

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZAN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
EAP: MEDICINA VETERINARIA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DETERMINACIÓN DEL
CARÁCTER PROBIÓTICO DE *Lactobacillus spp.*, AISLADO DE LA
MICROBIOTA GASTROINTESTINAL DEL LECHÓN DESTETADO.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE

MEDICO VETERINARIO

PRESENTADO POR:

LOURDES VASQUEZ ROJAS

HUANUCO – PERÚ

2016

DEDICATORIA

A mis padres por su ejemplo de seguir adelante a pesar de las adversidades.

AGRADECIMIENTO

A Dios.

A mis padres por su apoyo incondicional.

A mi hermano Erasmo y hermanas Flor, Gladys, Rosa, por su apoyo permanente.

Al Dr. Fredy Fabián Domínguez, asesor científico de tesis, por su apoyo constante y motivación en el proyecto.

Al Dr. Práxedes Cubas Bazán asesor de tesis, por el empeño en su labor profesional.

A Eric Mialhe gerente general de la empresa INCABIOTEC por confiar en los jóvenes y darnos la oportunidad de seguir superándonos.

A Juan, Yhoana, Cesar, Pedro, Petter , Rodrigo y Hermelinda técnicos de la empresa INCABIOTEC por su paciencia y amabilidad en la enseñanza del manejo de equipos del laboratorio.

Al Dr. José Vargas García por sus palabras de motivación y la vez un buen amigo.

A los docentes de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNHEVAL, que trabajan por vocación y por generar profesionales con valores humanos.

A Pedro Martel Acosta, bibliotecario de la facultad de Medicina Veterinaria – UNHEVAL por sus palabras y consejos de motivación.

A Vanessa Baylon Cuba por el apoyo en el proyecto.

A Victor, Melisa y Milli estudiantes de la Facultad de medicina veterinaria de la Universidad Nacional de Tumbes.

A mi primo Anthony y amigo Irwin por el apoyo a pesar del tiempo y la distancia.

ÍNDICE

RESUMEN.....	v
SUMMARY	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	
a. Aplicación de probióticos en lechones destetados.....	2
b. Modos de acción de bacterias <i>Lactobacillus spp.</i>	3
i. Resistencia a pH ácido.....	3
ii. Resistencia a bilis.....	3
iii. Adhesión a células epiteliales intestinales.....	4
iv. Efectos bactericidas.....	4
v. Antioxidación e inmunomodulación.....	5
c. Conceptos fundamentales.	
i. Microbiota intestinal.....	5
ii. PCR.....	6
iii. Electroforesis.....	7
iv. Secuenciación de ADN.....	8
d. Definición de términos básicos.....	10
III. MARCO METODOLOGICO	
a. Lugar de ejecución.....	13
b. Materiales.....	13
c. Metodología.....	15
IV. RESULTADOS.....	22
V. DISCUSION.....	29
VI. CONCLUSIONES.....	31
VII. RECOMENDACIONES.....	32
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	33

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER
PROBIÓTICO DE *Lactobacillus spp.*, AISLADO DE LA MICROBIOTA
GASTROINTESTINAL DEL LECHÓN DESTETADO.**

VASQUEZ ROJAS, Lourdes

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue caracterizar molecularmente y determinar el carácter probiótico de *Lactobacillus spp.*, aislado de la microbiota gastrointestinal del lechón destetado. Nuestra metodología fue el aislamiento bacteriano en medio líquido MRS y para la purificación de cepas bacterianas se realizó en medio sólido MRS y por tinción diferencial Gram, luego se realizó la extracción de ADN genómico bacteriano, posteriormente la amplificación gen 16S ARNr mediante la técnica de PCR, los productos de la PCR fueron enviados a secuenciar a un servidor Macrogen, luego las secuencias fueron analizadas comparativamente con las bases de secuencias de Gene Bank (National Center for Biotechnology Information) usando el algoritmo BLAST. Nuestros resultados, mostraron varias cepas bacterianas ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente, proveniente del estómago (4), intestino delgado (4), intestino grueso (11), conduciendo a un cepario de siete cepas. Ensayos *in vitro* mostraron que *Weissella sp*, *Pediococcus pentosaceus* y *Enterococcus hirae* poseen una actividad antagónica contra *Salmonella typhimurium* patogénica. Por lo que las bacterias benéficas nativas identificadas molecularmente tienen carácter probióticos y pueden ser usados como una alternativa para reemplazar los antibióticos en la dieta de los animales.

Palabras clave: *Sus scrofa*, PCR, gen 16S ARNr, genómica, *Lactobacillus*.

**MOLECULAR CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF CHARACTER
PROBIOTIC *Lactobacillus* spp., ISOLATED MICROBIOTA SUCKER
GASTROINTESTINAL WEANED.**

VASQUEZ ROJAS, Lourdes

SUMMARY

*The aim of the research was to characterize molecularly and determine the character of probiotic *Lactobacillus* spp., Isolated from gastrointestinal microbiota of piglets weaned. Our methodology was bacterial isolation in MRS liquid medium and for the purification of bacterial strains was performed on solid MRS medium and differential staining Gram, then extracting bacterial genomic DNA amplification 16S rRNA gene was performed subsequently by PCR the PCR products were sent to sequencing to Macrogen server, then the sequences were analyzed comparatively with bases Gene Bank sequences (National Center for Biotechnology Information) using the BLAST algorithm. Our results showed several lactic acid bacteria strains isolated and identified molecularly, from the stomach (4), small intestine (4), large intestine (11), leading to a culture collection seven strains. In vitro tests showed that *Weissella* sp, *Pediococcus pentosaceus* and *Enterococcus hirae* have an antagonistic activity against pathogenic *Salmonella typhimurium*. So the native beneficial bacteria probiotics identified molecularly have character and can be used as an alternative to replace antibiotics in animal diets.*

*Keywords: *Sus scrofa*, PCR, 16S rRNA gene, genomic, *Lactobacillus**

I. INTRODUCCIÓN

El consumo per cápita de la carne porcina en el Perú es 5.5 kg según el IV censo agropecuario en el 2012. Para mejorar la eficiencia económica en la producción porcina se usan indiscriminadamente antibióticos, como promotores de crecimiento, en forma de aditivos en pienso para los animales, (Thacker 2013) y (Marshall and Levy, 2011). Sin embargo, el uso excesivo de antibiótico se ha convertido en un problema de salud pública, tanto para la producción animal como para el consumidor. En efecto, el uso continuo de antibiótico es el responsable de residuos en productos cárnicos con el consecuente riesgo de aumentar la resistencia en bacterias patógenas de importancia en la salud humana y animal (Vander Fels-Klerx *et al.* 2011).

Una alternativa para reducir o eliminar el uso de antibióticos, corresponde a la administración, en la dieta, de bacterias nativas benéficas que pueden formar una barrera protectora en la mucosa intestinal evitando los procesos de infección por patógenos oportunistas, incrementando las defensas y mejorando los procesos metabólicos. Todo ello tiene repercusión positiva en la salud digestiva, inmunológica y en la prevención de enfermedades.

Los probióticos son una alternativa para los antimicrobianos (Mack D.R *et al.*; 1999), en la actualidad se conocen más de 20 géneros de microorganismos probióticos (Barbosa *et al.*, 2004). Los probióticos administrados en una determinada cantidad proporcionan beneficios al hospedero (FAO and WHO, 2002)) y (Briizuela, 2003).

Las bacterias del género *Lactobacillus spp.*, son las más estudiadas, pero actualmente muchos otros géneros tienen importancia principalmente, *Bifidobacterium spp.*, *Lactococcus spp.*, *Lactosphaera spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Melissococcus spp.*, *Oenococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, y *Enterococcus spp.*, (Carr F, Chill and Maida, 2002).

En este contexto, el objetivo del presente estudio ha sido, aislar y caracterizar molecularmente bacterias ácido lácticas del tracto gastrointestinal del lechón y

evaluar las cepas aisladas *in vitro* como antagonistas de una cepa de *Salmonella typhimurium* patogénica.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Aplicación de probiótico en lechones destetados

Durante el destete, los lechones se enfrentan a un considerable estrés psicológico inducido por los cambios en la alimentación y el medio ambiente. Los probióticos pueden aliviar el estrés del destete, prevenir la diarrea y promover el crecimiento de los lechones durante y después del destete (Ross *et al.* 2010).

Además de mejorar la microbiota intestinal de los lechones, la inclusión de *Enterococcus faecium* mejoró significativamente el crecimiento y conversión del pienso de los porcinos destetados (Malloa, Riopérez and Honrubia, 2010).

Un consorcio de probióticos formado por *E. faecium*, *L. acidophilus*, *P. pentosaceus* y *L. plantarum*, resultó en aumento del consumo de alimento, ganancia de peso y mejora la conversión alimenticia (Giang *et al.* 2010). Se ha demostrado que *L. fermentum* I5007 coloniza y tiene capacidad de adherirse al epitelio del tracto gastrointestinal formando una membrana protectora contra microbios patógenos mientras que al mismo tiempo la modulación de la inmunidad junto con la promoción de la expresión de MUC2 y MUC3. Además, *L. fermentum* I5007 exhibió efectos adicionales en aliviar el estrés del destete mediante la mejora de los niveles de las proteínas implicadas en el metabolismo energético, lípidos, estructura celular, movilidad, síntesis de proteínas y respuesta inmune (Wang *et al.* 2012). mejorando el sistema de defensa anti-oxidativo (Wang *et al.* 2013). Lo que facilita la proliferación celular y apoptosis.

2.2. Modos de acción de bacterias *Lactobacillus* sp.

2.2.1. Resistencia a pH ácido.

Las bacterias probióticas deben alcanzar el sitio donde desarrollan su acción benéfica en condiciones y concentraciones adecuadas, por lo que es necesario que sean capaces de sobrevivir a las barreras del tránsito gastrointestinal. (Rondón *et al.* 2008). Los probióticos más utilizados son cepas de bacterias ácido lácticas tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que son conocidos por soportar el ácido gástrico, sales biliares y las secreciones pancreáticas para adherirse a la mucosa del colón y fácilmente colonizar el tracto intestinal (Fioramonti, Theodorou and Bueno, 2003). El pH óptimo de crecimiento es de 5.5 y 6.2. Sin embargo la mayoría de cepas puede sobrevivir a pH 4.0 y 4.5, en medios donde otras bacterias no resistirían la actividad producida por los ácidos orgánicos. (Carr, Chill and Maida, 2002). Por ejemplo, *Lactobacillus reuteri* I5007, inicialmente conocido como *L. fermentum* I5007, fue seleccionado entre más de 7000 colonias de *Lactobacillus* nativos de acuerdo a criterios como la tolerancia al calor, pH bajo y sales biliares, así como la estabilidad de almacenamiento y el antagonismo a los agentes patógenos (Huang *et al.* 2004). Las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* mostraron una tolerancia moderada a pH ácido durante 1.5 horas de incubación (Charteris, Kelly and Collis, 1998). Estudios anteriores han señalado que la resistencia a los ácidos parecía estar mediado por enzimas tipo ATPasa de membrana como se describe para *L. acidophilus* (Lorca and Valdez, 2001).

2.2.2. Resistencia a bilis

Las sales biliares representan una importante barrera antibacteriana afectando el establecimiento de bacterias probióticas, por lo que se considera como requisito para la selección de bacterias probióticas resistir y tener la capacidad de crecimiento en contacto con sales biliares. Para el estudio de esta característica se han desarrollado varias investigaciones, utilizando varias concentraciones de bilis desde 0.1 al 4 % (Gómez *et al.* 1998) (Kociubinski, Pérez and De Antony, 1999).

2.2.3. Adhesión a células epiteliales intestinales.

La adhesión de una cepa probiótica al TGI es importante para la colonización bacteriana, la exclusión de patógenos y la interacción con las células huésped para la protección de las células epiteliales o la modulación inmune (Lebeer, Vanderleyden and De Keersmaecker, 2008). *L. reuteri* I5007 mostró una fuerte adhesión a la mucosa intestinal porcina y varias líneas celulares tales como las células Caco-2, células IPEC-J2 (Li *et al.* 2008). Otras cepas BAL (bacterias ácido lácticas) también tienen la capacidad de adherirse a moco y a las células epiteliales intestinales (Wang *et al.* 2008). Los mecanismos de adhesión a la superficie del epitelio implica la interacción de unión y de carga, así como un receptor específico - hidrófobo. BAL expresa hidrofobicidad celular y la adhesión al xileno (Wadstrom *et al.* 1987) esto puede facilitar la adhesión a moco. Además, las proteínas de superficie celular han demostrado mediar en la adhesión de moco por varios BAL (Kirjavainen *et al.* 1998). Curiosamente, BAL no mostró especificidad de huésped en la adhesión al moco intestinal, pero difería entre los distintos compartimentos del TGI (Rinkinen *et al.* 2003).

2.2.4. Efectos bactericidas

Una de las acciones más importantes de las bacterias ácido lácticas es su actividad antimicrobiana a través de la inhibición a la adhesión de bacterias patógenas (Havenaar, Bart and Jos, 1992). El ácido láctico producido por BAL contribuye a un ambiente ácido en el tracto gastrointestinal que influye en parte el crecimiento de microorganismos patógenos. BAL comúnmente produce bacteriocinas que son péptidos con actividad bactericida por lo general contra las cepas de especies estrechamente relacionadas y pueden inhibir el crecimiento o la adhesión de las bacterias dañinas. Una proteína secretada de *L. acidophilus* para inhibir el patógeno gástrico *Helicobacter pylori* (Lorca and Valdez, 2001). También se reportó que *L. fermentum* I5007 tiene una fuerte competitividad frente a *E. coli* K88 y *Salmonella typhimurium* y podría adherirse a las células Caco-2 y la mucosa intestinal porcina (Li *et al.* 2008). BAL puede inhibir las bacterias patógenas compitiendo por los nutrientes en el intestino o para los sitios sobre el epitelio intestinal (Malago, Jos and Konink, 2011). Como la mayoría de los patógenos intestinales deben adherirse al epitelio intestinal para colonizar en el intestino y producir enfermedades (Walker, 2000).

Otro mecanismo para inhibir patógenos en el intestino es a través de aumentar la producción de mucinas intestinales que pueden proteger las células epiteliales al funcionar como una barrera fisicoquímica, *L. plantarum* 299 ha demostrado aumentar la expresión de ARNm de MUC2 y MUC3 en las células intestinales HT29 y esto condujo a la inhibición de la adhesión de enteropatógenas de *E. coli* (Mack *et al.* 1999).

2.2.5. Antioxidación e inmunomodulación

Algunas cepas de probióticos producen antioxidantes e influyen en el sistema inmune. Es sabido que el daño oxidativo forma parte de la patogénesis de muchas enfermedades crónicas. *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 y *L. acidophilus* ATCC 4356 inhibieron la peroxidación del ácido linoleico y radicales libres.

Lactobacillus fermentum I5007 también demostró la capacidad de eliminar los radicales libres *in vitro* (Wang *et al.* 2009). BAL proporciona una defensa mediante la inducción de citoquinas anti-inflamatorias y la reducción de citoquinas proinflamatorias de las células epiteliales intestinales (Matsuguchi *et al.* 2003).

Además, *L. casei* indujo la producción de la citoquina proinflamatoria IL-12 con la subsiguiente producción de IFN- γ en los esplenocitos murinos. Las propiedades de inmunomodulación parecen ser dependiente de la cepa (Kato, Tanaka and Yokokura, 1999).

2.3. Conceptos fundamentales

2.3.1. microbiota intestinal:

Se denomina microbiota intestinal al conjunto de bacterias que viven en el intestino, en una relación de simbiosis tanto de tipo comensal como de mutualismo. Este conjunto forma parte de la microbiota normal. La gran mayoría de estas bacterias no son dañinas para la salud y muchas son beneficiosas. Se calcula que el ser humano tiene en su interior unas 2000 especies bacterianas diferentes de las cuales solamente 100 pueden llegar a ser perjudiciales (McFall, 2007). La importancia de la microbiota intestinal de los animales es ampliamente reconocida por su papel fundamental en la salud y en el bienestar de los animales. La diversidad genética de la microbiota contribuye al

desarrollo general y necesidad metabólica y provee al hospedero con muchas funciones benéficas incluyendo la producción de ácidos grasos volátiles, vitamina K, digestión de celulosa y desarrollo del sistema inmunitario (Kim and Isaacson, 2015).

Cambios en la flora intestinal puede tener efectos nocivos a la salud . La utilización de antibióticos de amplio espectro es una de las razones por la cual la población de bacterias puede disminuir. Por el contrario, el uso de probióticos estimula el crecimiento de la microbiota intestinal gracias a que mejora las condiciones del microambiente bacteriano y se ha demostrado que son útiles para la prevención y el tratamiento de diarrea infecciosa aguda en lactantes (Peña, 2015).

2.3.2. Reacción de Cadena Polimerasa- PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células, se utiliza para la reacción sustrato de ADN genómico .

Los elementos importantes en la reacción son el ADN molde, enzima Taq polimerasa, oligonucleótidos o primers, desoxirribonucleotidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), ion magnesio (Mg^{+2}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O ultra pura. Todos lo elementos interactúan en las tres etapas principales de los que compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (ver figura 1). El equipo donde se realiza la reacción es el termociclador, el cual esta diseñado para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y el tiempo necesario no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en gel de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

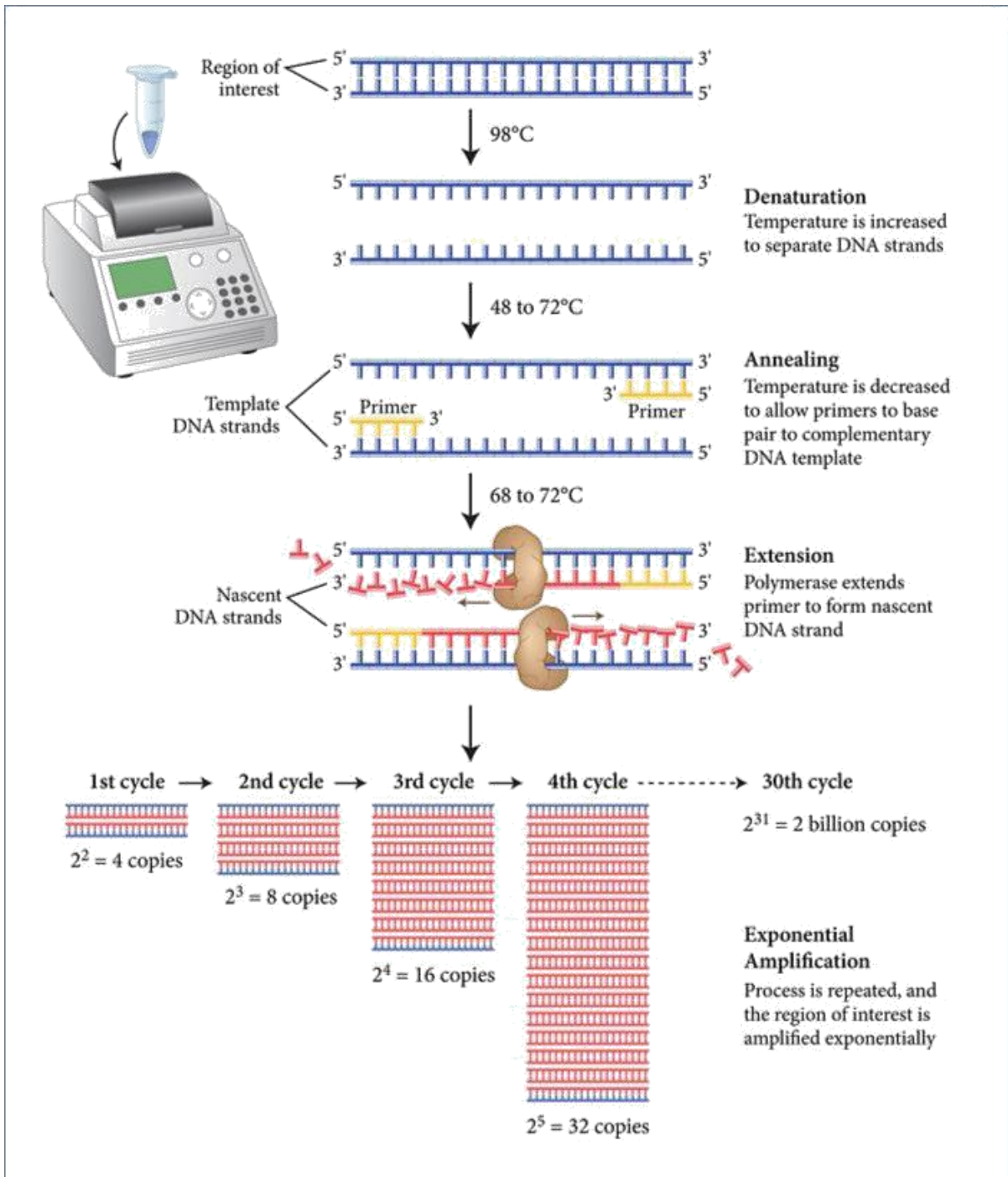


Fig.1. Proceso de la PCR

2.3.3. Electroforesis

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de ADN que no puedan separarse adecuadamente con otros procedimientos. Por otra parte, el ADN puede localizarse en un gel teñido con una concentración baja de bromuro de etidio, que es un agente intercalante fluorescente que se utiliza como colorante (Sambrook and David, 2001).

2.3.4. Secuenciación del ADN

Es el método enzimático o Sanger los fragmento de ADN se sintetizan por ADN polimerasa, las cuales incorporan monómeros desoxinucleótidos dentro de copias complementarias de una cadena de ADN molde. Una pequeña pieza sintética generalmente de ADN (un primer oligonucleótido) es usada para iniciar la síntesis de la nueva cadena de ADN a partir del ADN molde en una sola localización específica. Las cuatro reacciones separadas conteniendo cada uno de los cuatro didesoxinucleótido análogos. Estos análogos carecen de una funcionalidad química que es fundamental para su posterior elongación de la cadena, pero que no interfiere excesivamente con su incorporación de un análogo dentro de la creciente cadena en lugar del nucleótido normal (Fig 2). (Adams, Field and Craig, 2009). Veamos un ejemplo la cadena molde de ADN a ser secuenciado (azul) se hibrida con el cebador de desoxirribonucleótidos (negro), el cebador es alargado, en este ejemplo, ddGTP (amarillo) está presente, debido a bajas concentraciones de ddGTP, su incorporación y terminación de la cadena posterior se produce a una determinada posición de la secuencia 1% de los casos las principales cadenas truncadas. (B) Para la secuencia completa de la cadena molde de ADN, se llevan a cabo cuatro reacciones, cada una con un ddNTP diferentes. El ddNTP pone fin a la cadena truncada se pueden identificar para cada ddNTP está marcado con moléculas fluorescentes de diferentes colores (indicados por el color resaltado).

(C) una máquina de secuenciación automática de fragmentos truncados se someten a electroforesis y el orden de aparición para cada color de la fluorescencia se registra como se muestra (Lodish, 1999) (Fig 2).

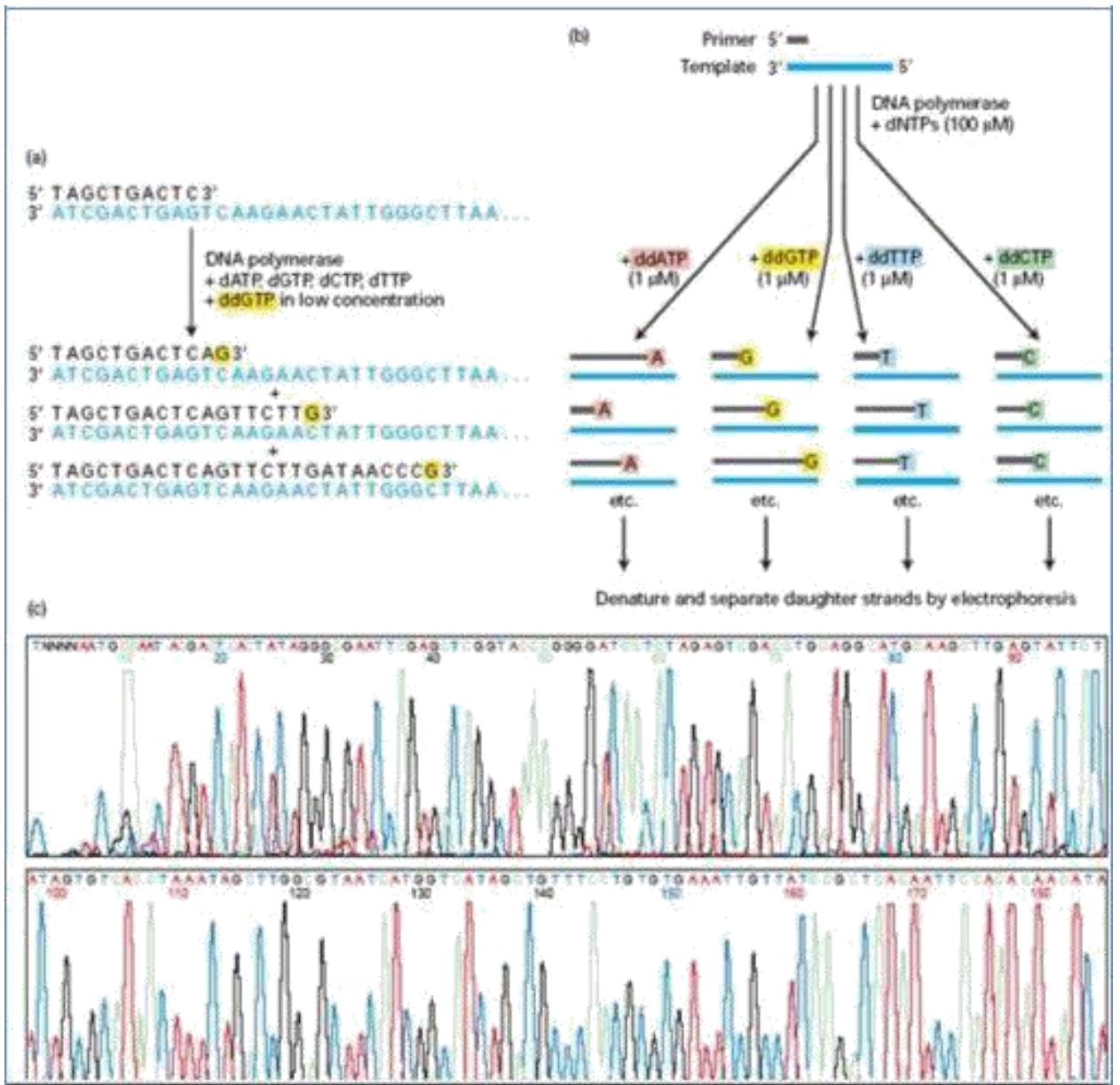


Fig .2. Ejemplo de secuenciación método Sanger.

La secuencia de ADN constituye la información genética heredable que forman la base de los programas de desarrollo de los seres vivos (procariotas, eucariotas en el núcleo celular y en los plásmidos en la mitocondria y en cloroplastos de las plantas). Durante treinta años la mayor parte de la secuenciación de ADN se llevó a cabo con el método de terminación de la cadena desarrollado por Frederick Sanger y colaboradores, en 1975, (Sanger and Coulson, 1975).

2.4. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

EDTA

Ethylen diamino ácido tetra acetico (EDTA) es un quelante de iones metálicos que tienen aplicación generalizada aplicada en farmacia y medicina moderna (Karpinski, Rieders y Girsh, 1953)

ARNasa

Es una enzima nucleasa que cataliza la hidrólisis del ARN en componentes más pequeños. Pueden dividirse en endonucleasas y exonucleasas y comprenden varias subclases dentro de las clases de enzimas, digiere el ARN de cadena simple reconociendo al ribonucleótido en un dúplex de ADN y rompiendo el enlace 5'-fosfodiéster de dicho ribonucleótido (Chon *et al.*, 2009).

TRIS

Tris (hidroximetil) aminometano o THAM es un compuesto orgánico con la fórmula $(\text{HOCH}_2)_3 \text{CNH}_2$. Se usa ampliamente como un componente de soluciones tampón, tales como en TAE y tampón TBE, especialmente para soluciones de ácidos nucleicos. Contiene una amina primaria y por lo tanto se somete a las reacciones asociadas con aminas típicas, por ejemplo, condensaciones con aldehídos (Gomori, 1955).

Amplicon de ADN

Es el producto de amplificación de eventos de replicación natural o artificial. Se forma usando el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este contexto, "amplificación" se refiere a la producción de una o más copias de un fragmento genético o secuencia diana, específicamente el amplicón. Como el producto de una reacción de amplificación, el amplicón se usa de manera intercambiable con los términos de laboratorio comunes, tales como producto de PCR (Mullis, 1990).

Gen 16S ARNr

Las secuencias del ADN ribosómico 16S ARNr permite la identificación de las bacterias, incluyendo las cuales son no cultivables, el gen codificante para el 16S ARNr consiste de regiones conservadas y variables. (Woese, Stackebrand and Macke, 1985).

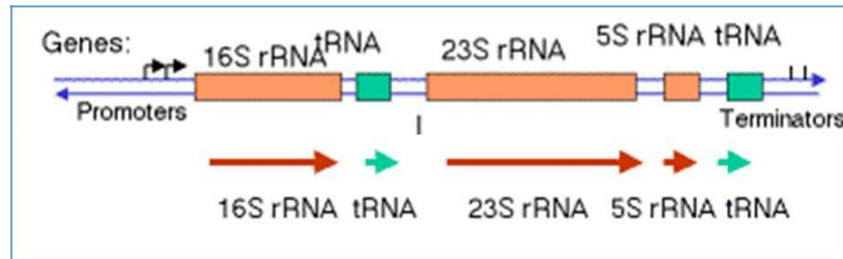


Fig.3.Regiones conservadas del gen 16S rRNA en la bacteria.

Primer

Es una secuencia corta que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Se necesita un iniciador porque la mayoría de enzimas de ADN polimerasas catalizan la replicación del ADN. Se necesitan dos primer para la reacción de PCR, uno en el extremo 3' y el otro complementario para la otra hebra. Son de aproximadamente 20 nucleótidos. (Michael, Innis and Gelfand, 1999).

Desoxirribonucleotido trifosfato - dNTP

Los dNTP que se usan en la replicación del ADN contienen tres fosfatos unidos al grupo hidroxilo 5' de la desoxirribosa y dependiendo de la base nitrogenada serán dATP, dTTP, dCTP o dGTP. La reacción fundamental es una transferencia de un grupo fosfato en la que el grupo 3'-OH actúa como nucleótido en el extremo 3' de la cadena que está en crecimiento. El nucleótido que se produce sobre el fosfato α del desoxirribonucleósido 5' trifosfato que entra liberándose pirofosfato inorgánico y alargándose el ADN. A pesar de que la ADN polimerasa sólo tiene un sitio activo para emparejar los cuatro dNTPs diferentes, la unión correcta de los pares de bases A = T, C = G es posible basándose en la geometría de éstos, si la unión es incorrecta se produce un desplazamiento del

fosfato α haciendo más difícil su unión al extremo 3'-OH, lo que da lugar a que la ADN polimerasa añada preferentemente las bases correctas.(Rabinow, 1996).

Taq polimerasa

Es un tipo de ADN polimerasa termoestable, nombrada de esta forma debido a que es producida por la bacteria *Thermus aquaticus* a partir de la cual fue aislada en el año 1968 por Thomas D. Brock. (Chien, Edgar and Trela, 1976). Es frecuentemente utilizada en las técnicas de PCR, un método que se utiliza para amplificar secuencias cortas de ADN. *T. aquaticus* es una bacteria que vive en manantiales calientes y fuentes hidrotermales y la polimerasa *Taq* que se extrajo de ella, ha sido caracterizada (Chien, Edgar and Trela, 1976).

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de biotecnología molecular de la empresa INCABIOTEC y en la Universidad Nacional de Tumbes. Siendo su ubicación geográfica.

Departamento: Tumbes

Provincia: Tumbes

Altitud: 6 m.s.n.m.

Latitud: 3° 53' Sur y 80° 35'

Oeste Temperatura: 22- 31°C

H. relativa media: 87%

3.2. MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO

Para la toma de muestra del tracto gastrointestinal, se realizó en un lechón destetado de 35 días de edad, el cual ha sido criado tradicionalmente sin el uso de antibióticos en la dieta, en el departamento de Tumbes

MATERIALES DE LABORATORIO

- Tubos de 15 ml estériles
- Hisopos estériles
- Placas Petri
- Palillos mondadientes
- Microtubos de 1.5 ml
- Matraz
- Probeta
- Mechero Bunsen
- Puntas con filtro esteriles de 0.5-10 ul, 20- 100 ul, 100- 1000 ul

EQUIPOS

- pH metro
- autoclave

- balanza electrónica
- congeladora -20°C
- refrigeradora 4°C
- incubadora
- espectrofotómetro
- equipo de electroforesis

REACTIVOS

- caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe)
- agar MRS
- ARNasa
- PBS 1X
- EDTA (Ethylen diamino ácido tetra acetico)
- Tris
- buffer 10X
- Dntps (desoxirribonucleotidos trifosfato)
- Primer forwar y rever 16S ARNr
- Cl₂ Mg
- Taq polimerasa
- agua destilada
- agua ultrapura
- azul de bromofenol
- bromuro de etidio
- TAE (tris, ácido acético- EDTA)

3.3. METODOLOGÍA

Toma de muestra del tracto gastrointestinal del lechón

La muestra se tomó de un lechón de 35 días de edad, de una granja convencional del departamento de Tumbes, para la toma de muestra se realizó un proceso quirúrgico, con anestésico disociativo: Ketamina 20 mg/kg + xilacina 2 mg/kg, via intravenosa, para evitar el estrés y alteración bacteriana, se procedió a tomar la muestra mediante un hisopado de la mucosa gastrointestinal de cada fragmento: estómago, intestino delgado e intestino grueso.(fig.4).



Fig. 4. En (A) Sujeción del lechón, en (B) aplicación de anestésia disociativa y en (C) laparotomía simple.

Aislamiento bacteriano

Las muestras se almacenaron en caldo MRS (Man, Rogosa y sharpe) por un periodo de 24 horas hasta la observacion del pellet bacteriano. Para la siembra bacteriana se hizo dilución de 50 ul de muestra más 950 ul de caldo MRS (dos veces). El cual evita la carga bacteriana en la placas petri con agar MRS. De la dilución existente se cogió 100 ul de medio y se colocó en placa Petri, con ayuda de esparcidores estériles se procedió a la siembra de la muestra en toda la placa se llevó a la incubadora a 37°C/24 horas, hasta observar el crecimiento de las colonias. Fig. 5 (A, B, C).

Purificación bacteriana

Para la purificación de bacterias se hizo una selección por diferenciación fenotípica y se realizó la siembra por el método de agotamiento en placas con agar MRS, posteriormente se llevó a la incubadora a 37°C/ 24 horas, la purificación se realizó 4 veces. Para confirmar la pureza se realizó tinción Gram en el cual se observaron bacterias puras generalmente Gram positivas. Fig. 4 (D, E, F).

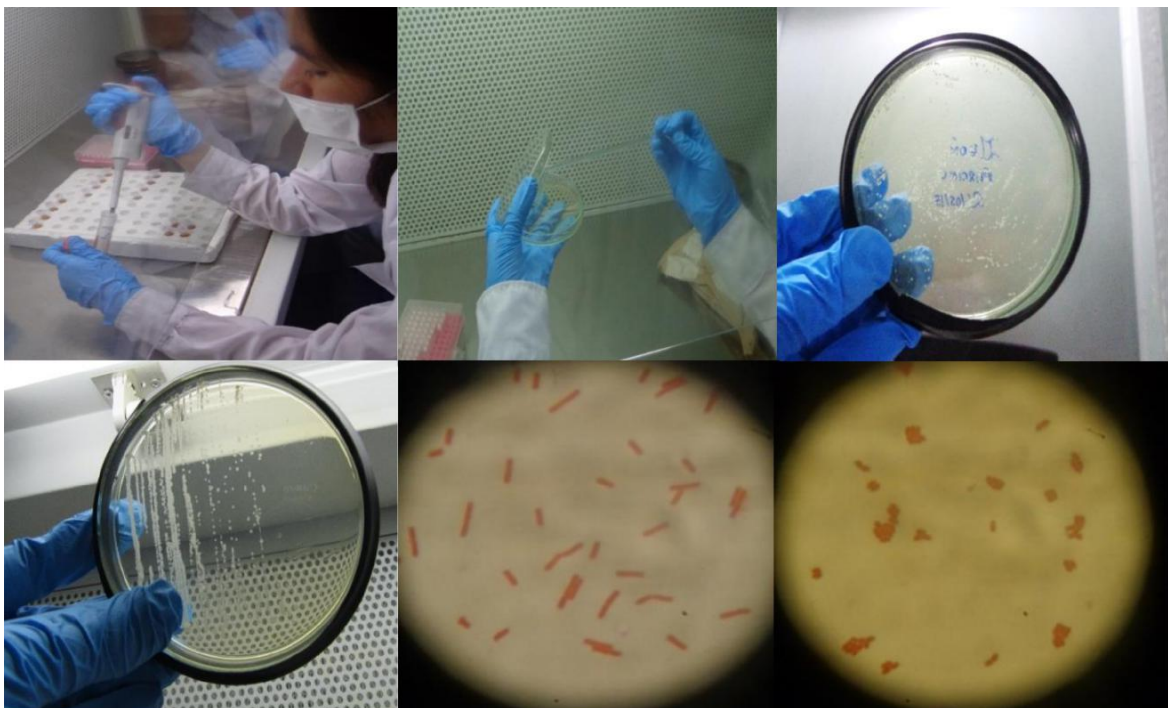


Fig. 5. Proceso de aislamiento y purificación : A) Dilución B) Siembra por esparcimiento C) colonias de la cepas D) Purificación E y F) Vista microscopio 100X

Extracción de ADN genómico

Se tomó 1.2 mL de caldo pre-enriquecido MRS en un microtubo de 1.5 ml y se microcentrifugó las muestras a 10000 rpm / 2 minutos, eliminar el sobrenadante, re-suspender el sedimento en 500 ul de solución PBS 1X estéril, vortexear por 7 segundos, centrifugar a 10000 rpm por 2 minutos, eliminar el sobrenadante y se añade 200 ul de la solución TE (Tris 1M/ 0.1 EDTA), vortexear por 7 segundos, llevar a ebullición por 10 minutos y colocar sobre el hielo por 5 minutos, centrifugar a 10000 rpm por 1 minuto. Trasferir el sobrenadante a otro microtubo, agregar 1ul de ARNasa y llevar a baño maría (65°C por 15 minutos), posteriormente guardar a -20°C. (Fig. 6) (A).

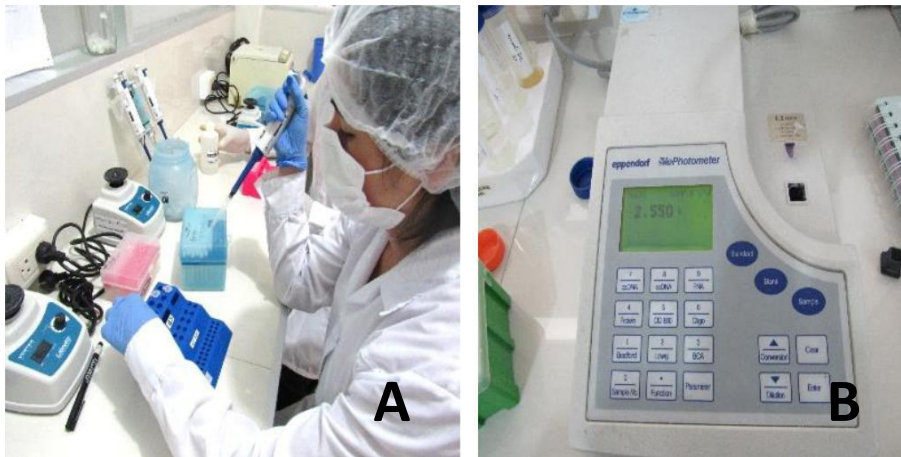


Fig 6. Proceso de extracción de ADN, en (A) extracción de ADN, en (B) medición de la pureza de ADN en el espectrofotómetro

Espectrofotometria

Para conocer la cantidad y pureza del ADN extraído usamos el espectrofotómetro que aprovecha la absorción de radiación electromagnética en la zona del ultravioleta y visible del espectro. La muestra absorbe parte de la radiación incidente en este espectro y promueve la transición del analito hacia un estado excitado, transmitiendo un haz de menor energía radiante. En esta técnica se mide la cantidad de luz absorbida como función de la longitud de onda utilizada. La absorción de las radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas depende de la estructura de las moléculas y es característica de cada sustancia química.

La espectrofotometría ultravioleta visible utiliza haces de radiación del espectro electromagnético, en el rango UV de 180 a 380 nm y en el de la luz visible de 380

a 780 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar los materiales en la región ultravioleta y visible del espectro para ello usamos 5 ul de ADN y 55 ul de TE (Tris 1M/ 0.1 EDTA). (Fig. 6) (B).

Reacción de la cadena polimerasa - PCR

La amplificación del gen 16S ARNr fue realizada mediante la técnica de PCR convencional. Para cada reacción se tomó 2.5 µl de buffer 10X, 1 µl de cloruro de magnesio 50 mM, 0.1 unidad de Taq polimerasa (invitrogen), 0.5 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM, 0.6 µl de cada primer a 15 pmol, en un volumen final de 25 µl, con 2 µl de ADN genómico. La amplificación del gen 16S se realizó con el juego de iniciadores universales 16S ADNr 27F y 16S ADNr 1492R, y para la secuenciación se utilizó el juego de primer 16S ADNr F518: 5'CCAGCAGCCGCGGTAATACG3', y 16S ADNr R800: 5'TACCAGGGTATCTAATCC3'. La programación del termociclador fue: 1 ciclo a 94°C por 6 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, y 1 ciclo final a 72°C por 4 minutos y 4°C por 10 horas. (Fig. 7) (C).

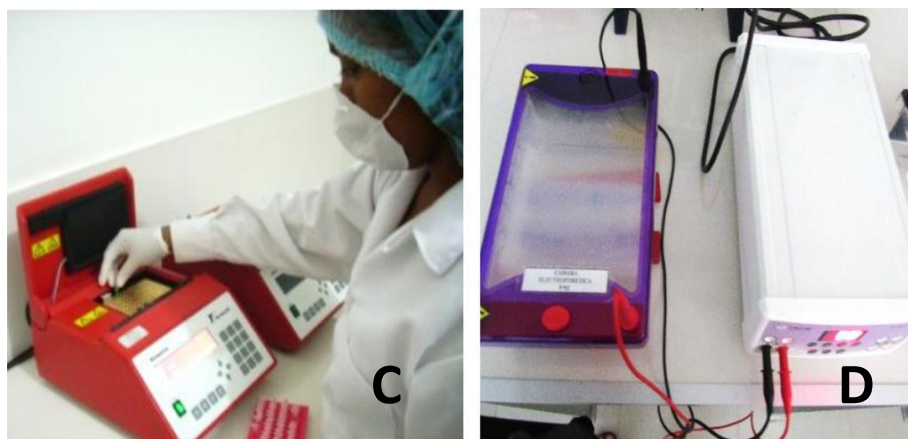


Fig 7. Proceso de PCR, en (C) termociclador- PCR, en (D) electroforesis

Electroforesis

Los productos obtenidos por la PCR se realizó la migración del amplicon de ADN, el cual se rige por las fuerzas de atracción de cargas opuestas debido a la carga negativa de ADN, permite la atracción por la carga positiva del equipo, para lo cual usamos el gel de agarosa 1.5%, pesamos 3g de gel de agarosa y en un matraz colocamos 200 ml de TAE 1X y la mezclamos, luego colocamos al baño

maría hasta que se disuelva totalmente, esperamos que el gel este tibio y agregamos 100 ug de bromuro de etidio, luego vertimos el gel líquido en el molde y se espera la solidificación. Una vez sólida se coloca en el equipo de electroforesis. (Fig.7) (D).

Secuenciación y bioinformática

Las muestra del amplicon de ADN que migraron se enviaron a secuenciar por un servidor Macrogen. Los datos de secuencia son comparadas con secuencias depositadas en el banco de datos de Gen Bank (National Center for Biotechnology Information) usando el algoritmo BLAST, para su identificación.

Ensayos *in vitro*

Obtenido los resultados y conociendo la bacteria en un 99% de identidad según la base de datos del Gen Bank, realizamos las pruebas para evaluar el carácter probiótico.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se utilizó la prueba de difusión en agar (Afaf, Fahmy and Abdelwahed, 2000) contra la cepa bacteriana *Salmonella typhimurium* patogénica. Para lo cual usamos discos de papel filtro Whatman N° 1 de 6 mm de diámetro estériles, placas con medio agar MRS a pH 6.2. Los discos son impregnados con 10 ul de cada medio de las bacterias, posteriormente son colocados sobre la superficie de las placas Petri con agar MRS, inoculado uniformemente con un cultivo líquido de las cepas *Salmonella typhimurium* en una concentración aproximada de 1.2×10^9 UFC/ ml (Absorvancia 600 nm: 0.1). Las placas son incubadas a 37°C y se mide el halo de inhibición a las 12 y 24 horas, como control positivo se usó discos de ampicilina (10 ug por disco)(Fig.8).

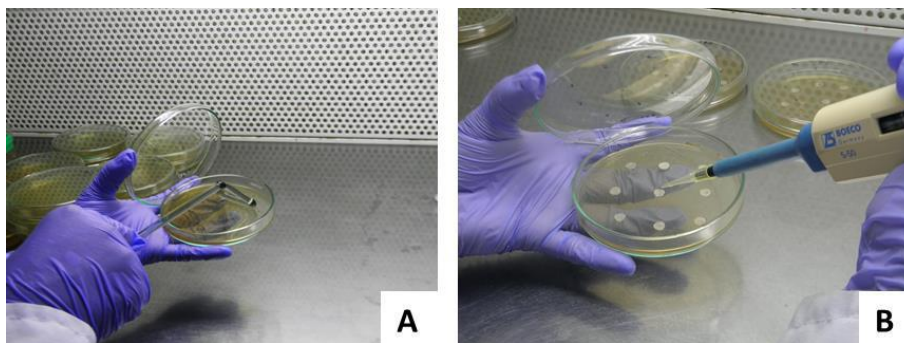


Fig.8. En A) siembra del patógeno (*Salmonella thyphimurium*), en B) Discos de papel filtro adicionado *lactobacillus*.

Resistencia a pH ácido

Todas las cepas de bacterias ácido lácticas son evaluadas por su capacidad de tolerancia a pH ácido. Se reactivó las bacterias en 5 ml de caldo MRS a 37 °C/ 12 horas de incubación, se preparó medios con diferentes concentraciones de pH a 2.5%; 4.5% y 6.5% de acidez usando para ello el caldo MRS y el ácido clorhídrico 5 M, en microtubos de 1.5 ml se coloca 900 ul de medio MRS y 100 ul de cepa bacteriana, se llevó a incubar a 37°C por 3 horas y se evalua la medición del crecimiento bacteriano mediante el espectrofotómetro.

Microscopía confocal

Para observar la tasa de supervivencia y viabilidad se utilizó microscopía confocal para ello se coloca 1 ml de muestra en un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 10000 rpm / 2 minutos, eliminamos 800 ul de sobrenadante, posteriormente colocamos 1 ul de fluorocromo para cada muestra evitando la luz para no degradar el reactivo, observamos la viabilidad bacteriana en cada concentración de acidez. (Fig.9)

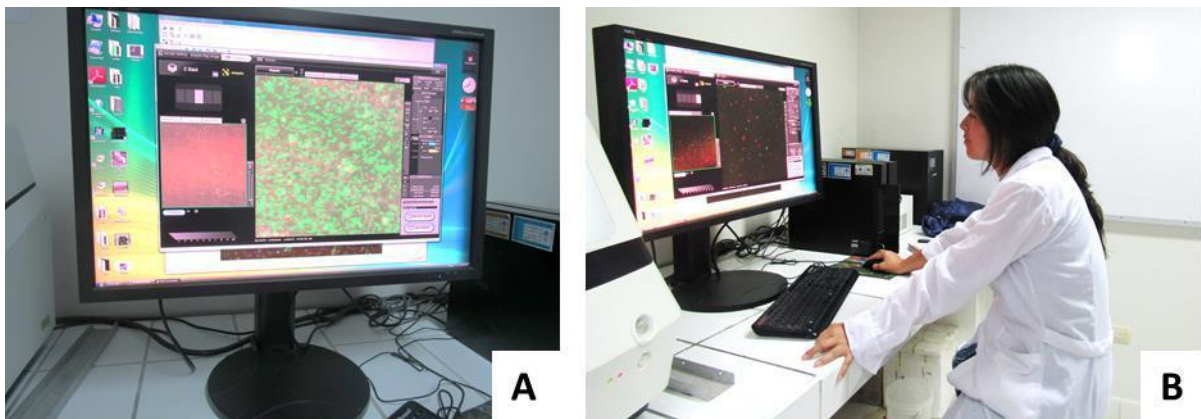


Fig.9. En A) viabilidad de la bacteria coloración verde, en B) Selección de campo microscópico .

Resistencia a la bilis

En este ensayo se recolecto bilis de porcino, posteriormente se realizó filtrados con filtros N° 0.2 mm para la prueba se realizó 3 concentraciones de bilis 3%, 1% y 0.5% en caldo MRS, se llevó a incubar a 37°C por 12 horas, como control se utilizó el cultivo en medio MRS sin bilis.(Fig.10).

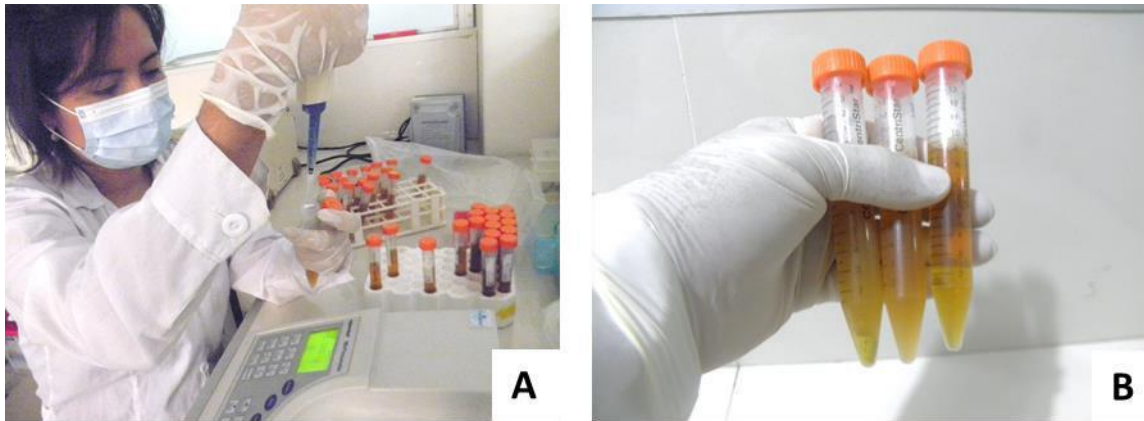


Fig.10. En A) Medida del crecimiento bacteriano en el espectrofotometro, en B) crecimiento bacteriano.

IV. RESULTADOS

Bacterias ácido lácticas aisladas a partir del tracto gastrointestinal de un lechón

Las bacterias ácido lácticas aisladas del estómago, intestino delgado e intestino grueso del lechón, fueron un total de 19 cepas bacterianas con características fenotípicas distintas en tamaño, forma, color, borde y superficie. De estas cepas bacterianas, 4 provinieron del estómago, 4 del intestino delgado y 11 del intestino grueso. Para el estudio se purificaron las cepas bacterianas obtenidas a 24 horas de cultivo a 37°C (Fig. 11).

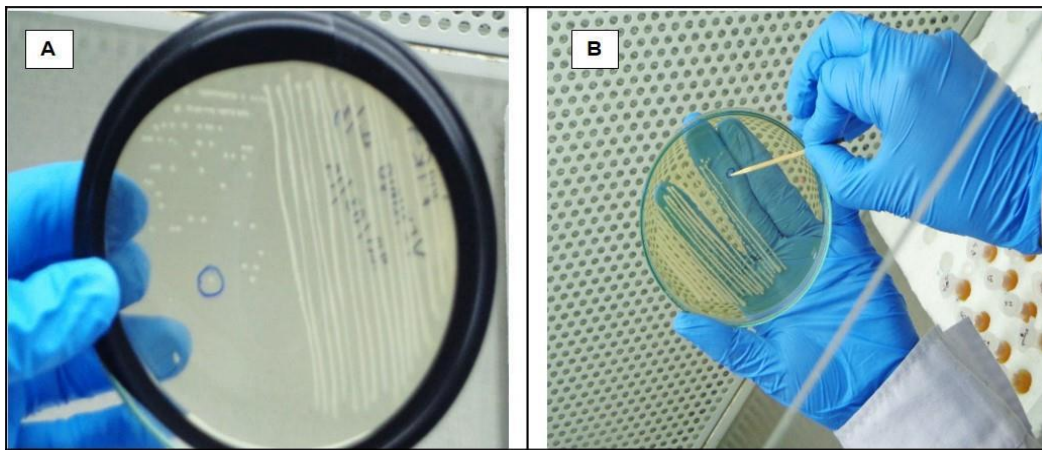


Fig.11. Fotos de la purificación de cepas bacterianas en medio MRS, mediante la técnica del rayado (A) primer repique y (B) purificación en segundo repique.

Identificación molecular de las bacterias ácido lácticas “BAL” aisladas

La identidad de todas las cepas bacterianas fue analizada mediante la secuenciación parcial del gen 16S ARNr. En el estómago las cepas aisladas fueron identificadas como *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus farciminis* y *Weissella* sp., en el intestino delgado se aislaron *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus brevis* y en el intestino grueso con *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella* sp. Todas las cepas bacterianas presentaron un nivel de homología igual o superior al 98% con cepas bacterianas del banco de datos de secuencias Genbank (Tabla 1) (Fig.12).

Tabla 1: Lista de las bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes compartimientos del tracto gastrointestinal e identificado mediante secuenciación del gen16S ARNr.

Compartimiento del TGI	Cepas	Identificación taxonómica	% de homología
Estomago	E1	<i>Lactobacillus johnsonii</i> 5333	NC 98%
	E2	<i>Weissella sp.</i>	99%
	E3	<i>Lactobacillus. farciminis</i>	99%
	E4	<i>Weissella sp.</i>	99%
Intestino delgado	ID1	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 9790	99%
	ID2	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	99%
	ID3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	100%
	ID4	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	99%
Intestino grueso	IG1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	100%
	IG2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%
	IG3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	99%
	IG4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%
	IG5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%
	IG6	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	99%
	IG7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%
	IG8	<i>Weissella sp.</i>	99%
	IG9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%
	IG10	<i>Weissella sp.</i>	99%
	IG11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99%

Lactobacillus brevis

GAGTTTATCATGGCTCAGGACGAACGCTGCGCGCATGCCTAATACATCAAGTCAACGAGCTCCGTTGAATGACGTGCTTGCCTGATTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGGAGTA
ACACGTGGGAAATCTGCCAGAAAGCGGGATAAACCTTGGAAACAGTGTCTAATACCGTATAACAACAAATCCGCAATGGATTGTTTGAAGAGTGGCTCGCTATCACTTCTGGATGATCCCG
CGCGTATTAGTTAGTTGGTGAAGTAAAGGCCCAACAGCATGATACGTAGCCAGCTCGAGAGGTAATCGGCCAATTGGGACTGAGACACGCCAACTCTACGGGAGGCGAGCATGG
GAATCTTCAACAATGGAGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCTGAGTGAAGAGGGTTT

Lactobacillus johnsonii

TAAATGAACTAGATAACAAGCGAGCGGCGGGTGGTAAACAGTGGTAACTGCCAAGAGAGTGGTAAACACTGGAAACAGATGCTAATACCGGATAACAACACTAGACGCATGTCTA
GAGTTTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTCTTGATGGACCTGCGGTGATTAGTGTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAATGATGATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGG
ACTGAGACACCGCCAACTCTACGGGAGGCGAGTGGGAACTCTTCAACAATGGAGAAAGTCTGATGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTGGTGTAG
TGAAGAAAGATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTATTGACGGTAATTAAGTAAAGTACGGCTAACTACGTGCGCAGCAGCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTGTCCGATTTATTGGCGT
AAAGCGAGTGCAGGCGGTTCAATAGTCTGATGTAAAGCCTTCCGCTCAACCGGAGAAATGCATCAGAAACTGTTGAATCTGAGTGCAGAAAGAGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAA
TGCCTAGATATATGGAAGAACCAAGTGGCAAGGCGGCTCTGGCTGCAACTGACCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAAGCATGT
AGTGCTAAGTGGGAGGTTCCGCTCTCAGTGTGCTGAGCTAACGCTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGTTGAACTCAAAGAAATGACGGGGCCGCACAGCGGTGG
AGCATGTGGTTAATCTGAAGCAAGCGGAAGAACTTACCAGTCTGATACATCAGTGCAAACTAAGAGATTAGGTGTTCCCTCGGGAGCTGAGACAGGTTGGTGGTGGTGTGTCGACGTCTG
TGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTATTGTTGCATCTTAAGTTGGGCACTAATGAGACTGCGCGTGACAAACCGGAGGAAAGTGGGGATGACGTCAAGT
CATCATGCCCTTATGACTGGCTACACGTCTACAATGGACGGTACAACGAGAAGCGAACTCGAAGGCAAGCGGATCTTTAAAG

Enterococcus hirae

CGCTTTTTTCTATGGGAGCTTCTCCACTGAAAAAGAGGTGGCGAAGCGGGTGGTAACTGATGGTAACTACCCATCAGAAGGGGATAAACCTGGAAACAGGTTGTAATNCCGTATAA
CAATCGAAACCGCATGGTTTGAATTTGAAAGCGGCTTTGGGGTGTGCTGATGGATGACCGCGGTTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTCAACAAGGCGAGCATGATAGCCGAGCTGAG
AGGGTGTGATCGCCACATTTGGGAGTGAAGTCTCGGCCAACTNACGGGAGGCGAGCATAGGAACTCTCGGCAATGGAGCAAGTCTGACCGAGCAACCGCGGAGTGAAGAAAGTTTTTCG
GATCGTAAACTTGTGTTAGAGAAAGCAAGGATGAGAGTAATGTTATCCCTGACGGTATCTAACAGAAAGCCAGCGCTAACTAGTGGCAGCAGCGGTAATACGTAGTGGCAAGC
GTTGTCCGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTAAAGCCTCGGCTCAACCGGGAGGTTGATTGGAACTGGGAGACTTGAAGTGCAGAAAGAGGAGGTGG
AATCCATGTTAGCGGTAAGTGCATAGATATGAGGAGAACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCTGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTG
GTAGTCCACCGCAATACGATGAGTCTAAGTGGTGGAGGTTCCGCTCTCAGTGTGCTGAGCTAACGCATTAAGCACTCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGTTGAACTCAAAGAAATGAC
GGGGCCCGCAACAAGCGGTTGGAGCATGTGTTAATCGAAGCAAGCGAAGAACTTACAGTCTGACATCTTGGACACTTAGAGATAGAGCTCCCTCGGGGGCAAGTGGCAAGGTTG
GTGATGGTTGTGCTCACTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTGGCACTTAGCAAGACTGCGGGTACAAACAGGAGG
AAGTGGGGATGACGCTCAATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAAATGGGAAAGTACACGAGTGCAGAAAGTGGGAGGCTAAGCTAATCTTAAAGCTCTCAGTTCGG
ATTGTAGGCTGCACTCCCTACATGAAGCGGAATCGTATGATGCGGATCAGCAGCGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCTCACACAGGAGTTGTAACACCCG
AAGT

Pediococcus pentosaceus

CTTTNNGCNTNTNAAAGNACCGATAGATGCGGTATTGGGACTGGTGTCTTCTGATATCTACNNATTCACCGCTACAATGGAAGTCCACTGTCTCTTGAAGTCAAGTTCCCTGTTCCCATGCA
CTTCTCAGATGAGCGGAANGCTTTCATTAAGACTTAAAGACNGCCTGTCTCTCTTTACCGCCAAATAAACCGGATAACGCTTCCACCTACGTATTACCGCGCTGTGGCAGTAGTTGGCGGT
GGCTTCTGGTTAAATACNNACTGGGTAACAGTTACTCTTAACCGACTTCTCTTTAAACAACAGAGCTTTACGAGCGGAAACCTTCTCACACNTGGCGGTGCTCCATCAGACTTGGGTCAT
TGTGGAATATTCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGACACAATGTGGCGGATTAACCTCTCAGGTCGGCTACGTATCACTGCTGGTGGAGCCTTAACTACCAATAGCTA
ATACCGCGGGTNCATCAAAATGATAGCTAGNCTTTTAAAGAAACCATGCGGATTAAGTCTGTTATACGGGATTAAGCATCTGTTCCAGGTTTATCCCTACTTGGGCGATGTTACTCACT
TGTTTCTACCGGTTCCACTCACTTCAGTCACTCTGATCAGCANGTACGTATANTCATTAAACGGAATTCGGTTCGACTTGCATGNNNNNNGCTCGCCCCCAGCATTCATC

Lactobacillus farciminis

ANNNNCACGTGAGTACAGTCCAGAAAGCGCCTTCCGCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTNACCGCTACACATGGAGTCCACTTCTCTACTGCTCAAGTCAATCCAGTTTCAAAG
CAATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTCACTTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAAACATAGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTATTAGCC
GTTCTCTGGTAAAGATACCGTACACATTTGAACAGTTACTCTCAATGTCAATCTCTTTACAACAGTGTTTTACGAGCGGAAACCTTCAACACACCGCGGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCAT
TGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCGTAAGGAGTATGGGCGGTGTCTCAGTCCATTTGTGGCGGATCAGTCTCAACTCGGCTATGATCATCGCTTGGTAAAGCATTACTTACCAACTAGCTA
ATGACCGCGGGACCATCTCTAGTATAGCAGAAACCATTTTAAATAACAACCATGCGGTTGTCAATTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCTGTAAGAGGTAAGTTTCCCA
CGTGTACTACCGGTTCCCACTCTTGTCAATGCTCATCTGAGCAAGCTCTCAATCAGTGAACCAAAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGACCGCGCCAGCGTTCATCTGAGC
CATGACTAAACTNAAAA

Lactobacillus plantarum

ANNNTNNTNCGTNGTTACNAGCAGACGCGCCTTCCGCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTNACCGCTACACATGGAGTCCACTTCTCTACTGCTCAAGTCAATCCAGTTTCCG
ATGCACTTCTCGGTTGAGCGAAGGCTTCACTTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAAACATAGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTATTAGCC
GCGTGGCTTCTGGTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCGGAAACCTTCTCACTACGCGGCTGTCCATCAGACTTTCG
CCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCGTAAGGAGTATGGGCGGTGTCTCAGTCCATTTGTGGCGGATCAGTCTCAACTCGGCTATGATCATCGCTTGGTAAAGCATTACTTACCAACTAGCTA
GCTAATACCGCGGGACCATCCAAAAGTATAGCCGAAGCCATCTTCAAACCTGGACCATGCGGTTGTCAATTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCTGTAAGAGGTAAGTTTCCCA
TTCCACGCTGTTACTCACCANTTTCGCACTCACTCAATGTAATCATGATGCAAGCACCANTCAATACAGAGTTTCTGACTTGCATGTATTAGGACCGCNCNGCTGCTGANCNG
GACTAAC

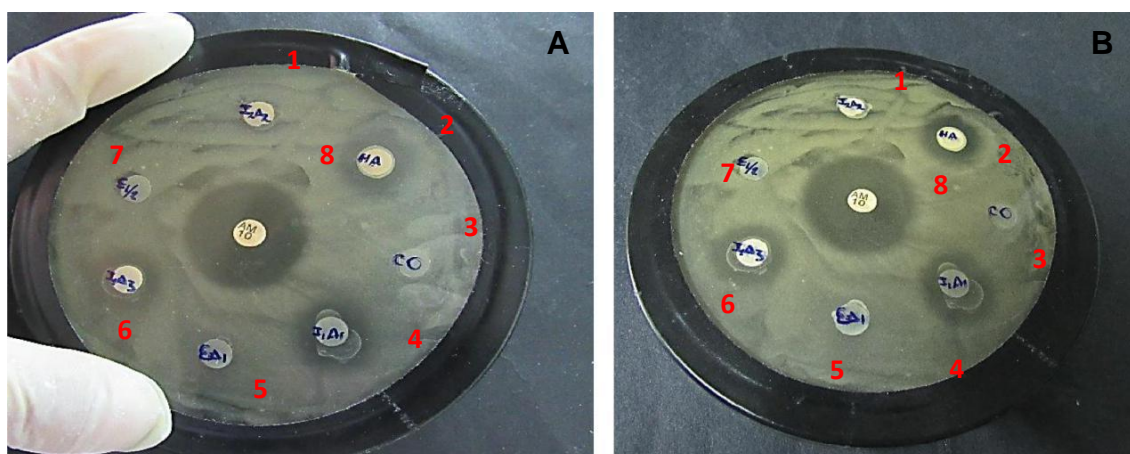
Weysella sp

CNCACGTGAGTACAGTCCAGAAAGCGCCTTCCGCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTNACCGCTACACATGGAGTCCACTTCTCTACTGCTCAAGTCAATCCAGTTTCAAAGCAAT
TCCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTCACTTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAAACATAGTATTACCGCGGCTGTGGCAGTATTAGCCGTT
CTTCTGGTAAAGATACCGTACACATTTGAACAGTTACTCTCAATGTCAATCTCTTCTTACAACAGTGTTTTACGAGCGGAAACCTTCAACACACCGCGGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGT
GGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCGTAAGGAGTATGGGCGGTGTCTCAGTCCATTTGTGGCGGATCAGTCTCAACTCGGCTATGATCATCGCTTGGTAAAGCATTACTTACCAACTAGCTAATG
CACCGCGGACCATCTCTAGTATAGCAGAAACCATTTTAAATAACAACCATGCGGTTGTCAATTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCAAATGTTATCCCTGTAAGAGGTAAGTTTCCCAAGT
GTACTACCGGTTCCCACTCTTGTCAATGCTCATCTGAGCAAGCTCTCAATCAGTGAACCAAAAGCGTTCGACTTGCATGTATTAGGACCGCGCCAGCGTTCATCTGAGCCATG
ANCTAAACTTAAAA

Fig.12. Secuencia parcial del gen 16S rRNA de cada bacteria.

Análisis de la actividad antibacteriana

Las pruebas de antagonismo se realizó con las cepas *L. johnsonii*, *L. farciminis*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *E. hirae* y *W. sp* contra *S. typhimurium*. Las cepas bacterianas que muestran mayor tamaño del halo inhibitorio son: *E. hirae*, *P. pentosaceus* y *W. sp*. (Tabla 2). El diámetro de halo inhibitorio no varía en relación al tiempo (fig.13).



A: 12 horas

B: 24 horas

Fig. 13. Prueba de antagonismo entre cepas ácido lácticas aisladas del lechón contra *Salmonella typhimurium*. (1) *L. brevis*; (2) *Weissella. sp.*; (3) *L. plantarum*; (4) *E. hirae*; (5) *L. johnsonii*; (6) *P. pentosaceus*; (7) *L. farciminis*; (8) control ampicilina. El diámetro de halo inhibitorio no varía en relación al tiempo en A y B.

Tabla 2. Cepas bacterianas y tamaño de halo inhibitorio contra *Salmonella typhimurium*

	Bacteria ácido lácticas	halo inhibitorio (mm)
1	<i>Lactobacillus brevis</i>	7
2	<i>Weissella sp</i>	14
3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8
4	<i>Enterococcus hirae</i>	15
5	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	7
6	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	14
7	<i>Lactobacillus farciminis</i>	7
8	Control (amoxicilina)	24

Prueba de resistencia a la bilis

La cepa bacteriana que muestra mayor resistencia a la bilis en concentraciones de 0.5%, 1% y 3% es *L. brevis*, seguido de *W. sp*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *P. pentosaceus*. Sin embargo, *E. hirae*, no tienen resistencia a la bilis (Tabla 3). (a), (b) y (c) indica que hay diferencia significativa entre las cepas bacterianas y el grupo control a un nivel de confianza del 95% (fig.14).

Bacteria	control	bilis 0.5%	bilis 1%	bilis 3%
<i>E. hirae</i>	0.4	0.7	0.6	0.7
<i>L. johnsonii</i>	1.2	1.8	1.9	1.9
<i>L. farciminis</i>	1.2	1.9	1.8	1.9
<i>P. pentosaceus</i>	1.2	1.8	1.8	1.9
<i>L. brevis</i>	1.3	1.7	1.8	2.2
<i>W. sp</i>	1.2	1.7	1.7	1.9
<i>L. plantarum</i>	1.3	2	1.9	1.9

Tabla 3. Crecimiento bacteriano a una densidad óptica (OD) de 600 nm a diferentes concentraciones de bilis.

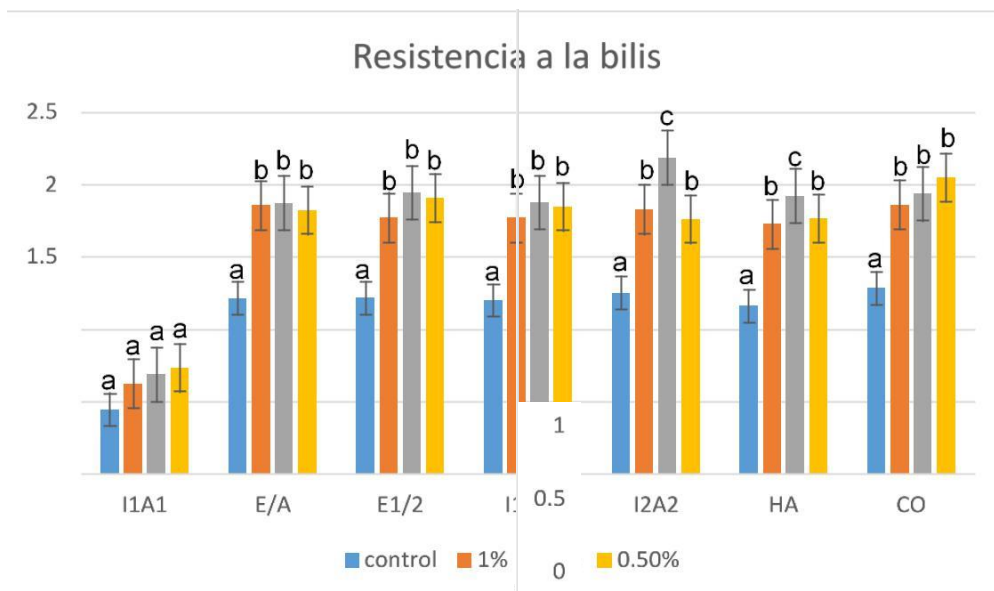


Fig. 14. Prueba de la resistencia a la bilis a concentraciones de 0.5%, 1% y 3%. HA= *Weissella. sp.*, E/A= *L. johnsonii*; I2A2= *L. brevis*; E1/2= *L. farciminis*; I1A1= *E. hirae*; I1A3= *P. pentosaceus*; CO= *L. plantarum*.

Prueba de resistencia a pH

La cepa bacteriana con mayor predominancia de resistencia a pH de 2.5 y 4.5 es *L. jhonsonii* seguido de *L. plantarum*, *L. brevis*, *P. pentosaceus*, *L. farciminis*, *W. sp.*, sin embargo *E. hirae*, no tienen crecimiento significativo a diferentes variaciones de pH (Tabla 4). (a), (b) y (c) indica que hay diferencia significativa entre las cepas bacterianas y el grupo control a un nivel de confianza del 95% (fig.15).

Tabla 4. Crecimiento bacteriano a una densidad óptica (OD) de 600 nm a diferentes pH de 2.5 y 4.5.

Bacteria	control	pH: 4.5	pH: 2.5
<i>E. hirae</i>	0.9	0.3	0.3
<i>L. jhonsonii</i>	1.2	0.7	0.6
<i>L. farciminis</i>	1.1	0.6	0.4
<i>P. pentosaceus</i>	1.2	0.7	0.4
<i>L. brevis</i>	1.3	0.6	0.4
<i>W. sp</i>	1.2	0.6	0.4
<i>L. plantarum</i>	1.3	0.5	0.5

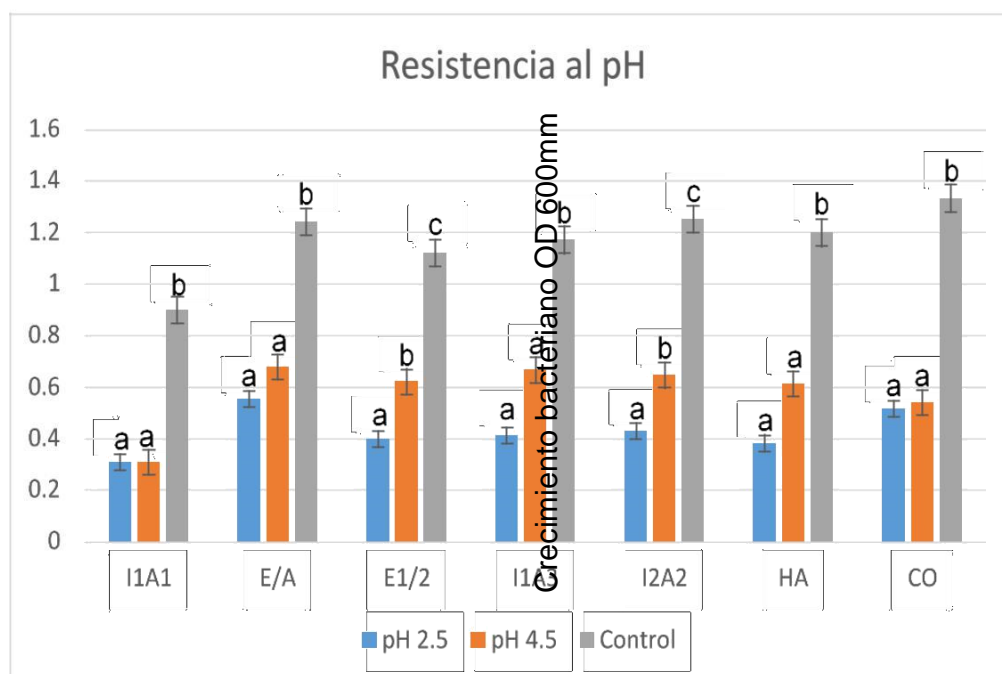


Fig.15. Prueba de resistencia a pH a 2.5 y 4.5. E/A= *L. jhonsonii*, E1/2= *L. farciminis*, I1A3= *P. pentosaceus*, I1A1= *E. hirae*, I2A2= *L. brevis*, HA= *W. sp*, CO= *L. plantarum*.

Viabilidad bacteriana a pH ácido con microscopía confocal

Las 7 cepas bacterianas evaluadas en condiciones normales de su crecimiento a pH de 6.2, se mantienen viables. A medida que baja el pH la viabilidad disminuye, quedando algunas viables a pH 4.5 como *E. hirae*, *P. pentosaceus*, *L. brevis*, *L. farciminis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, y en menor proporción *Weissella sp.*, y ninguna viable a pH de 2.5 (fig.16).

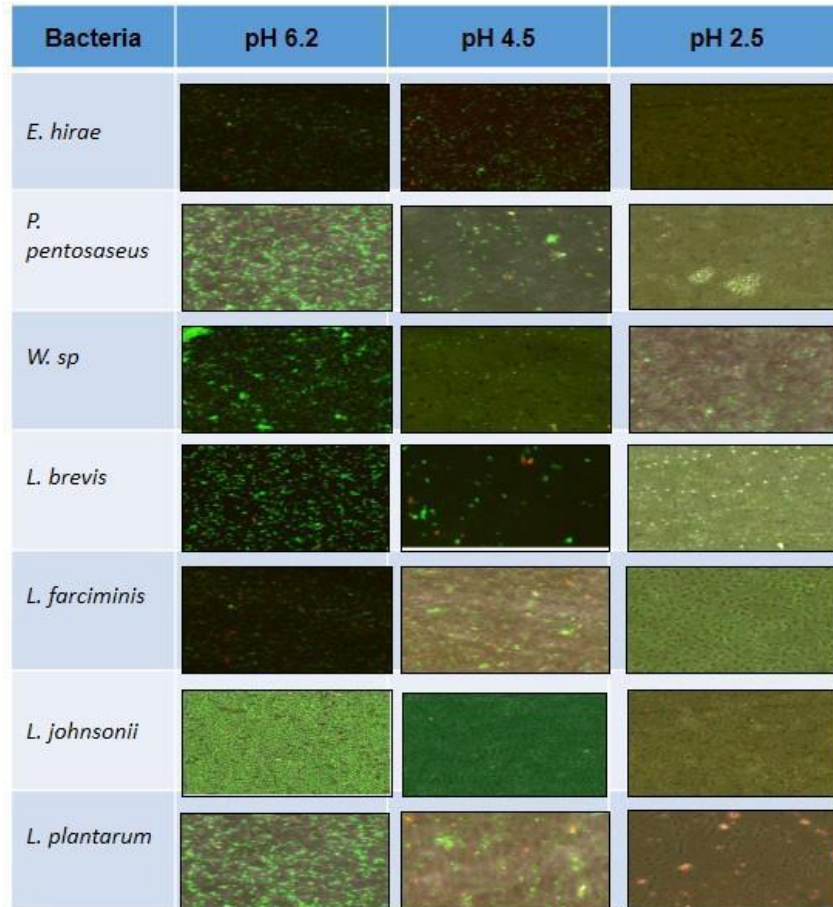


Fig. 16. Observación al microscopio confocal de la viabilidad bacteriana a diferentes pH. Las bacterias viables marcadas con SYTO9 se observan de color verde, mientras las bacterias no viables, marcadas con PI se observan de color rojo.

V. DISCUSIÓN.

El presente trabajo de investigación, relacionado a la microbiota del porcino, tiene un componente enfocado en la caracterización de la composición bacteriana del intestino delgado e intestino grueso, siendo esta última microbiota considerada, particularmente, como fuente de microorganismos patógenos o benéficos.

La importancia de aislar bacterias ácido lácticas del porcino para utilizarlas en la misma especie es fundamental por la especificidad del hospedero, fortaleciendo su sistema inmunológico, facilitando la colonización de las bacterias ácido lácticas y su acción probiótica, concordando con los estudios de (Pluske, J. y Pethick D, 2005). Estas bacterias ácido lácticas nativas constituyen una alternativa basada en la limitación del crecimiento de patógenos en el intestino, es decir la “exclusión competitiva”.

Actualmente se usan probióticos distribuidos por industrias farmacéuticas, teniendo resultados bajos o nula eficiencia en el incremento de la producción pecuaria (Schrezenmeir and De Vrese, 2001). Debido a que los probióticos adquiridos proceden de otras regiones geográficas o incluso de otra especie animal.

Existen abundantes microorganismos en el tracto gastrointestinal del porcino. Los *Lactobacillus* están presentes en el intestino como uno de los microorganismos predominantes (Tannock, 1990). Nuestro resultado concuerda con (Shahani, Vakil and Kilara, 1977) en donde el número de colonias aisladas sobre agar MRS incremento desde el intestino posterior a anterior. Indicando que el intestino grueso es apto para el crecimiento de bacterias tipo *Lactobacillus* que el intestino delgado, debido al bajo pH en el estómago y sales biliares en el intestino. Estos resultados concuerda con (Fuller, 1992), pero el número de colonias bacterianas es variable debido al tipo de crianza, dieta y medio ambiente.

Los ensayos de viabilidad bacteriana a diferentes concentraciones de pH, es importante para ser seleccionado como probiótico, debido al pH ácido del estómago del lechón, llegando alcanzar valores de pH 4.0 a pH 4.5, según (Tuomola, *et al.*, 2001). Nuestros resultados mostraron la viabilidad de las cepas bacterianas a condiciones de acidez. Los estudios de (Iñiguez, Pérez and Acedo, 2007) mencionan que las condiciones ácidas del TGI favoreciendo la adhesión de los microorganismos lácticos e inhibe crecimiento de patógenos.

Los ensayos *in vitro* fueron realizados con las bacterias caracterizadas y reconocidas como probióticos, un caso especial es *Enterococcus hirae* mencionado como potencial anti-inflamatorio y antibacteriano aislado del *Bos primigenius*. (Arokiyara *et al.* 2014) sin embargo está asociado con diarrea en lechón lactante. (Larsson *et al.* 2014) en nuestro estudio *in vitro* *Enterococcus hirae* produce un halo inhibitorio contra *S. typhimurium*.

VI. CONCLUSIONES

- Este estudio ha permitido la obtención de 7 cepas distintas de bacterias ácido lácticas.
- La identificación de otras cepas del genero *Enterococcus* y *Weissella sp*, así como *Pediococcus*, permitieron identificar cepas nativas del tracto gastrointestinal con propiedad antagónica a *S. typhimurium*.
- Existe una diversidad de bacterias ácidos lácticas en el tracto gastrointestinal del porcino alguno con propiedades antimicrobianas, incremento de peso y estimulante el sistema inmunitario, estos microorganismos con carácter probiótico nativo puede ser usado como alternativa para reemplazar los antibióticos en la dieta de los animales.

VII. RECOMENDACIONES:

- ✓ Manejar programas de bioseguridad y manejo de comité de ética de animales.
- ✓ Usar el servidor BLAST para el análisis BIOINFORMÁTICO.
- ✓ Continuar la investigación de las cepas bacterianas aisladas si están implicadas en desencadenar un estrés oxidativo o activar las especies oxigenoreactivas (ROS) y estimular a las interleucinas e interferón.
- ✓ Continuar con el estudio si las cepas aisladas y seleccionadas como posibles probióticos poseen genes de resistencia a antibióticos y genes de toxinas (Ejemplo: enzimas asociadas a la producción de aminas biogénicas).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adams MD, Field C, Craig VJ, editors. Automated DNA Sequencing and Analysis. Gaithersburg: Digital printing; 2009.
2. Afaf H, Fahmy HH, Abdelwahed SH. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Benzimidazoles derivatives. 2000. 5 (12).1429-1438
3. Arokiyara SI, Hairul V, Bharanidharan R, Raveendar S, Lee J, Arokiyara SK, Hairul IV. *et al.* Antibacterial, anti-inflammatory and potential of *Enterococcus hirae* isolated from the rumen of *Bos primigenius*. Journal World Microbiol Biotechnol. 2014. 30: 1-8.
4. Barbosa JE, Vásquez H, Salcedo R, Bautista M. Probióticos y conservadores naturales de alimentos. Acta universitaria. 2004; 14(3):32-38.
5. Briizuela MA. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticos y su evaluación en cerdos. (tesis doctoral). La Habana: Instituto Cubano de los Derivados de la Caña de azúcar, Facultad de Ciencias Veterinarias; 2003.
6. Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. Crit Rev Microbiol. 2002; 28(4): 281-370
7. Charteris WP, Kelly PM, Collis JK. Development of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal. Trac.J of Appl Microbiol.1998; 84:759-768.
8. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus acuaticus*. J Bacteriol.1976; 127(3):1550-1557.
9. Chon H, Vassilev A, De Pamphilis ML, Zhao Y, Zhang J, Burgers PM, Crouch, RJ, Cerritelli SM. Contributions of the two accessory subunits, RNASEH2B and RNASEH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex. Nucleic Acids Res. 2009. 37: 96-110.
10. FAO and WHO United Nations, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Edited by FAO/WHO. London, Ontario, Canadá; 2002.
11. Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L. Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? Best Pract Res Clin Gastroenterol.2003; 17: 711–724.
12. Fuller R. History and development of probiotics. 1992. pp 1-8.

13. Giang H, Viet T, Ogle B, Lindberg JE. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with potentially probiotic complexes of lactic acid bacteria. *Livest Sci.* 2010; 129: 95–103.
14. Gómez ZA, Kociubinsky G, Pérez P, De Antony G. Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotic formulation. *J Food Prot.* 1998; 61:865-873.
15. Gomori G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Meth. Enzymol.* 1955; 1:143-146.
16. Huang CH, Qiao SY, Piao XS, Ren JP. Effects of Lactobacilli on the performance diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. *Asian Aust J Anim Sci.* 2004; 17:401-409.
17. Havenaar R, Bart TB, Jos HJ. In 't Veld. Probiotics. 1992; 209-224.
18. Malago JJ, Jos F, Konink X. Probiotic – Pathogen Interactions and Enteric Cytoprotection. *Probiotic Bacteria and Enteric Infections.* 2011; 289-311.
19. Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American.* 1990. 262 (4): 56-61, 64-5.
20. Kato I, Tanaka K, Yokokura T. Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes. *Int J Immunopharmacol.* 1999; 21 (2):121-131.
21. Karpinski FE, Rieders F, Girsh LS. Versenato de calcio disódico en el tratamiento de la encefalopatía por plomo. *Girsh Journal of Pediatrics.* 1953.
22. Kim HB, Isaacson RE. The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Vet. Microbiol.* Jun 2015; 177(3-4):242-251.
23. Kociubinsky G, Pérez P, De Antony G. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *J food Pro.* 1999; 62:905-912.
24. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 167(2).185-189.
25. Larsson JR, Lindberg A, Aspan R, Grandon E, Jacobson M. Neonatal piglet diarrhea associated with enteroadherent *Enterococcus hirae*. *J Comp Pathol.* 2014. 151 (2-3).137-147.

26. Lorca GL, Valdez GF. A low- pH-inducible, stationary phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Curr Microbiol.* 2001; 42(1):21-25.
27. Leber S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Rev.* 2008; 72(4):728-764.
28. Li XJ, Yue LY, Guan XF, Qiao SY. The adhesion of putative probiotic Lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *J Appl. Microbiol.* 2008; 104(4):1081-1091
29. Lodish H.J. *Molecular Cell Biology.* 4ta ed. New York. W H Freeman and Company. 2009.
30. Mack DR, Michail S, We S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol.* 1999; 276 (4):941-950.
31. Malloa J, Riopérez J, Honrubia P. The addition of *Enterococcus faecium* to diet improves piglet's intestinal microbiota and performance. *Livest Sci.* 2010; 26:243–256.
32. Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, Yoshikai Y. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10(2):259-266.
33. Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev.* 2011; 24 (4):718–733.
34. Michael A, Innis DH, Gelfand JJ. *PCR Applications. Protocols for functional genomics.* Capítulo 14. Sninsky. Academic Press 1999. ISBN: 0-12-372186-5.
35. McFall MN. Concept Adaptive Immunity: Care for the community. *Nature international weekly journal of science.* 2007; 445(7124):153.
36. Peña A, Flora intestinal, probióticos, prebióticos, simbióticos y alimentos novedosos. *Revista Española de Enfermedades Digestivas.* 2015; 9(11).
37. Pluske J, Pethick D. El impacto de la nutrición sobre desordenes y enfermedades de tipo entérico en porcino. Murdoch University. Australia. 2005.
38. Rabinow P. *Making PCR: A story of Biotechnology.* Chicago: University of Chicago Press. 1996. ISBN 0-226-70146-8.
39. Rondón AJ, Samaniego LM, Bocourt R, Rodríguez S, Milián G, Ranilla M, Laurencio M, Pérez M. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las

- propiedades probióticos de cepas de *Lactobacillus sp.*, procedentes del tracto gastrointestinal de pollos ceiba. *Cienc tecnol aliment.* 2008; 6(1):56-63.
40. Rinkinen M, Westermarck E, Salminen S, Ouwehand A. Absence of host specificity for *in vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria to intestinal mucus. *Vet. Microbiol.* 2003; 97(1-2):55-61.
 41. Ross G, Gusils C, Oliszewski R, De Holgado S, Gonzalez S. Effects of probiotic administration in swine. *J Biosci Bioeng.* 2010;109: 545–549
 42. Sambrook J and David R. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 3 Ed. New York. Cold Spring Harbor Press. 2001.
 43. Schrezenmeir J, De Vrese M. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaching a definition. *Am J clinical Nutr.* 2001; 73 (2):361-364.
 44. Sanger F, Coulson A. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975; 94:441-448.
 45. Shahani KM, Vakil JR, Kilara A. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *L. bulgaricus* 2. Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*. *Cult. Dairy Prod.* 1976. J. 12: 8-11.
 46. Tannock W. The Microecology of Lactobacilli inhabiting the gastrointestinal tract. *Adv Microb Ecol.* 1990. 11:147-171.
 47. Thacker P. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: A review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2013; 4: 35.
 48. Tamay de Dios L, Ibarra C y Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en capacidad.* 2013;2(2); 70-78.
 49. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(2); 393-398.
 50. Vander Fels-Klerx HJ, Puister- Jansen LF, Van-Asselt ED, Burgers S. Farm factors associated with the use of antibiotics in pig production. *J Anim Sci.* 2011; 89:1922–1929.
 51. Wadstrom T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B. Surface properties of Lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Bacteriol.* 1987; 62:513-520.
 52. Walker W. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000; 30:2-7.

53. Woese C R, Stackebrand E, Macke ET. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. 1985. Syst Appl Microbiol. 6:143-151.
54. Wang B, Wei H, Yuan J, Li Q, Li Y, Li N, Li J. Identification of a surface protein from *Lactobacillus reuteri* JCM1081 that adheres to porcine gastric mucin and human enterocyte-like HT-29 cells. Curr Microbiol. 2008; 57: 33–38.
55. Wang A, Yi X, Yu H, Dong B, Qiao S. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum in vitro* and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. J Appl Microbiol. 2009; 107: 1140–1148.
56. Wang X, Yang F, Liu C, Zhou H, Wu G, Qiao S, Li D, Wang J. Dietary supplementation with the probiotic *Lactobacillus fermentum* I5007 and the antibiotic aureomycin differentially affects the small intestinal proteomes of weanling piglets. J Nutr. 2012; 142: 7–13.

NOTA BIOGRÁFICA

LUGAR Y FECHA DE NACIMIENTO

Distrito de Amarilis, provincia de Huánuco, departamento de Huánuco – Perú

19 de mayo de 1989

CENTRO EDUCATIVO DE EDUCACIÓN SECUNDARIA

José Carlos Mariátegui “EL AMAUTA” – Amarilis

UNIVERSIDAD

Universidad nacional Hermilio Valdizán

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Escuela Académico Profesional De Medicina Veterinaria



UNIVERSIDAD NACIONAL "HERMILIO VALDIZÁN" - HUÁNUCO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En la ciudad de Huánuco, Cayhuayna - Distrito de Pillco Marca, a los cinco días del mes de setiembre del 2016, siendo las 11:10 a.m. horas, en cumplimiento al Reglamento de Grados y Títulos se reunieron en el Auditorio de la Facultad, los Miembros integrantes del Jurado examinador para proceder a la Evaluación de Sustentación de la Tesis Titulada: "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DETERMINACIÓN DEL CARÁCTER PROBIÓTICO DE *Lactobacillus* spp., AISLADO DE LA MICROBIOTA GASTROINTESTINAL DEL LECHÓN DESTETADO", de la Bachiller Lourdes VÁSQUEZ ROJAS para OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO, estando integrado por los siguientes miembros:

- | | |
|--------------------------------|------------|
| • Mg. José GOICOCHEA VARGAS | PRESIDENTE |
| • MV. Rosel APAESTEGUI LIVAQUE | SECRETARIO |
| • MV. Anselmo CANCHES GONZALES | VOCAL |

Finalizado el acto de sustentación, los miembros del Jurado procedieron a la calificación, cuyo resultado fue: APROBADO, con la nota de Dieciocho (18), Con el calificativo de: MUY BUENO.

Con lo que se dio por finalizado el proceso de Evaluación de Sustentación de Tesis. Siendo a horas 12:15 p.m., en fe de la cual firmamos.

Mg. José GOICOCHEA VARGAS
PRESIDENTE

MV. Rosel APAESTEGUI LIVAQUE
SECRETARIO

MV. Anselmo CANCHES GONZALES
VOCAL

C.c.
Jurados (3)/Asesor/Interesado/Archivo