGCCACAAAGGACCGAAGCGAGGGAGAACCGCGCGCGGAGAGAAAGAGGGCCGAAAGCGG
Bact3 GAAACGGCCCAAGCCAGGGGAGGAGCGAGGGGAAAGCCACAAAGGACCGAAGCGAGGGAGAACCGCGCGCGGAGAGAAAGAGGGCCGAAAGCGG
Bact4 GAAACGGCCCAAGCCAGGGGAGGAGCGAGGGGAAAGCCACAAAGGACCGAAGCGAGGGAGAACCGCGCGCGGAGAGAAAGAGGGCCGAAAGCGG
Bact5 GAAACGGCCCAAGCCAGGGGAGGAGCGAGGGGAAAGCCACAAAGGACCGAAGCGAGGGAGAACCGCGCGCGGAGAGAAAGAGGGCCGAAAGCGG
Bact6 GAAACGGCCCAAGCCAGGGGAGGAGCGAGGGGAAAGCCACAAAGGACCGAAGCGAGGGAGAACCGCGCGCGGAGAGAAAGAGGGCCGAAAGCGG
Bact7 GAAACGGCCCAAGCCAGGGGAGGAGCGAGGGGAAAGCCACAAAGGACCGAAGCGAGGGAGAACCGCGCGCGGAGAGAAAGAGGGCCGAAAGCGG

352
Bact2 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact3 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact4 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact5 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact6 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact7 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG

469
Bact2 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact3 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact4 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact5 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact6 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG
Bact7 AAAGAAAGAACAAAGAGAGAGAGCGCGGAGACCGAAAGCCAGAAAGCCAGGGCAAGACCGGCCAGCGCCGAAAGAGAGGGCCAGAGCGCGG

586
Bact2 AGCCAGCGAGAGCGGGAAGCGGAGAAAGAGGAGAAAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGG
Bact3 AGCCAGCGAGAGCGGGAAGCGGAGAAAGAGGAGAAAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGG
Bact4 AGCCAGCGAGAGCGGGAAGCGGAGAAAGAGGAGAAAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGG
Bact5 AGCCAGCGAGAGCGGGAAGCGGAGAAAGAGGAGAAAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGG
Bact6 AGCCAGCGAGAGCGGGAAGCGGAGAAAGAGGAGAAAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGG
Bact7 AGCCAGCGAGAGCGGGAAGCGGAGAAAGAGGAGAAAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGGAGAGAGCGG

703

Bact2
Bact3
Bact4
Bact5
Bact6
Bact7

820

Bact2
Bact3
Bact4
Bact5
Bact6
Bact7

937

Bact2
Bact3
Bact4
Bact5
Bact6
Bact7

1054

Bact2
Bact3
Bact4
Bact5
Bact6
Bact7

1171

Bact2
Bact3
Bact4
Bact5
Bact6
Bact7

1288

Bact2
Bact3
Bact4
Bact5
Bact6
Bact7

Secuencia del gen *pheS*

1

Bact1	AAGACACGTTCTATAATTACCAAGACCGTGGCTACTACGCAACGACAGCGCTGGCGATCAGCCGCGGTCACTTGGAAAAACACGATTTTTCTAAAGGAC
Bact2	-----TTTCTATAATTACCAAGACCGTGGCTACTACGCAACGACAGCGCTGGCGATCAGCCGCGGTCACTTGGAAAAACACGATTTTTCTAAAGGAC
Bact3	AAGACACGTTCTATAATTACCAAGACCGTGGCTACTACGCAACGACAGCGCTGGCGATCAGCCGCGGTCACTTGGAAAAACACGATTTTTCTAAAGGAC
Bact4	-----TTTATAATTACCAATGAGTTACTCATGGCGTGGCAGACAAAGTCCAATGCAGGGCGCGAACAAATGGAAAAACACGACITTTACCAAGGAC
Bact5	AAGACACGTTCTATAATTACCAAGACCGTGGCTACTACGCAACGACAGCGCTGGCGATCAGCCGCGGTCACTTGGAAAAACACGATTTTTCTAAAGGAC
Bact6	AAGACACGTTCTATAATTACCAAGACCGTGGCTACTACGCAACGACAGCGCTGGCGATCAGCCGCGGTCACTTGGAAAAACACGATTTTTCTAAAGGAC
Bact7	AGGATACGTTCTATAATTACCAAGGAAATTTTGTATGGGACGCAAGCCATCCAATGCAGGGCCCGGACGTTGGAAAAACATGACTTTAGTACCGGAC

97

Bact1	CGCTGAAGGCTGTGCACCGGGCCGCTTTATCGGGCGGATACGGATGATGCCAACCCATTCCCATCAATTTCAATCAAAATGAAGGGTTAGTCGTGG
Bact2	CGCAGAAGGCTGTGCACCGGGCCGCTTTATCGGGCGGATACGGATGATGCCAACCCATTCCCATCAATTTCAATCAAAATGAAGGGTTAGTCGTGG
Bact3	CGCTGAAGGCTGTGCACCGGGCCGCTTTATCGGGCGGATACGGATGATGCCAACCCATTCCCATCAATTTCAATCAAAATGAAGGGTTAGTCGTGG
Bact4	CGCTGAAAAAGATAGCCCGGGGGTGGTTTATCGACGTGATGACGACGATGCTACTCATAGCCATCAGTTTCACCAAGATGGAAAGGACTCGTCAATTG
Bact5	CGCTGAAAAAGATAGCCCGGGGGTGGTTTATCGACGTGATGACGACGATGCTACTCATAGCCATCAGTTTCACCAAGATGGAAAGGACTCGTCAATTG
Bact6	CGCTGAAGGCTGTGCACCGGGCCGCTTTATCGGGCGGATACGGATGATGCCAACCCATTCCCATCAATTTCAATCAAAATGAAGGGTTAGTCGTGG
Bact7	CAATGAAGAGATGCTGCCAGGCGTTGTCTATCGGGGAGATACGGATGATGCCAACCCATTCCCATCAATTTCAATCAGGCTGAAGGGTTAGTGTATTG

193

Bact1	ACAAGCAATTAACGATGGCTGATTTGAAGGGCACCTTAATTCGGTTGCCAAGACTTTGTTGGCGATCAATTCGATGTTGGGCTACGGCCAAGCT
Bact2	ACAAGCAATTAACGATGGCTGATTTGAAGGGCACCTTAATTCGGTTGCCAAGACTTTGTTGGCGATCAATTCGATGTTGGGCTACGGCCAAGCT
Bact3	ACAAGCAATTAACGATGGCTGATTTGAAGGGCACCTTAATTCGGTTGCCAAGACTTTGTTGGCGATCAATTCGATGTTGGGCTACGGCCAAGCT
Bact4	ACAAGCAATTAACCAAGGCTGATCTAAAGGGAACTTGTGGCCATGTTGCCAACACGTTGTTGGTAAAGATCGGACAAATCGCTTGGGGCCAAGTT
Bact5	ACAAGCAATTAACCAAGGCTGATCTAAAGGGAACTTGTGGCCATGTTGCCAACACGTTGTTGGTAAAGATCGGACAAATCGCTTGGGGCCAAGTT
Bact6	ACAAGCAATTAACGATGGCTGATTTGAAGGGCACCTTAATTCGGTTGCCAAGACTTTGTTGGCGATCAATTCGATGTTGGGCTACGGCCAAGCT
Bact7	ATAAGCAATTAACGATGGCTGATTTAAAGGGAACTTCCAGGCTTTGGCCACGAACTAETTTGGTGAATAGATTTGACGTTGGGTTACGGCCAAGCT

289

Bact1	TCTTTCCATTACGGAAACCATCCGTAGAAGCTGATGTAACCTGGCTTAAATGGCAATGGCAAGGGCTGTGCAATCTGTAAAGCAAACGGGTGGGATCG
Bact2	TCTTTCCATTACGGAAACCATCCGTAGAAGCTGATGTAACCTGGCTTAAATGGCAATGGCAAGGGCTGTGCAATCTGTAAAGCAAACGGGTGGGATCG
Bact3	TCTTTCCATTACGGAAACCATCCGTAGAAGCTGATGTAACCTGGCTTAAATGGCAATGGCAAGGGCTGTGCAATCTGTAAAGCAAACGGGTGGGATCG
Bact4	ATTTTCCATTACGGAGCCATCCGTGGAAGTTGATGTTCCCTGTTTGGTTGGCGGGTAAAGGTTGCCCGGTTTGGCAAAATATCCGGTTGGGATCG
Bact5	ATTTTCCATTACGGAGCCATCCGTGGAAGTTGATGTTCCCTGTTTGGTTGGCGGGTAAAGGTTGCCCGGTTTGGCAAAATATCCGGTTGGGATCG
Bact6	TCTTTCCATTACGGAAACCATCCGTAGAAGCTGATGTAACCTGGCTTAAATGGCAATGGCAAGGGCTGTGCAATCTGTAAAGCAAACGGGTGGGATCG
Bact7	ATTTTCCATTACGGAGCCCTTCTGTGGAAACCGATATACCTGCTTAAATGGTGGTGGAAAGGGTGTAAACGTTTGCAAAAACACTGGTTGGGATCG

385

Bact1	AAGTACT
Bact2	AAGTACT
Bact3	AAGTACT
Bact4	AAGTACT
Bact5	AAGTACT
Bact6	AAGTACT
Bact7	AAGTACT

Secuencia obtenida del gen Hsp60

4

Bact1 GAAGGATGAAGAACGTTACGGCCGGTGTAAACCGTGGCATTCCGTCGGGGATTGAAGAAGCTACTAAGACGGCCGGTTGACTCAATACACGCT
 Bact2 GAAGGATGAAGAACGTTACGGCCGGTGTAAACCGTGGCATTCCGTCGGGGATTGAAGAAGCTACTAAGACGGCCGGTTGACTCAATACACGCT
 Bact3 GAAGGATGAAGAACGTTACGGCCGGTGTAAACCGTGGCATTCCGTCGGGGATTGAAGAAGCTACTAAGACGGCCGGTTGACTCAATACACGCT
 Bact4 GAAGGCATGAAGAACGTTACGGCCGGTGTAAACCGTGGCATTCCGTCGGGGATTGAAAAGGCAACTAAGGCTGCCCTTGACGAAATGCACAAG
 Bact5 GAAGGATGAAGAACGTTACGGCCGGTGTAAACCGTGGCATTCCGTCGGGGATTGAAAAGCAACTAAGGCTGCCCTTGACGAAATGCACAAG
 Bact6 GAAGGATGAAGAACGTTACGGCCGGTGTAAACCGTGGCATTCCGTCGGGGATTGAAAAGCTACTAAGACGGCCGGTTGACTCAATACACGCT
 Bact7 GAAGGCATGAAGAACGTTACGGCCGGTGTAAACCGTGGGAAATCCGTCGGGGATTGAAAAGGCGACTGGCCCGCTGTGANGCTTGCACAAG

97

Bact1 AAGGCACCGAAGTTAAGACGCAAGAAGATAATGGGCAAAATCGCTTCGTGTAATCTCAGCAAGTGAAGAAAATGGTAAAATTGATGGCGAAGGCCATG
 Bact2 AAGGCACCGAAGTTAAGACGCAAGAAGATAATGGGCAAAATCGCTTCGTGTAATCTCAGCAAGTGAAGAAAATGGTAAAATTGATGGCGAAGGCCATG
 Bact3 AAGGCACCGAAGTTAAGACGCAAGAAGATAATGGGCAAAATCGCTTCGTGTAATCTCAGCAAGTGAAGAAAATGGTAAAATTGATGGCGAAGGCCATG
 Bact4 AATAGCCACAAAGTTAAGGTAAGAAAAGAAAATCGGCGAGGTTGCCCTCCGTTCTCCGCAAAATACAGAAGTTGGTAGCTCTGATGGTGAAGGCCATG
 Bact5 AATAGCCACAAAGTTAAGGTAAGAAAAGAAAATCGGCGAGGTTGCCCTCCGTTCTCCGCAAAATACAGAAGTTGGTAGCTCTGATGGTGAAGGCCATG
 Bact6 AAGGCACCGAAGTTAAGACGCAAGAAGATAATGGGCAAAATCGCTTCGTGTAATCTCAGCAAGTGAAGAAAATGGTAAAATTGATGGCGAAGGCCATG
 Bact7 AAGTCTCATGACCTAAGACTAAAAGATGACATGCCCCAGATGCTTCCATCTCTCAGCAAGTAAAAGAAAATGGTAAATTAAATTGGGACGCCATG

193

Bact1 GAAAAAGTTGGTCAAGACGGTGTATCACGATGAAGAAATCACGTTGGTGTGATAGTAGCTTAGACCTGTGAAAGGGATGCAAATGACCCGGCC
 Bact2 GAAAAAGTTGGTCAAGACGGTGTATCACGATGAAGAAATCACGTTGGTGTGATAGTAGCTTAGACCTGTGAAAGGGATGCAAATGACCCGGCC
 Bact3 GAAAAAGTTGGTCAAGACGGTGTATCACGATGAAGAAATCACGTTGGTGTGATAGTAGCTTAGACCTGTGAAAGGGATGCAAATGACCCGGCC
 Bact4 GAAAAAGTTGGCCACGATGGTGTGATACCATGAAGAAAAGCAAAAGGGATGACACTGAAGCTCTCCGTTGTGAAAGGGATGCAGTTGATCGGGC
 Bact5 GAAAAAGTTGGCCACGATGGTGTGATACCATGAAGAAAAGCAAAAGGGATGACACTGAAGCTCTCCGTTGTGAAAGGGATGCAGTTGATCGGGC
 Bact6 GAAAAAGTTGGTCAAGACGGTGTATCACGATGAAGAAATCACGTTGGTGTGATAGTAGCTTAGACCTGTGAAAGGGATGCAAATGACCCGGCC
 Bact7 GAAAAAGTTGGTCAAGACGGTGTATCACCATGAAGAAATCCCCGTTGGGGTGTGATAGGAGCTTAGACCTGTGAAAGGGATGCAAATGACCCGGTGG

289

Bact1 TACTATCACAAATACATGGTTACTGATAAATGATAAGATGGAAGCGGATCTTGACAATCCATATACTTAAATACTGATAAGAAGATTCAAAACAT
 Bact2 TACTATCACAAATACATGGTTACTGATAAATGATAAGATGGAAGCGGATCTTGACAATCCATATACTTAAATACTGATAAGAAGATTCAAAACAT
 Bact3 TACTATCACAAATACATGGTTACTGATAAATGATAAGATGGAAGCGGATCTTGACAATCCATATACTTAAATACTGATAAGAAGATTCAAAACAT
 Bact4 TACTGAGGCCAATACATGGTTACCGATAAATGATAAGATGGAAGCTGACCTTGACGATCCATATACTTGAATCACCAGCAAAAAAGATTCCAAATAT
 Bact5 TACTGAGGCCAATACATGGTTACCGATAAATGATAAGATGGAAGCTGACCTTGACGATCCATATACTTGAATCACCAGCAAAAAAGATTCCAAATAT
 Bact6 TACTATCACAAATACATGGTTACTGATAAATGATAAGATGGAAGCGGATCTTGACAATCCATATACTTAAATACTGATAAGAAGATTCAAAACAT
 Bact7 TAGATCTCACAAATACATGGTCAAGGATAAATGATAAGATGGAAGCAAACTCTGACAATCCATATACTTAAATGACAGACAAGAAGATGCCCAGATC

385

Bact1 CAAGATATCTTACCAGATTAACAATCCATCGTTGAACAAGGCAAGCCATGTGATCAATGCTGATGACATTTCTGGTGAAGCTTTACCAACCTTAGTCTTGAACAAGATGC
 Bact2 CAAGATATCTTACCAGATTAACAATCCATCGTTGAACAAGGCAAGCCATGTGATCAATGCTGATGACATTTCTGGTGAAGCTTTACCAACCTTAGTCTTGAACAAGATGC
 Bact3 CAAGATATCTTACCAGATTAACAATCCATCGTTGAACAAGGCAAGCCATGTGATCAATGCTGATGACATTTCTGGTGAAGCTTTACCAACCTTAGTCTTGAACAAGATGC
 Bact4 CAGGACATTTTCCCGCTGTACAAGAAAATCGTTCAACAAGGTAAGGCCATGTGATCAATGCTGACGACGTTGCTGGTGAAGCAATGCAACCTTAGTCTTGAACAAGATGC
 Bact5 CAGGACATTTTCCCGCTGTACAAGAAAATCGTTCAACAAGGTAAGGCCATGTGATCAATGCTGACGACGTTGCTGGTGAAGCAATGCAACCTTAGTCTTGAACAAGATGC
 Bact6 CAAGATATCTTACCAGATTAACAATCCATCGTTGAACAAGGCAAGCCATGTGATCAATGCTGATGACATTTCTGGTGAAGCTTTACCAACCTTAGTCTTGAACAAGATGC
 Bact7 CAAGACATCTTCCATGTGTGAAATCAGTTGTTGAACAAGGCGGTTCACTCTTAAATCAATCGCTGANGATAACAGGGTGAAGCTTTGCAACCTTGTCTTGAACAAGATGC

Secuencia obtenida del gen tuF

