FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

Determinación de producción de bacteriocinas a partir de Lactobacillus casei

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de

INGENIERO EN ALIMENTOS

Autor:

DIEGO HERNÁN MONTERO FLOR

Director:

CLAUDIO ESTEBAN SÁNCHEZ JAUREGUI.

CUENCA, ECUADOR

2016

DEDICATORIA

Cada palabra en mi trabajo está dedicado a mis padres, hermanos y sobrinas, que los quiero demasiado y que siempre están presentes en cada uno de los pasos que voy dando en esta vida.

AGRADECIMIENTOS

A quien siempre agradeceré de cada paso que voy dando es a Dios y la razón principal es porque todo lo hace posible en su nombre y siempre se encuentra presente en cada caída y lo mejor de todo es que se encuentra en los mejores momentos como el que lo estoy viviendo que él los organiza para mí.

Mis personas favoritas e importantes y a las que les debo todo es a mis padres José y Betty que les agradezco por compartir todo lo que ellos tienen para sus hijos que seamos personas grandes y no hablo de cosas materiales sino hablo de amor que siempre nos brindan y que con ese amor nos hacen personas.

Mis hermanos y cuñado Gianna, Mónica, José, Andrea y Patricio, son otras personas importantes y las que me muestran con sus ejemplos de vida me demuestran que existen personas perfectas y que espero ser como ellos.

Unos angelitos que llegaron y que no llegaron pero que me cuidan son mis sobrinas tu Ana Paula que estás viéndome desde el cielo y mis tres hermosas chiquitas Ana Sofía, María Paula y Victoria que son mi orgullo cada una de ellas les digo gracias por quererme.

En este trayecto de mi trabajo de graduación encontré muchos amigos nuevos a los que agradezco demasiado y estimo como si fueran mi familia ellos son Claudio S, María Fernanda R, Mónica T, Diego V, Ximena O, Johanna T, Fernando L, Miguel C, Marco L. Cada uno aporto con tranquilidad, felicidad, risas, conocimiento y más, que me fueron de gran ayuda en todo este camino.

Agradezco a mis amigos y amigas que son tantos que necesitara mil hojas para describir lo que aportan en mi vida cada uno de ellos lo que si en general lo que me daban era tranquilidad, positivismo y ánimos de seguir adelante así que solamente colocare sus nombres Juan C, Omar A, Mirian A, Julio P, María M, Fernando C, Diego A, Javier R, Wilson S, Santiago C, Carlos E, Carolina M, Sebastián Q, Jonathan C, Salome V, Gabriela G, Paulo P, Cristina B, Ariolfo O, José C y que espero que sigan haciendo de mi vida algo grande con personas especiales.

Y por último solo pondré 4 silabas que forman a alguien especial que nunca saldrá de mi corazón y de mi mente que no se encuentra en este mundo pero que significa todo para mi A.C.M.

Por eso y por muchas cosas más, lo último que me queda decir es GRACIAS….

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA ii
AGRADECIMIENTOS iii
RESUMEN x
ABSTRACT xi
INTRODUCCIÓN 1
OBJETIVOS 2
OBJETIVO GENERAL 2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 2

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO 3

1.1 Bacterias Acido Lácticas 3
1.1.1 Definición y Clasificación 3
1.1.2. Generalidades 4
1.1.3 Propiedades y Características de las BAL 6
1.1.4 *Lactobacillus Casei* 9
1.1.5 Estabilidad al pH y temperatura 10
1.1.6. Aplicación en alimentos 10
1.1.7 Factores que afectan al crecimiento de las BAL 10
1.2. Bacteriocinas 11
1.2.1 Definición 11
1.2.2 Características de las Bacteriocinas 12
1.2.3. Modo de acción 16
1.2.4 Tipos de Bacteriocinas 19
1.2.5 Métodos moleculares de detección de bacterias 20
1.2.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 20
1.2.5.2 Electroforesis en geles de agarosa 21

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA..... 23

2.1. Ubicación del experimento 23
2.1.1. Material experimental 23
2.1.2. Equipos, materiales e instalaciones. 23
2.1.2.1. Equipos 23
2.1.2.2. Materiales de laboratorio 24
2.1.2.3 Reactivos 24
2.1.2.4. Aditivos e insumos 25
2.1.2.5. Instalaciones 25
2.2. Métodos de Análisis 25
2.2.1 Activación de cepas 25
2.2.2. Verificación de bacterias 28
2.2.2.1. Tinción de Gram 28
2.2.2.2. Caracterización mediante ADN 30
2.2.2.2.1. Extracción de ADN 30
2.2.2.2.2. PCR 33
2.2.2.2.3. Electroforesis 34
2.2.2.3. Determinación de actividad antimicrobiana 38
2.2.2.3.1. Producción y extracción de bacteriocinas 38
2.2.2.3.2. Pruebas de inhibición 39
2.2.2.4. Cuantificación de bacteriocinas 40

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 42

3.1 Activación de las BAL 42
3.2 Tinción de Gram 42
3.3 ADN Resultados. 43
3.4. Pruebas de inhibición. Resultados 44
3.5 Bradfor. Resultados 45

CONCLUSIONES..... 49
GLOSARIO 50

BIBLIOGRAFÍA **51**
ANEXOS **54**

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1 Ensayo realizado en medio líquido de bacteriocinas a partir de L. pentosus contra pseudomas y bacilos 14
Fig. 1.2 Ensayo realizado en medio líquido de bacteriocinas a partir de L. helveticus contra pseudomas y bacilos 15
Fig. 1.3 Ensayos realizados en medio líquido de bacteriocinas producidas a partir de L. plantarum 16
Fig. 1.4 Modo de acción de bacteriocinas 18
Fig. 2.1 Lactobacillus casei ATCC 334 Y 393 26
Fig. 2.2 Mcfarland 2 y concentración de bacterias 27
Fig. 2.3 Leche en polvo reconstituida con tiamina y citrato de sodio estéril 27
Fig. 2.4 Réplicas de crecimiento de bacterias en leche en polvo 28
Fig. 2.5 Crecimiento de bacterias en leche 28
Fig. 2.6 Cubetas de tinción de Gram 29
Fig. 2.7 Microscopio OLYMPUS CX22LED 30
Fig. 2.8 Kit de extracción de ADN 32
Fig. 2.9 Primers 16S y platinum blue PCR 1X 33
Fig. 2.10 Programa para PCR para 16S 34
Fig. 2.11 Gel de agarosa 1% 36
Fig. 2.12 Electroforesis ADN gel de agarosa 37
Fig. 2.13 Equipo Enduro GPS 37
Fig. 2.14 Tubos Eppendorf para crecimiento de bacteriocinas 38
Fig. 2.15 Bacterias patógenas escogidas y estandarizadas (Salmonella, Listeria, E.coli) 39
Fig. 2.16 Método de Bradford 41
Fig. 3.1 Lactobacillus casei ATCC 334 42
Fig. 3.2 Lactobacillus casei ATCC 393 43
Fig. 3.3 Corrida gel de agarosa 44
Fig. 3.4 Curva de calibración Bradford 46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla. 1.1 Exigencias para crecimiento de bacterias ácido lácticas 5
Tabla 1.2 Bacterias Ácido Lácticas homofermentativas y heterofermentativas 8
Tabla 2.1 Preparación de las soluciones para la PCR 33
Tabla 2.2 LADDER, muestras y blanco 36
Tabla 2.3 Preparación del reactivo de Bradford para medida en espectofotómetro .. 40
Tabla 3.1 Lactobacillus casei ATCC 334 45
Tabla 3.2 Lactobacillus casei ATCC 393 45
Tabla 3.3 Absorbancia y concentración en ppm 46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Pipeteo Electroféresis 54
Anexo 2 Uso de equipo para PCR 55
Anexo 3 Preparación de tubos para PCR 55
Anexo 4 Cámara de electroféresis 56
Anexo 5 Preparación de tubos para Bacteriocinas 57
Anexo 6 Equipo de electroféresis 57
Anexo 7 Muestra de ADN 58
Anexo 8 Pruebas de inhibición a 30° 58
Anexo 9 Preparación gel agarosa 59
Anexo 10 Ladder 100 bp 60
Anexo 11 Adición de muestra de ADN en gel de agarosa 61
Anexo 12 PCR 62
Anexo 13 Cubetas para espectrofotómetro 62
Anexo 14 Inoculación de bacterias patógenas 63
Anexo 15 Master Mix 64
Anexo 16 Crecimiento de bacterias lácticas 65
Anexo 17 Fotografía en trasiluminador 66
Anexo 18 Índice de Mcfarland 67
Anexo 19 Pruebas de inhibición a 37° 68
Anexo 20 Tinción de Gram 69
Anexo 21 Análisis en totallab 70

DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A PARTIR DE LACTOBACILLUS CASEI

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo, determinar cuantitativamente y cualitativamente la producción de bacteriocinas a partir de *LactoBacillus casei*, se utilizaron dos cepas ATCC 334 y 393, las cuales fueron identificadas por tinción de Gram y extracción de ADN, posteriormente comenzó la producción de bacteriocinas utilizando caldo MRS. Las bacteriocinas fueron extraídas por centrifugación y se cuantificaron mediante la técnica de Bradford, obteniéndose 270 y 220 ppm de bacteriocinas respectivamente. Las pruebas de inhibición se realizaron por difusión en agar, utilizándose tres patógenos indicadores *Escherichia coli, Salmonella* y *Listeria* a dos temperaturas de incubación(30 y 37°C). Los mejores resultados se vieron para *Escherichia coli* y *Salmonella*, pero no para *Listeria.*

Palabras claves: *Lactobacillus casei, Bradford, Bacteriocina, Difusión en agar.*

Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

Director del Trabajo de Titulación

Fausto Tobías Parra Parra

Director de Escuela

Diego Hernán Montero Flor

Autor

DETERMINATION OF BACTERIOCINS PODUCTION FROM LACTOBACILLUS CASEI

ABSTRACT

The aim of this study is to quantitatively and qualitatively determine the production of bacteriocins from *Lactobacillus casei.* Two ATCC 334 and 393 strains were used, which were identified by Gram staining procedure and DNA isolation. After that, the production of bacteriocins started by using MRS Broth. Bacteriocins were removed by centrifugation and were quantified by Bradford assay, obtaining 270 and 220 ppm bacteriocin, respectively. Inhibition test were performed by the agar diffusion method by means of three pathogens indicators: *Estrerichia coli, Salmonella* and *Listeria* at two incubation temperatures (30 and 37°C). The best results were observed for *Escherichia coli* and *Salmonella,* but not for *Listeria.*

Keywords: *Lactobacillus casei,* Bradford, Bacteriocin, Agar Diffusion.

Claudio Esteban Sánchez Jáuregui
Thesis Director

Fausto Tobías Parra Parra
School Director

Diego Hernán Montero Flor
Author

UNIVERSIDAD DEL AZUAY
Dpto. Idiomas

Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

Montero Flor Diego Hernán

Trabajo de Titulación

Ing. Claudio Esteban Sánchez Jauregui

Junio, 2016.

DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS A PARTIR DE LACTOBACILLUS CASEI

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos la preocupación del hombre por extender la vida útil de los alimentos, ha llevado a crear nuevos métodos de conservación. Se han desarrollado métodos químicos, físicos, biológicos, los cuales ayudan a estabilizar, de tal manera al alimento, para que su vida de anaquel se extienda y aparte de todo esto que su composición química y sus propiedades reológicas no cambien. Las bacterias acido lácticas en este ámbito han sido muy estudiadas alrededor de los años, en donde muestran pruebas positivas al crear compuestos bioconservadores llamados bacteriocinas que pueden ser utilizados como preservantes en la industria alimentaria; lamentablemente la única bacteriocina aprobada por la FDA es la nisina, por eso se ve la necesidad de investigar posibles bacteriocinas que ayuden de la misma forma y que las siguientes investigaciones colaboren con los diferentes resultados sobre el control microbiológico de diferentes bacterias patógenas. En la Facultad de Ciencia y Tecnología, en la escuela de Ingeniería en Alimentos de la Universidad del Azuay, es el primer trabajo de pregrado relacionado con bacteriocinas con actividad antimicrobiana. Este estudio forma parte del proyecto financiado por la Universidad del Azuay con nombre “Extracción y evaluación de bacteriocinas presentes en bacterias lácticas (LAB) y su uso previsto en alimentos”

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar cuantitativamente y cualitativamente las bacteriocinas producidas por el *Lactobacillus casei.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Activar el *Lactobacillus casei* ATCC 393 Y 334 en caldo MRS.
- Verificar la taxonomía mediante tinción de Gram y corrida de ADN en gel de agarosa.
- Determinar proteína total mediante método de Bradford.
- Evaluar el poder bactericida de las bacteriocinas producidas.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Bacterias Acido Lácticas

1.1.1 Definición y Clasificación

Las bacterias acido lácticas (BAL) son microorganismos Gram Positivos de forma de cocos, que ayudan a la fermentación de alimentos como le leche, cárnicos y ciertos vegetales con el fin de conseguir alimentos derivados de los anteriores, tales como el yogur, quesos, embutidos, encurtidos, licores como la cerveza o vinos. En todos los alimentos, las BAL ayudan a mejorar las propiedades a nivel sensorial (olor, sabor, textura) y son buenas para la salud si son consumidas en proporciones apropiadas (Ramírez et al., 2011).

Dentro de la clasificación de las BAL, Agudelo, quien cita a Monroy *et al* (2003), destaca como las variedades más relevantes a:

Aerococcus	*Lactosphaera*
Alloiococcus	*Leuconostoc*
Carnobacterium	*Oenococcus*
Dolosigranulun	*Pediococcus*
Enterococcus	*Streptococcus*
Globicatella	*Tetragenococcus*
Lactobacillus	*Vagococcus*
Lactococcus	*Weissella*

1.1.2. Generalidades

Las bacterias acido lácticas (BAL) abarcan una gran variedad de especies. Y dentro de sus características cabe destacar su condición de Gram (+) y catalasa negativa. Para el crecimiento de las BAL las características del ambiente pueden ser desde microaerofilicas hasta una estricta anaerobiosis, sin la formación de esporas (Gonzáles, 2013).

En este mismo orden, se puede destacar que las BAL tienen la particularidad de no poseer citocromos, otra característica muy importante es que no reducen de nitratos a nitritos, forman ácido láctico, etc. En cuanto a lugares significativos donde se pueden encontrar a las BAL, Ramírez, quien cita a Torres, menciona a ciertos alimentos, suelos, vegetación y también se localizan en el sistema digestivo y aparato reproductor femenino de mamíferos (Ramírez *et al.*, 2011).

Después de lo anterior expuesto, es necesario resaltar el requerimiento de nutrientes que las BAL necesitan para su crecimiento. Suelen estar en medios alimenticios como lácteos, cárnicos, bebidas y vegetales, además de encontrarse en membranas mucosas de ciertos animales. Estos microorganismos fermentan en azúcares como la glucosa, aunque existen algunas especies como la *Leuc. citrovorum* que pueden crecer sin hidratos de carbono, pero si necesitan de citrato como fuente de carbono (Mora, García, 2007).

Tabla. 1.1 Exigencias para crecimiento de bacterias ácido lácticas

	Exigencias para crecimiento					
Metabólitos	**Lc. Lastis subesp. Lactis**	**Lc. Lactis subesp. Diacetylactics**	**Lc. Lactis subesp. Cremoris**	**S. thermophilus**	**Lactobacillus**	**Leuc. Cremoris**
Aminoácidos						
Asp	-	-	-	+	+	?
Thr	-	-	-	?	?	?
Ser	-	?	+/-	?	?	+/-
Glu	+	+	+	+/-	+	?
Gly	-	?	+/-	?	?	?
Pro	-	?	+	?	?	?
Ala	-	?	+/-	?	?	+/-
Cys	S	S	+	+	S	+
Val	+	+	+	+	+	+/-
Met	+	+	+	+/-	+	+/-
Ile	+	+	+	+/-	+	+/-
Leu	+	+	+	+	+	+
Tyr	?	?	?	+/-	+	¿?
Phe	+/-	?	+	?	?	+/-
Lys	-	-	+/-	+	+	+/-
His	+	+	+	+	+	?
Trp	?	+/-	?	?	?	?
Arg	+/-	+/-	+/-	?	?	?
Vitaminas						
B12	+	+	+	+	+	?
Biotina	+	+	+	+	+	?
Nicotiamida	+	+	+	+	+	+
Pantotenato	+	+	+	+	+	+
Riboflavina	+	+	+	+	+	+
Tiamina	+	+	+	+	-	+
Piridoxal	+	+	+	+	-	+
Ácido fólico	+	+	+	+	-	+
Ácidos orgánicos						
Ácido acético	+	+	+	?	?	?
Ácido oleico	+	+	+	?	S	?
Ácido orótico	?	?	?	?	S	?

Ácido fórmico	?	?	?	?	S	?
Bases nucleicas						
Hipoxantina	S	-	-	?	-	+
Adenina	S	S	-	?	S	+
Guanina	S	-	-	?	S	+
Timina	S	-	-	?	-	-
Timidina	S	-	-	?	-	-
Uracilo	S	-	-	?	S	+

Fuente: (Mora, García, 2007)

Ciertos minerales son asimilados por las BAL como el magnesio, el cual ayuda a la labor de enzimas encargadas del incremento celular y añade ciertos aromas característicos a dichas bacterias. Por otra parte, el manganeso ayuda a resistir a las BAL del superóxido (O_2^-) además de agregar ciertas fragancias. El hierro no es indispensable en el crecimiento de las BAL pero, al no acumularlo, no se llegan a formar radicales libres y se crea una barrera a peróxidos en altas concentraciones. El calcio, a diferencia del hierro, si llega a crear reservas, no ayuda al crecimiento de las BAL, pero sirve para descomponer cadenas celulares cambiando la forma de ciertas bacterias como la *Lb. acidophilus.* Además, el potasio regulariza el pH y si existe glucosa o arginina, provee de energía (Mora, García, 2007).

1.1.3 Propiedades y Características de las BAL

Las BAL poseen propiedades biosintéticas muy escasas con una demanda considerable de elementos como el carbono y el nitrógeno, en donde se consideran a los productos fermentados como el ambiente más apropiado para su crecimiento gracias a sus condiciones nutritivas favorables. Al mismo tiempo, las BAL son reciprocas con estos alimentos mencionados anteriormente (productos fermentados) ya que son usadas en la industria gracias a que ayudan al mejoramiento de características como el valor nutritivo, texturas y seguridad antimicrobiana. (Gonzales, 2013).

En ese mismo sentido, dentro de las características más relevantes, Gonzales (2013) quien cita a Fuller, señala la resistencia de las BAL a diferentes concentraciones del cloruro de sodio, el desarrollo de las mismas con la ayuda de diferentes nutrientes, su adaptabilidad a diferentes rangos de temperaturas, su resistencia a antibióticos, son capaces de sobrevivir en el tracto gastrointestinal, gracias a las sales biliares que posee y sus bajos pHs.

En cuanto a la particularidad fermentativa que poseen las BAL, existe una subclasificación, en donde se puede distinguir a las homofermentativas y las heterofermentativas, dependiendo del producto de la fermentación. En el caso de las homofermentativas que obtienen como principales productos a la enzima aldolasa y ácido láctico, las más características de este grupo son las *Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Vagococcus* y ciertos *Lactobacillus.* (Ramirez *et a.*, 2011).

En este propósito, Ramírez *et al* (2011), quienes citan a Carr y *col.* establecen que las heterofermentativas, las cuales transforman hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, obteniendo además ácido láctico, acetato, etanol y dióxido de carbono en cantidades representativas. Las más representativas de éste género se encuentran las *Leuconostoc, Oenococcus, Weisella, Carnobacterium, Lactosphaera* y otros *Lactobacillus*.

Tabla 1.2 Bacterias Ácido Lácticas homofermentativas y heterofermentativas

HOMOFERMENTATIVAS		HETEROFERMENTATIVAS	
ORGANISMOS	**CONFIGURACIÓN LACTATO**	**ORGANISMOS**	**CONFIGURACIÓN LACTATO**
Lactobacillus		**Lactobacillus**	
Lb. acidophilus	DL	Lb. brevis	DL
Lb. alimentarius	L(D)	Lb. buchneri	DL
Lb. bulgaricus	D(-)	Lb. cellobiosus	DL
Lb. casei	L(+)	Lb. coprophilus	DL
Lb. coryniformis	DL	Lb. fermentum	DL
Lb. curvatus	DL	Lb. fructivorans	DL
Lb. delbrueckii	D(-)	Lb. hilgardii	DL
Lb. helveticus	DL	Lb. pontis	DL
Lb. jugurti	DL	Lb. sanfranciso	DL
Lb. jensenii	D(-)	Lb. trichoides	DL
Lb. Lactis	D(-)	**Leuconostoc**	
Lb. leichmanii	D(-)	Leuc. cremoris	D(-)
Lb. plantarum	DL	Leuc. dextranicum	D(-)
Lb. salvarius	L(+)	Leuc. lactis	D(-)
Pediococcus		Leuc. mesenteroides	D(-)
P. acidilactici	DL	Leuc. gelidum	D(-)
P. cerevisae	DL	Leuc. camosum	D(-)
P. pentosaceus	DL	Leuc. Mesenteroides subesp. mesenteroides	
P. damnosus		Leuc. Mesenteroides subesp. cremoris	
P. dextrinicus		Leuc. Mesenteroides subesp. dextranicum	
P. inopinatus		Leuc. Argentinum	
P. parvulus		Leuc. Citreum	
Tetragenococcus		Leuc. Fallax	
T. halophilus	L	Leuc. Pseudomesenteroides	
T. muriaticus		**Carnobacterium**	
Streptococcus		C. divergens	
S. bovis	D(-)	C. mobile	
S. thermophilus	D(-)	C. gallinarum	
Lactococcus		C. piscicola	
Lc. lactis subesp. Lactis biovar diacetylactis	L(+)	**Weisella**	
Lc. lactis subesp. cremoris	L(+)	W. confusa	DL
Lc. lactis subesp. hordniae		W. hellenica	D(-)

Lc. garvieae	W. halotolerans	DL
Lc. platarum	W. kandleri	DL
Lc. raffinolactis	W. minor	DL
Vagococcus	W. paramesenteroides	D(-)
V. fluvialis	W. viridescens	DL
V. salmominarum	**Oenococcus**	
	O. oeni	DL

Fuente: (Mora, García, 2007).

1.1.4 *Lactobacillus Casei*

Cartes, (2005) quien cita a Gómez y Malcata, se refiere a esta variedad de bacteria ácido láctica como del tipo Gram +, que no crean esporas, son microaerófilos, su desarrollo óptimo se da bajo condiciones de anaerobiosis o presiones bajas de oxígeno y una concentración de CO_2 del 5 al 10%. Asimismo, la resistencia de este microorganismo frente a los ácidos corresponde a un rango que va de 0,3% hasta 1,9% de acidez titulable.

Como antecedente histórico, García (2012), establece que Beijerinck en el año de 1901 fue el primero en plantear al género *Lactobacillus,* y ya para 1919, el químico y microbiólogo Orla-Jensen realiza una clasificación al mismo, apoyándose en propiedades morfológicas, de desarrollo y del empleo de ciertos tipos de azucares.

La especie *Lactobacillus* contiene casi 100 variedades comprobadas, en donde se evidencia, por su gran diversidad, una gran dificultad para subdividirla taxonómicamente (García, 2012). Resulta oportuno agregar que en cuanto a características físicas se refieren, Cartes (2005), quien cita a Kandler y Weiss, menciona que los extremos de estas bacterias son redondeados, de un tamaño que varía desde los 0,6 a 0,9 por 1,5 a 6 µm, en donde se presentan de manera individual, o agrupados en cadenas cortas de dos o más.

Según Gomes y Malcata, quienes son citados por Cartes (2005), ésta BAL se encuentra distribuida a lo largo del sistema digestivo y genital, considerándose como un elemento importante de la microflora del ser humano. Además, su distribución depende de varios

elementos como el pH, cantidad de oxígeno, nivel de sustratos, secreciones e interacción con otros microorganismos. Este tipo de microorganismo no tiene relación alguna con infecciones gastrointestinales y/o extraintestinales.

1.1.5 Estabilidad al pH y temperatura

En cuanto a temperaturas adecuadas para su crecimiento, el género *Lactobacillus casei* se especifica de 30 a 40°C, no obstante, estas bacterias logran desarrollarse en temperaturas que varían desde los 5 a los 53°C (Rodríguez, Torres, 2006). En ese mismo sentido, el pH ideal para su estabilidad y desarrollo se da en un rango de 5,5 a 6,2, aunque Kandler y Weiss, quienes son citados por Cartes (2005), indican que esta BAL puede desarrollarse a pH inferiores a 5,0.

1.1.6. Aplicación en alimentos

Entre las aplicaciones de éste género, Rodríguez y Torres (2006) quienes citan a Batt, destacan que, en alimentos procesados, como cereales, yogur, olivas y pepinillos ayudan a conservarlos por más tiempo, aumentan cantidades de nutrientes y mejoran características organolépticas como el sabor y aroma. Cabe agregar la eficacia que tiene al estabilizar la microflora intestinal, evita ciertas perturbaciones a nivel intestinal y posee un efecto antidiarreico (Castejón, 2015).

1.1.7 Factores que afectan al crecimiento de las BAL

Existen varias condiciones que pueden llegar a perjudicar el normal crecimiento de las bacterias ácido lácticas en un entorno de fermentación, pero el principal aspecto a considerar, es la temperatura, ya que, dependiendo de ésta, la rapidez de crecimiento varía, además de otros factores como el ambiente en el que se encuentren y el género de BAL que se emplee (Parra, 2010). Otro factor a considerar es su nutrición, puesto que necesitan cantidades considerables de aminoácidos, bases nitrogenadas, vitamina B y carbono. Por lo general, las BAL adquieren su energía de la asimilación de hidratos de carbono, por lo que no crecerían en un entorno pobre en azúcares (Mora, García, 2007).

Según Vázquez *y col.* quienes son citados por Ramírez *et al.* (2011), para una propagación adecuada, es necesaria la presencia de hidratos de carbono como la glucosa, lactosa y algunos aminoácidos, así como vitaminas (en especial del grupo B). Pero también cabe mencionar que algunos productos como la carne, vegetales y masas de cereales son un entorno perfecto para el crecimiento de las BAL.

Además, las vitaminas son elementos que requieren las BAL para su crecimiento. Algunas de las variedades como *Streptococcus y Lactobacillus* incluso necesitan fuentes de vitaminas más complejas que las que requiere un ser humano. En este mismo sentido, las *Lactobacillus* requieren de vitamina B1 (tiamina), vitamina B6 (biotina, piridoxina), y vitamina B12 (cobalamina) y de ahí su empleo en la determinación de las mismas (Mora, Garcia: 2007).

1.2. Bacteriocinas

1.2.1 Definición

Las bacteriocinas son elementos antibacterianos de origen ribosomal que se originan gracias a un gran número de elementos bacterianos. Además, establecen un conjunto complejo de moléculas de origen proteico, las cuales despliegan una labor antimicrobiana en microorganismos susceptibles. Se diferencian de los antibióticos o anticuerpos debido a su condición proteica y en su tarea en variedades taxonómicamente relacionadas. Por lo general, las bacteriocinas no tienen ningún uso para terapias en especies animales ni en el ser humano (Rodríguez, Torres, 2006).

Según otros investigadores, las bacteriocinas son elementos peptídicos que son el resultado de la producción de varias cepas bacterianas; estas, en los últimos años han sido de mucho interés, en especial por la obtención de microorganismos favorables y productores de sustancias opuestas para diferentes aplicaciones en el área de los

alimentos, en la manipulación y producción animal, y en la industria de la acuicultura (Monroy *et al*., 2009).

Las bacteriocinas se descubrieron al principio en la *Escherichia Coli (E. coli)*, pero posteriormente varias muestras de estas sustancias se pudieron observar en varios microorganismos, especialmente de bacterias Gram-positivas. Además, las bacteriocinas componen un grupo múltiple y heterogéneo de proteínas las cuales cambian considerablemente en su espectro anti-microbiano, características bioquímicas, elementos de acción y propiedades a nivel genético. Las bacterias lácticas que se encuentran en ciertos alimentos como la carne de animales y varios subproductos, son los principales encargados de producir bacteriocinas (Moreira, 1993).

Cabe agregar que las bacteriocinas, según estudios realizados por Jaramillo, Meléndez y Sánchez (2010), pueden producirse tomando como base a Lactobacilos y Bifidobacterias, ambas presentes en el sistema digestivo, y que sirven en la industria alimenticia como elementos que contrarrestan efectos adversos de contaminantes presentes en los alimentos, los mismos que son un riesgo para la salud de las personas, pero no alteran las características de los alimentos.

1.2.2 Características de las Bacteriocinas

Las propiedades más importantes que podemos resaltar son la actividad antimicrobiana y su estructura proteica. Y según Moreira quien cita a Rogers, Clarke y col., Hale y Hindsdill y Tagg y col. (1993), indica que varios científicos han destacado que algunos elementos que forman parte del medio de cultivo actúan directamente en la obtención de alguna bacteriocina en especial como el tiempo o la temperatura. En el marco de la observación anterior, se originan mayor cantidad de bacteriocinas cuando la cepa productora se cultiva a su temperatura recomendable de desarrollo y en altas, tiende a eliminar en su totalidad la obtención de bacteriocinas.

En ese mismo sentido, existen bacteriocinas que actúan con terceras enzimas tales como amilasas, lipasas y fosfolipasas, lo que demuestra la diversidad de las bacteriocinas y la atribución de los compuestos no proteicos en su estructura y actividad. En el caso de que sean producidas por bacterias lácticas, las bacteriocinas se vuelven resistentes a la temperatura, lo que les permite conservar su actividad antimicrobiana a temperaturas equivalentes a las de pasteurización y esterilización de la leche (Moreira, 1993).

Para agregar otras características, se tiene que las bacteriocinas se manifiestan estables en pHs con tendencia ácida o en la mitad de la escala de pH, es decir, neutro. En referencia a lo anterior, características como la solubilidad y estabilidad de la Nisina disminuyen de pH 2 hasta 6, el mismo que es un problema para el caso de emplearlo como aditivo en alimentos como lácteos, productos cárnicos, mariscos y conservas en lata (Moreira, 1993).

Resulta que, todas estas son características generales, pero por citar casos específicos, a continuación, se considera ejemplos de características puntuales de bacteriocinas producidas de diferentes bacterias:

En el caso de bacteriocinas producidas por *L. pentosus*, se puede prestar atención a que ejerce una disminución en la Absorbancia y posee un efecto muy potente a nivel bacteriostático, que en otras palabras quiere decir que inhabilita el crecimiento de microorganismos (Jaramillo, Meléndez, Sánchez, 2010):

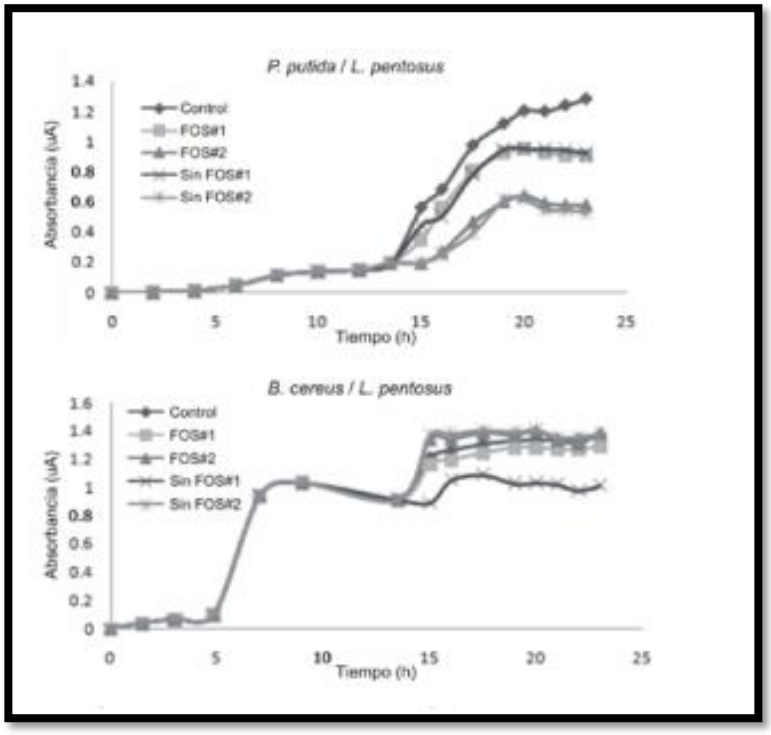


Fig. 1.1 Ensayo realizado en medio líquido de bacteriocinas a partir de L. pentosus contra pseudomas y bacilos

Fuente: (Jaramillo, Meléndez, Sánchez, 2010)

En la misma línea y al igual que las bacteriocinas creadas a partir de *L. pentosus,* las producidas por *L. helveticus*, poseen propiedades óptimas para el inhibimiento de la proliferación de microorganismos y puede observar mejores características en relación a las primeras, puesto que se observa características diferentes en la Absorbancia dando una mayor diferencia en relación con el control y las pruebas realizadas en contraste con otras BAL (Jaramillo, Meléndez, Sánchez, 2010):

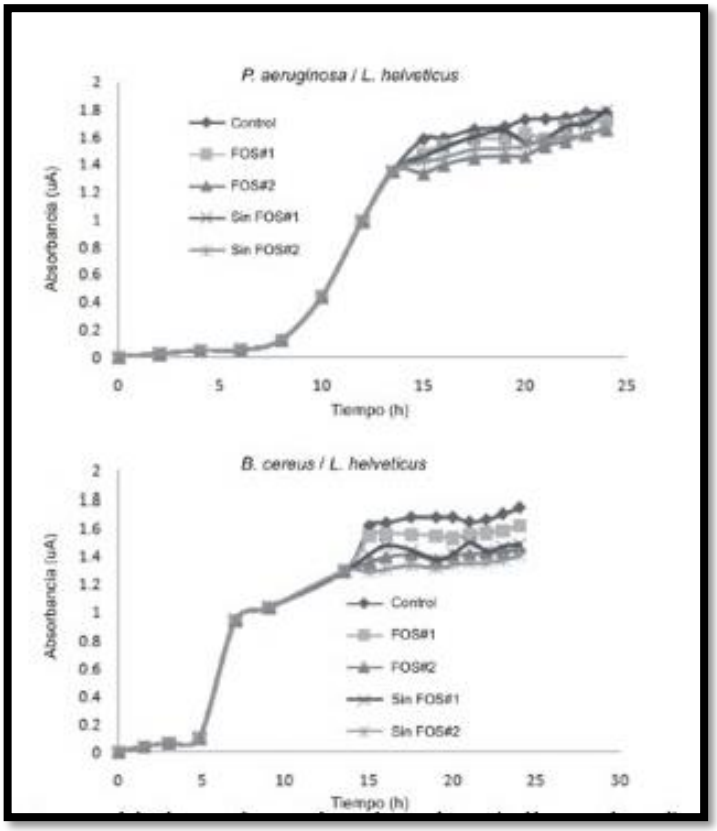


Fig. 1.2 Ensayo realizado en medio líquido de bacteriocinas a partir de L. helveticus contra pseudomas y bacilos

Fuente: (Jaramillo, Meléndez, Sánchez, 2010)

Sin embargo, existen bacteriocinas que no actúan de manera tan eficaz como otras, por ejemplo, las cultivadas a partir de *Lactobacillus plantarum* no poseen efectos relevantes y son pocos prácticos para la lucha contra ciertos microorganismos puesto que según estudios realizados por Aguilar – Rivera y Vanegas – López, estas bacteriocinas provocan una respuesta oscilante en la Absorbancia como se indica en la siguiente figura (Jaramillo, Meléndez, Sánchez, 2010):

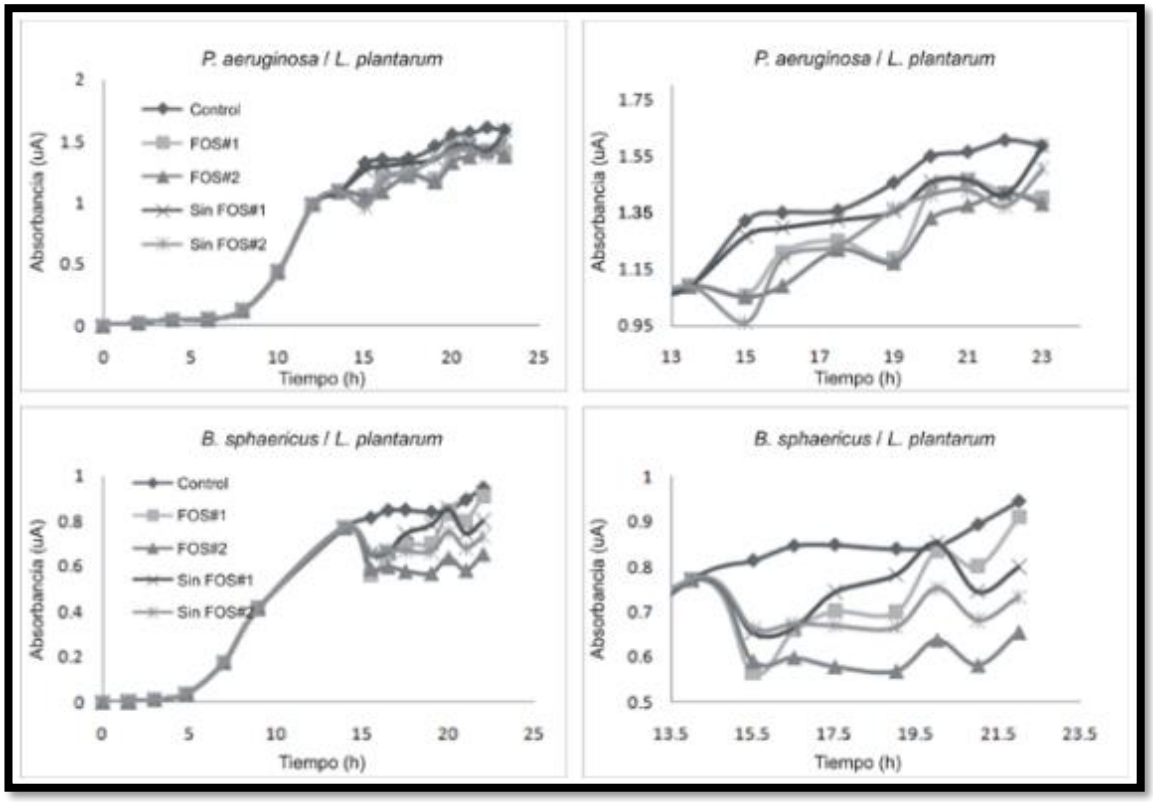


Fig. 1.3 Ensayos realizados en medio líquido de bacteriocinas producidas a partir de L. plantarum

Fuente: (Jaramillo, Meléndez, Sánchez, 2010)

Aun así, se ha comprobado su efectividad en la contención de *Lysteria monocytogenes.* Es evidente entonces, que pueden constituir, las bacteriocinas, como una opción al empleo de antibióticos, a más de ayudar a la reducción de resistencias frente a los mismos y ayuda a contrarrestar los efectos negativos de un gran número de microorganismos nocivos a la salud, que son capaces de oponer resistencia a varios antibióticos que se disponen hoy en día. (Larrea, Flóres, Huapaya, 2007).

1.2.3. Modo de acción

En investigaciones realizadas por Bauza (2012), quien menciona a Cintas *et al*., establece que las bacteriocinas manifiestan una gran acción bactericida en su mayoría

concerniente a la cistina y su contenido, fijando prioritariamente, los siguientes espectros de acción:

- En el primer modo de acción, se tiene bacteriocinas con un margen de inhibición reducido, que inhabilitan bacterias de la misma familia.
- En el segundo modo de acción, se precisa bacteriocinas con un margen medio de inhibición, en donde se inhabilita a varias clases de bacterias ácido lácticas, bacterias Gram-positivas y agentes dañinos que se encuentran en los alimentos.
- Y finalmente se presenta un modo de acción en donde existe un extenso margen inhibitorio, especialmente, hacia bacterias Gram - positivas.

Además, el mismo autor expone que según varios estudios, el efecto bactericida que poseen las bacteriocinas, las ejercen en su mayoría a Gram-positivas y manifiestan distintas maneras de acción conforme a su categorización. Pero por otra parte, hay otro grupo amplio que inhiben a bacterias Gram-negativas, hongos dañinos y virus (Bauza, *et al* 2012).

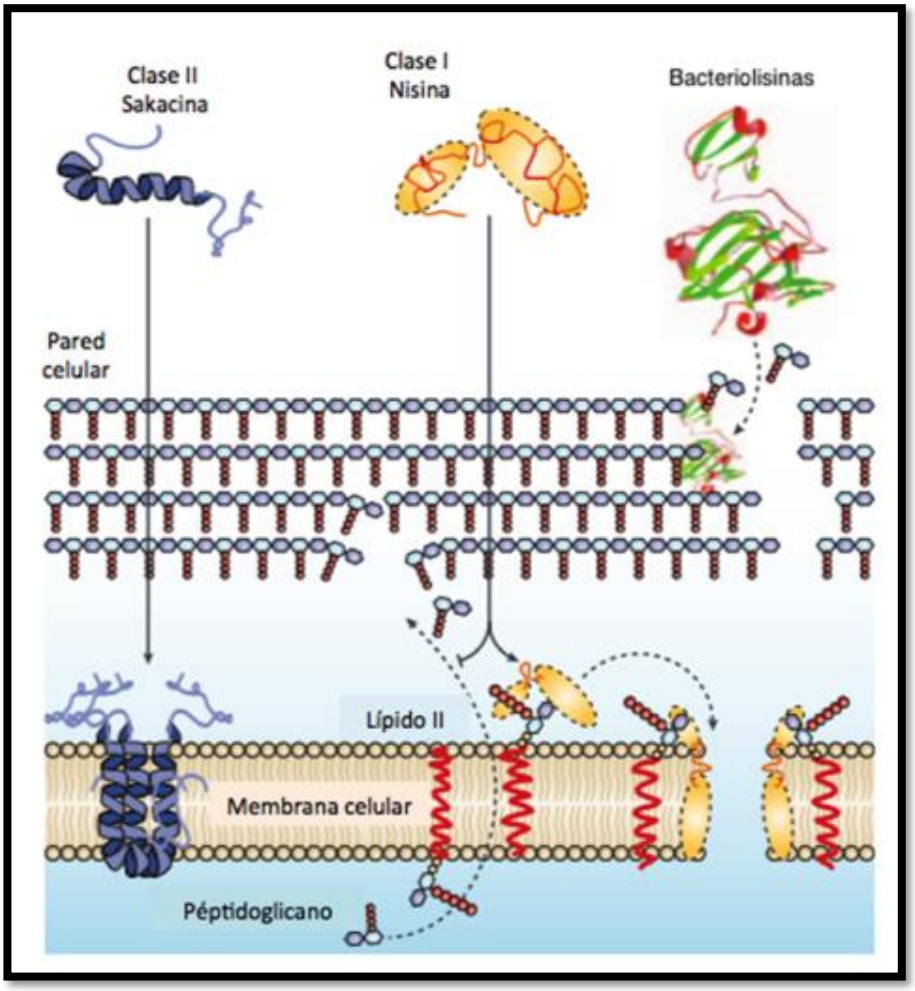


Fig. 1.4 Modo de acción de bacteriocinas

Fuente: (Bauza et al., 2012)

El accionar de los lantibióticos se debe a la desestabilización de las actividades en la membrana citoplasmática debido a la producción de poros. Por otro lado la nisina, bacteriocina lantibiótica se manifiesta de manera doble en su accionar, se enlaza a la pared celular por afinidad electrostática ya que la nisina tiene carga positiva y las paredes celulares, negativa (Bauza el al. 2012).

En ese mismo sentido, cabe indicar que los no lantibióticos comprendidos por dos péptidos en su formación principal se acomodan en la membrana de la célula, matándola.

1.2.4 Tipos de Bacteriocinas

Por las características y propiedades que presentan estas proteínas, sus aplicaciones y campos de acción, existen diferentes tipos:

1.2.4.1 Lantibióticos.- Son péptidos pequeños con cierta actividad en su membrana, poseen aminoácidos no tan frecuentes tal como lantionina, b-metil-lantonina, dehidroalanina (DHA), dehidrobutirina (DHB). Tiene una estabilidad al calor mínima, con péptidos policíclicos (<5kDa). La producción de estos aminoácidos poco usuales se debe a la deshidratación de la serina y la treonina a las que después se les suma los átomos de azufre de la cisteina a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos, que para ejemplificar, tenemos a la nisina. Los lantibióticos se subdividen a su vez en (Monroy et al, 2009):

1.2.4.1.1 IA Péptidos alargados y catiónicos.- Ejercen su acción en la parte de la membrana del microorganismo y abarca a lantibióticos de un solo péptido y engloban también a los que demandan dos péptidos para ejecutar su efecto antimicrobiano por completo (Rodríguez, Torres, 2006).

1.2.4.1.2 IB Péptidos globulares e hidrófobos.- Ejercen su acción inhibiendo la función enzimática a nivel de la membrana (Rodríguez, Torres, 2006).

1.2.4.2 No lantibióticos.- Son un tipo de bacteriocinas sin alteración y lineales. Además de ser péptidos de menor tamaño, (<10kDa) son termoestables. El más representativo de esta clasificación es la pediocina PA-1, que en orden de estudio, viene inmediatamente luego de la nisina (Monroy et al., 2009). Y según investigaciones realizadas por Rodríguez y Torres, los no lantibióticos, se subdividen en 4 grupos:

1.2.4.2.1 En el primer subgrupo se encuentran péptidos activos contra la listeria. Entre las bacteriocinas más representativas se tiene a la pediocina y a sakacina (Rodríguez, Torres, 2006).

1.2.4.2.2 Estas bacteriocinas establecen su modo de acción de acuerdo al trabajo realizado por dos péptidos diferentes como la plantaricina y la lactococina (Rodríguez, Torres, 2006).

1.2.4.2.3 Contienen a las bacteriocinas anteriores, pero solo las que se trasladan mediante un procedimiento sec-dependiente (Rodríguez, Torres, 2006).

1.2.4.2.4 Comprenden a todas las bacteriocinas no lantibióticas que no pueden clasificarse en ninguna de los subgrupos anteriores (Rodríguez, Torres, 2006).

1.2.4.3 Proteínas Termolábiles. - Son consideradas grandes y con un peso considerable a nivel molecular (30 kDa) y entre las más representativas de este grupo se tiene a lantacinas A y B, helveticina, acidofilicina A y caseicina (Rodríguez, Torres, 2006).

1.2.4.4 Bacteriocinas complejas. - Con cierta porción proteica y con varias partes lipídicas o glucídicas, imperiosas para su acción biológica. En este grupo podemos encontrar a la lactocina 27, leucococina S, pediocina SJ-1, entre las más representativas (Rodríguez, Torres, 2006).

1.2.4.5 Y existe un quinto subgrupo que según menciona Monroy *et al*., son bacteriocinas de forma circular y que no han sido alteradas postraduccionalmente. Se puede citar en este caso a la gasericina A y la enterocina AS-48 (Rodríguez, Torres, 2006).

1.2.5 Métodos moleculares de detección de bacterias

1.2.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Por sus siglas en inglés, PCR (*Polymerase Chain Reaction)* se le denomina a la reacción enzimática *in vitro* con la que se puede obtener millones de copia de un fragmento de ADN. La proteína que es aprovechada para el proceso de sintetizar el ADN de manera natural y copiar las cadenas del mismo es el ADN polimerasa. Es necesario mencionar que cuando en la reacción se emplea ADN genómico, se habla

correctamente de un PCR, no obstante, en el caso de emplear ADN complementario (ADNc) procedente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se considera como RT – PCR (*Reverse Transcription – PCR*) o Trascripción inversa de PCR (Tamay de Dios *et al.,* 2013).

En ese mismo sentido, es importante destacar que dentro del proceso de reacción en cadena de la polimerasa, existen tres fases primordiales que la forman: desnaturalización, hibridación y extensión. Además, se emplean el termociclador como herramienta en donde se produce la reacción. Este equipo permite que se den las condiciones necesarias para crear un sistema homogéneo, ya que hace que, factores como el tiempo y la temperatura, permanezcan estables en cada ciclo. Y después de todo el proceso, lo que se obtiene se denomina amplicones, que posteriormente se examinan en geles de agarosa, los cuales determinan si la reacción fue un éxito (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

1.2.5.2 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis es el proceso de traslado de una partícula cargada de un campo eléctrico. Varios aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos tienen grupos ionizables y se encuentran en solución en forma de cationes o de aniones. Cuando se emplea geles, este método de electroforesis, desprende moléculas de ácidos nucleicos o fracciones de las mismas. La poliacrilamida y la agarosa son los polímeros más comunes que se emplean para la separación de las moléculas antes mencionadas. Los geles se sumergen en un tampón que debe encontrarse a un pH alrededor de 8 en la bandeja de electroforesis (Padilla, Carmen *et al*, s/a)

Específicamente para la aplicación en geles de agarosa, se debe agregar bromuro de etidio, el cual es de característica fluorescente en el momento en el que se pone en contacto con luz ultravioleta y se va intercalando entre las bases del ADN. Después de realizado el procedimiento de electroforesis, los resultados se observan con el empleo de luz UV, en donde además se visualizará bandas de los especímenes de ADN aplicado y los *ladders.* De este modo, las moléculas se desplazan al polo positivo puesto que en pHs por encima de 5, tienen carga negativa. Los geles en sí, tienen un

proceder a manera de cedazo el cual desglosa a las moléculas por su dimensión y forma (Padilla, Carmen *et al*, s/a).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología y en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ingeniería en Alimentos ubicado en Facultad de Ciencia y Tecnología perteneciente a la Universidad del Azuay.

2.1.1. Material experimental

Se utilizaron diferentes cepas de *Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus casei* ATCC 334.

2.1.2. Equipos, materiales e instalaciones.

2.1.2.1. Equipos

- Cámara de flujo laminar
- Incubadoras
- Computadora
- Termociclador
- Equipo de electroforesis Agarosa
- Centrifuga refrigerada
- Purificador de agua por osmosis inversa
- Autoclave
- Potenciómetro

- Trasiluminador

2.1.2.2. Materiales de laboratorio

- Azas de siembra
- Cajas Petri
- Pipetas serológicas
- Pipetas automáticas 10, 100, 1000ul
- Puntas estériles de plástico 10, 100, 1000ul
- Mecheros de alcohol
- Tubos eppendorf 0,2 y 1,5ml
- Vasos de precipitación
- Balones de aforo
- Tubos de ensayo

2.1.2.3 Reactivos

- Cepas de *Lactobacillus casei* ATCC 393 y ATCC 334
- Agar MRS
- Agua peptonada
- Hidróxido de sodio 0,1N
- Ácido Clorhídrico 0,1N
- Kit de Extracción de ADN (promega)
- Agarosa
- Gotaq

- Agua Ultrapura

- Primer 16SF y 16SR

- Syber Safe

- TAE (tris base, Ácido acético, EDTA)

- Solución Salina estéril 0,9%

- Estándar de Mcfarland

2.1.2.4. Aditivos e insumos

- Citrato de sodio

- Leche en polvo

- Tiamina

2.1.2.5. Instalaciones

Las instalaciones que se utilizaron, fueron los laboratorios de Biotecnología y Microbiología de la Universidad del Azuay pertenecientes a la Facultad de Ciencia y Tecnología.

2.2. Métodos de Análisis

2.2.1 Activación de cepas.

En el presente estudio la primera etapa del proceso fue la de activar las cepas, por medio de la universidad se adquirió a la empresa MICROBIOLOGICS dos cepas comerciales liofilizadas de *Lactobacillus casei* ATCC 334 y 393, las que se cultivó en Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) a pH 5,5 el cual es descrito en el manual de medios de cultivo Merck, en donde explican que son medios específicos que tienen el propósito de ser empleados para el cultivo de *Lactobacillus* (Merck, 1994).

Se tomó los tubos con las bacterias liofilizadas y se colocaron en el agar MRS mediante hisopado el agar fue previamente plaqueado, posteriormente se incubaron a 37°C durante 72 horas, en donde se necesitó crear un ambiente anaerobio colocando las placas en una jarra de anaerobiosis más Anaerocult previamente activado con 15ml de agua destilada para que desprenda CO2 y ocupe el lugar del oxígeno (Merck, 1994).

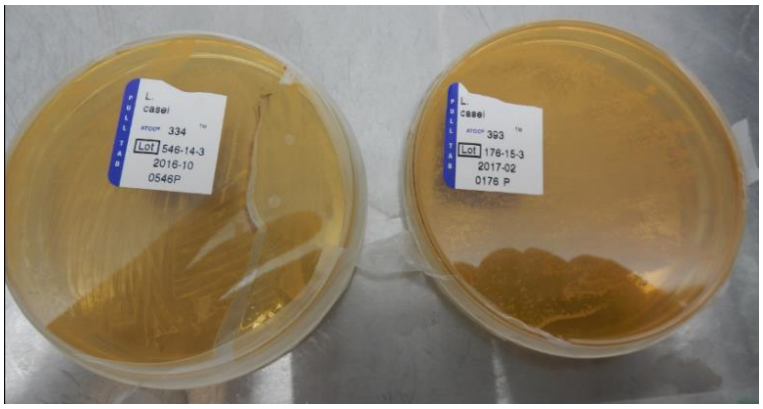


Fig. 2.1 Lactobacillus casei ATCC 334 Y 393

Posteriormente los microorganismos en las placas se fortalecieron para un mayor desempeño en la producción de bacteriocinas.

Se utilizó el estándar número 2 de Mcfarland ($6x10^8$) como indicador para las diferentes concentraciones de microorganismos para el cual se prepararon tubos de ensayo que contenían solución salina estéril al 0,9% de cloruro de sodio.

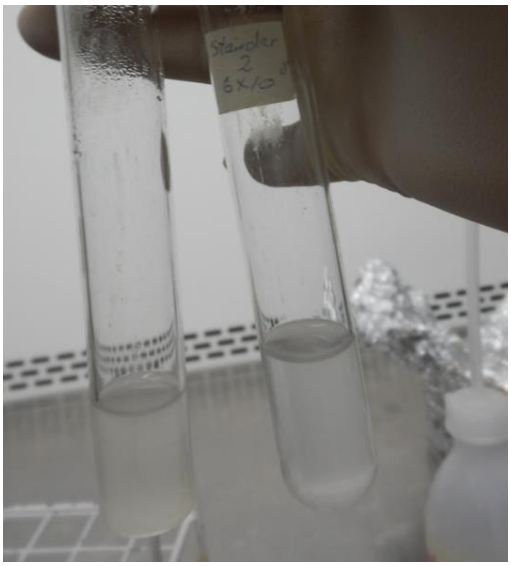


Fig. 2.2 Mcfarland 2 y concentración de bacterias

Para una mejor producción de bacteriocinas siguiendo un protocolo para el análisis, se esterilizó 100ml de leche en polvo reconstituida al 9% de solidos totales y se adicionó citrato de sodio y tiamina ambos al 0,001%.

Fig. 2.3 Leche en polvo reconstituida con tiamina y citrato de sodio estéril

En cada frasco de leche esterilizada de 100ml se adicionó 1ml de cada tubo de ensayo que contenían las bacterias y se colocó en la incubadora a 37°C por 72 horas, este mismo procedimiento se realizó por 4 réplicas y en cada una de ellas se cultivó en agar MRS para comprobar su crecimiento.

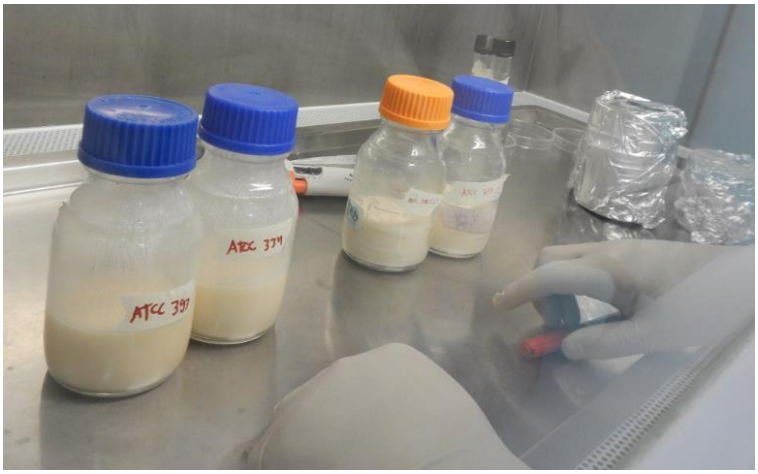


Fig. 2.4 Réplicas de crecimiento de bacterias en leche en polvo

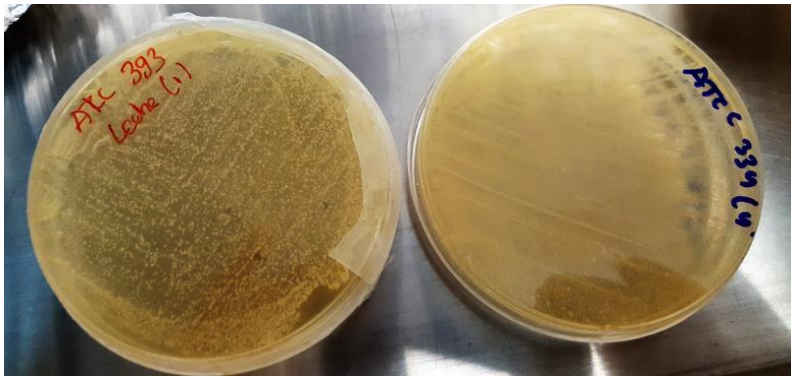


Fig. 2.5 Crecimiento de bacterias en leche

2.2.2. Verificación de bacterias

2.2.2.1. Tinción de Gram

La siguiente técnica fue desarrollada por el doctor Christian Gram, en donde permite de acuerdo a la estructura y el grosor de la pared bacteriana, agrupar en Gram positivos y Gram negativos. Conforme a la estructura de las bacterias las Gram positivas tienen una capa gruesa de peptidoglicán y carecen de membrana en las que tomaran un color morado proveniente del violeta de genciana, mientras que las bacterias Gram negativas

poseen una capa más delgada de peptidoglicán y poseen una membrana externa que se torna de color fucsia proveniente de la fucsina. (Rodríguez *et al*, 2006).

Para la tinción de Gram se usó kits de tinción de Gram los que contenían violeta de genciana, lugol, alcohol cetona y fucsina. Cada uno de estos compuestos se vertió en cubetas de vidrio para tinción de Gram.

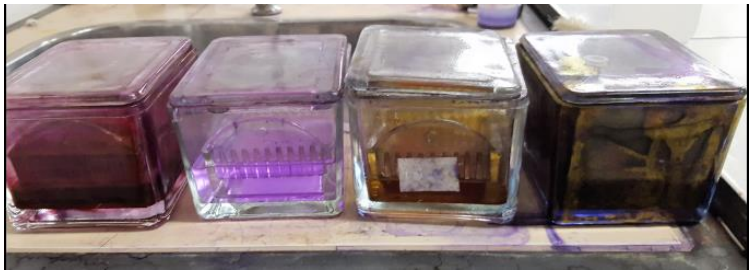


Fig. 2.6 Cubetas de tinción de Gram

Para la preparación de la placa se coloca mediante un aza de siembra una colonia de bacterias y una gota de agua en el portaobjetos, se fijan a la placa mediante calor pasando repetidas veces por la llama del mechero bunsen teniendo en cuenta que no se quemen las bacterias. Comenzando la tinción se colocó la placa de bacterias en la cubeta de tinción contenido violeta de genciana por 1 minuto, la cual va a teñir a todas las bacterias de morado, pasado este tiempo se la retira y se lava con abundante agua destilada. En el segundo paso se colocó en la cubeta con lugol por 1 minuto para que se fije el color morado a las bacterias Gram positivas (Merck, 1994).

Continuando con la técnica se pasó al alcohol cetona durante 1 minuto donde se lavará el color morado de las bacterias no fijadas si existiera el caso sino se mantendrán de color morado, hay que tener cuidado en este paso de no dejar mucho tiempo en el alcohol ya que se puede producir que las bacterias Gram positivas se decoloren. Para terminar la placa se colocó en fucsina durante 1 minuto donde actuará el colorante

tiñendo de rosado a las bacterias Gram negativas ya sea en nuestro caso si existiera alguna contaminación (Merck, 2006).

Para la identificación de las bacterias se utilizó un microscopio de luz LED de la marca Olympus CX22LED:

Fig. 2.7 Microscopio OLYMPUS CX22LED

2.2.2.2. Caracterización mediante ADN

Las técnicas de ADN son muy utilizadas para caracterización mediante corridas de electroforesis en geles de agarosa, a partir de bacterias puras se puede elaborar una base de datos para posibles estudios comparativos por medio de migración de moléculas y determinación de pesos moleculares. Para los diferentes estudios se preparó algunos reactivos como el TAE (tris base, ácido acético, EDTA).

2.2.2.2.1. Extracción de ADN

Para la extracción se utilizó un kit de extracción llamado *Wizard® Genomic DNA Purification kit,* los diferentes pasos se van a explicar a continuación (*Promega Corporation,* 2010):

- Agregar 1ml de caldo de cultivo con la bacteria que vayamos a analizar de 72 horas de crecimiento a un tubo de 1,5ml *eppendorf.*

- Centrifugar a 13000-16000 rcf por 2 minutos hasta obtener un sedimento por la centrifugación. A continuación, remover el sobrenadante.

- Resuspender las células en 480µl de una solución de EDTA 50Mm

- Agregar la enzima en un volumen de 120µl y resuspender las células obtenidas por la centrifugación en los sedimentos, posteriormente pipetear generosamente hasta mezclar la solución para ayudar a la eficiente lisis celular.

- Agregar 600µl de *Nuclei Lysis Solution*. y Generosamente se pipetear hasta resuspender.

- Incubar a 80ºC por 5 minutos para la lisis de las células; y dejar enfriar a temperatura ambiente.

- Agregar 3µl de *RNase Solution* a las células ya efectuada la lisis. Invertir dos a cinco veces para mezclar.

- Incubar a 37ºC de 15-60min. Y enfriar a temperatura ambiente.

- Agregar 200µl de *Protein Precipitation Solution* a la solución anterior. Después realizar un vortex vigorosamente a la máxima velocidad por 20 segundos para mezclar las dos soluciones.

- Incubar la muestra en hielo por 5 minutos. y centrifugar a 13000-16000 rcf por 3 minutos.

- Transferir el sobrenadante contenido el ADN a un tubo limpio de 1.5ml para microcentrífuga, colocado previamente 600µl de isopropanol a temperatura ambiente.

- Mezclar de una manera generosa hasta conseguir una masa visible de ADN y centrifugar a 13000-16000 rcf por 2 minutos.

- Cuidadosamente quitar el sobrenadante y drenar el tubo con papel absorbente. Posteriormente agregar 600µl de Etanol al 70% a temperatura ambiente y agitar varias veces para lavar la masa visible de ADN.

- Centrifugar a 13000-16000 rcf por 2 minutos. Cuidadosamente quitar el Etanol y drenar el tubo mediante un papel absorbente y con la ayuda de una corriente de aire evaporar el alcohol por 10-15 minutos.

- Agregar 100µl de *ADN rehydration solution* al tubo y rehidratarlo al incubar a 65°C por 1 hora, periódicamente mezclar los tubos

- Guardar los tubos a 4°C.

Fig. 2.8 Kit de extracción de ADN

2.2.2.2.2. PCR

La reacción de cadena de polimerasa como se habló en la parte metodológica quiere decir que es para crear varias cadenas de ADN con un gen de interés en nuestro caso utilizamos el primer 16S para bacterias y sé siguió el siguiente protocolo:

Se preparó los tubos *eppendorf* de 0,2µl para PCR expresada en la siguiente tabla:

Tabla 2.1 Preparación de las soluciones para la PCR

COMPUESTO	***L. Bacillus casei* ATCC 334**	***L. Bacillus casei* ATCC 393**	**BLANCO**
***Platinum blue* PCR 1X**	10µl	10µl	10µl
Primer 16SF	2µl	2µl	2µl
Primer 16SR	2µl	2µl	2µl
Agua	5µl	5µl	5µl
ADN	1µl	1µl	X
TOTAL	20µl	20µl	19µl

Fig. 2.9 Primers 16S y platinum blue PCR 1X

Después de que se preparó los diferentes tubos estos se colocaron en el termociclador con el siguiente programa para el cebador 16S expresado en la figura:

Fig. 2.10 Programa para PCR para 16S

El programa tiene un tiempo estimado, como se puede observar, 2 horas con 42 minutos en el que están expresadas las temperaturas de desnaturalización, alineamiento de los cebadores y extensión de la cadena, transcurrido ese tiempo se duplicaron las cadenas de ADN de una manera exponencial y se obtuvo suficiente ADN para su posterior visualización en electroforesis.

2.2.2.2.3. Electroforesis

Para la separación de compuestos por medio de electroforesis se necesitan preparar diferentes compuestos como geles de agarosa, TAE (solución utilizada para la elaboración del gel y líquido contenido que ayuda a la trasmisión de la electricidad en la cámara de electroforesis) (Santos *et al.*, 2014).

En la primera para preparar un litro de TAE 50X se sigue el siguiente procedimiento:

Medir 57,1ml de ácido acético glacial, 100ml de EDTA 0,5M y pesar 242g tris base y para un litro de TAE todos los reactivos después colocar en una botella BOECO para

esterilizar; disolver todos los reactivos y a continuación autoclavar por 15 minutos a 121°C.

Posteriormente se tiene que bajar la concentración de TAE de 50X a TAE 1X para utilizar en la cámara de electroforesis y para preparar el gel de agarosa, entonces se procede de la siguiente manera:

Se bajó la concentración partiendo de la ecuación de las concentraciones siendo las diferentes variables las siguientes

C1= TAE 50X
V1= es el volumen que se toma de TAE 50X
C2= TAE 1X
V2= volumen a que se preparó en este caso 1000ml
A continuación, se muestra el cálculo

$$C1V1=C2V2$$

Ecuación Dilución química

$$V1=\frac{C2V2}{C1}$$

$$V1=\frac{1X*1000ml}{50X}$$

V1=20ml TAE 50X

Entonces para llegar al volumen de 1000ml se coloca 20ml de TAE 50X y se completa con 980ml de agua ultrapura.

Ya que se tiene el reactivo TAE al 1X se procede a preparar un gel de agarosa al 1%, se midió 80ml de TAE 1X y se colocó en un Erlenmeyer de 250ml. Después de eso se

agregó 0,8gr de agarosa para un gel al 1% y se disolvió mediante calor en 5 intervalos de 15 segundos en la microonda.

Posteriormente, se colocó en el Erlenmeyer 8µl de *Syber Safe* 10000X de concentración, procedemos a mezclar el resultado de la solución se colocó en el molde para hacer el gel y se instaló la peineta para formar los pocillos, después de 15 minutos se retiró la peineta.

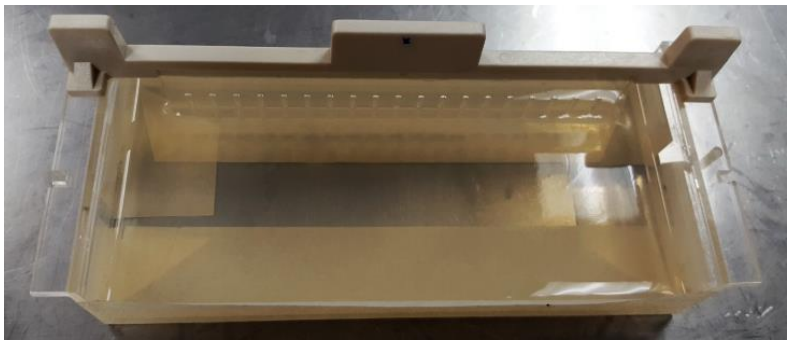


Fig. 2.11 Gel de agarosa 1%

Entonces el gel se llevó a la cámara de electroforesis, mientras se llena la cámara con TAE 1X, se llenan cada pocillo con *LADDER* de 100bp y el resto con las diferentes muestras como se indica en la tabla y se calibra el equipo a 110V durante 25 minutos como se muestra en la fig.17, con el fin de que migren las moléculas de ADN.

Tabla 2.2 LADDER, muestras y blanco

	LADDER	**MUESTRA *L.casei* 334**	**MUESTRA *L.casei* 393**	**BLANCO**
LADDER	4µl	X	X	X
PRODUCTO PCR	X	10µl	10µl	10µl
AGUA	4µl	X	X	X

Fuente: Investigador

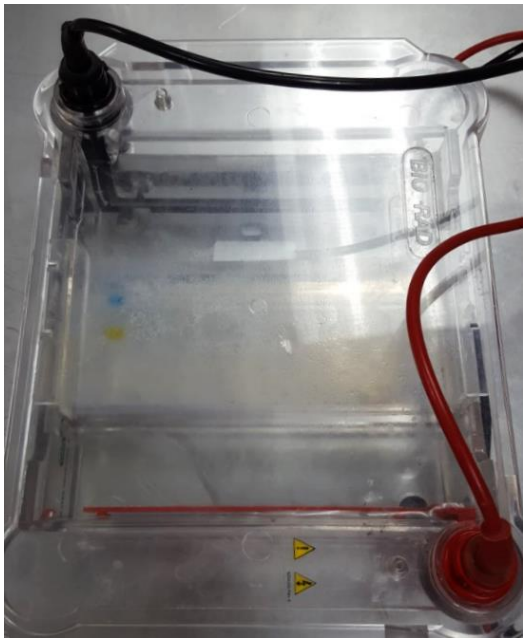


Fig. 2.12 Electroforesis ADN gel de agarosa

Continuando con el análisis, el gel se lleva al equipo ENDURO GDS que es un trasiluminador de luz ultravioleta que se utiliza al revelar los geles de agarosa.

Fig. 2.13 Equipo Enduro GPS

Para terminar, las imágenes tomadas con el trasiluminador se analizaron mediante el programa *Totallab*, midiendo los diferentes recorridos de las moléculas de ADN en el gel de agarosa.

2.2.2.3. Determinación de actividad antimicrobiana

Al determinar la actividad antimicrobiana, se usó la técnica de difusión por disco para obtener halos de inhibición, estas pruebas son muy sencillas de elaborar para lo cual se necesitó seguir el siguiente protocolo.

2.2.2.3.1. Producción y extracción de bacteriocinas

En el procedimiento de producción de bacteriocinas, hubo pequeñas variaciones dependiendo los reactivos y equipos.
Se preparó caldo MRS a pH 5,5 en tubos *Eppendorf* de 1,5ml estériles, siguiendo con la técnica se dejó en incubación a 37°C durante 72 horas y se creó un ambiente anaerobio para el mejor desarrollo de las cepas.

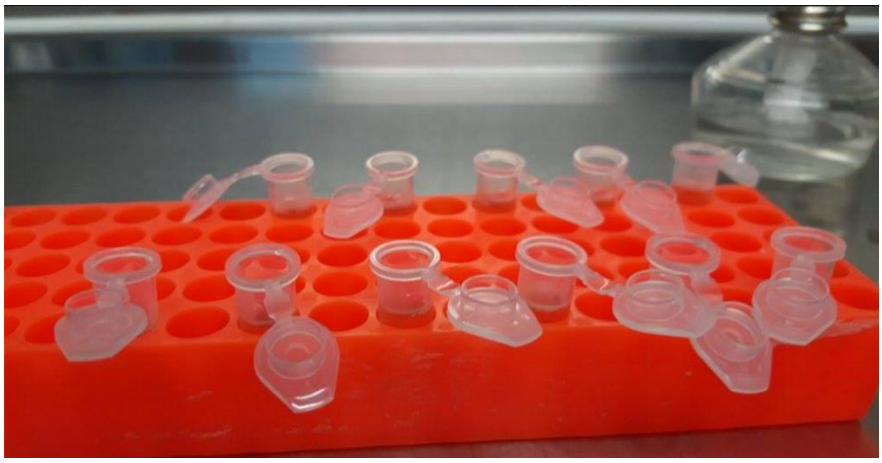


Fig. 2.14 Tubos Eppendorf para crecimiento de bacteriocinas

Posteriormente al crecimiento de los *Lactobacillus* se lleva a centrifugación a 4400rpm durante 35 minutos a 4°C. A continuación, en un tubo estéril se recoge el sobrenadante el cual se regula su pH entre 6 y 7 con NaOH 0,1N, para evitar que exista inhibición por ácidos, y se guarda a 4°C. (Rodríguez, 2006)

2.2.2.3.2. Pruebas de inhibición

La prueba de inhibición se utiliza el ensayo de difusión por disco la técnica se describe a continuación:

Lo primero se debe hacer es seleccionar las colonias en nuestro caso hemos seleccionado *Listeria, Salmonella y E.coli*, posteriormente se debe preparar y estandarizar la suspensión del inoculo, para ello se utiliza el estándar 2 de Mcfarland (corresponde a $6X10^8$ UFC/ml).

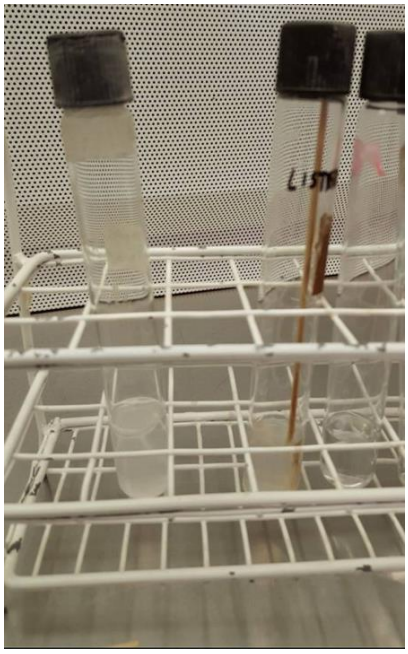


Fig. 2.15 Bacterias patógenas escogidas y estandarizadas (Salmonella, Listeria, E.coli)

Una vez estandarizada las soluciones de bacterias, con la ayuda de un hisopo remojar en la solución y continuar con la difusión en agar Mueller-Hinton, frotando de lado a lado de la placa para que crezcan las bacterias en forma de césped llenando toda la placa.

Posteriormente se colocan los discos con 20µl de la solución de bacteriocinas y se las incuba a 30 y 37°C durante 24 horas para observar y medir los halos de inhibición.

2.2.2.4. Cuantificación de bacteriocinas

Para la cuantificación de bacteriocinas se utilizó el método de Bradford; en este método se realizaron pequeñas variaciones de acuerdo a los reactivos y equipos con los que cuenta la Universidad del Azuay y que se describirá en las recomendaciones. La técnica parte del líquido que se obtuvo en la producción de bacteriocinas mencionado en el trabajo de investigación. En la siguiente tabla, se muestra la preparación del reactivo de Bradford para la cuantificación de proteínas:

Tabla 2.3 Preparación del reactivo de Bradford para medida en espectofotómetro

TUBO	**AGUA (µl)**	**ESTANDAR (µl)**	**MUESTRAS (µl)**	**REACTIVO BRADFOR (ml)**
BLANCO	600	X	X	2
1	450	150	X	2
2	300	300	X	2
3	X	600	X	2
L. Casei ATCC 334	X	X	600	2
L. Casei ATCC 393	X	X	600	2

Posteriormente se dejó que actué el reactivo durante 2 minutos para que genere el color del *Comassie Blue* G-250 fijándose a la proteína en donde se efectuará un viraje de color a azul.

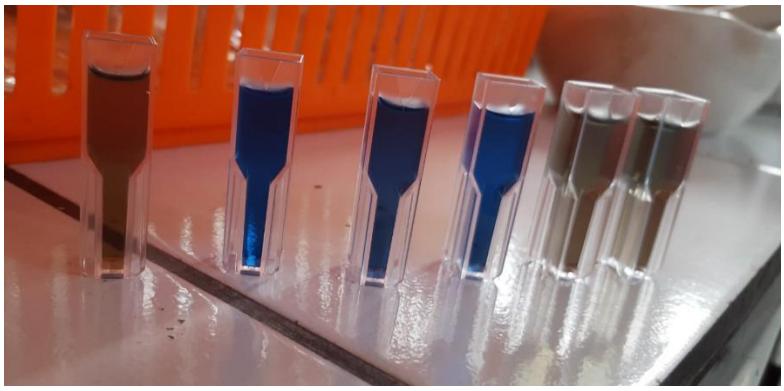


Fig. 2.16 Método de Bradford

CAPÍTULO III

RESULTADOS y DISCUSIÓN

3.1 Activación de las BAL

Después del crecimiento de las BAL de los tipos de cepas de *Lactobacillus casei* ATCC 334 y 393, se obtuvo un incremento de $1X10^5$ UFC/ml, después de 72 horas, por lo que se tomó la decisión de enriquecer el medio para el mejor crecimiento de las bacterias.

3.2 Tinción de Gram

En las tinciones de Gram se obtuvieron diferentes fotografías que se muestran a continuación:

En la fig.3.1 se observa al *Lactobacillus casei* ATCC 334 que tiene una forma de bacilo alargado, Gram positivo, sin presencia de contaminación de ningún tipo de bacterias Gram negativas ni otra clase de morfología, lo que nos da a entender que la activación tuvo buenos resultados para la producción de bacteriocinas:

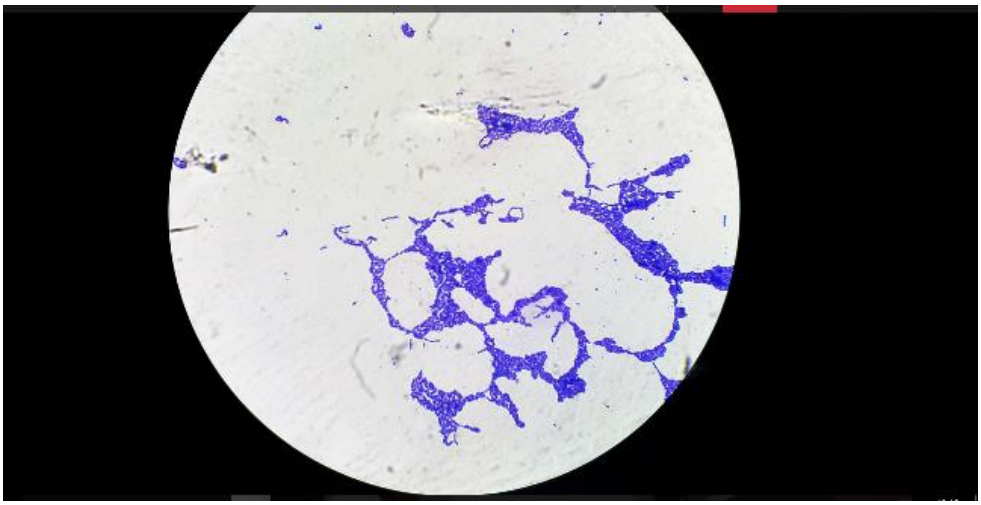


Fig. 3.1 Lactobacillus casei ATCC 334

Posteriormente, se analizó la siguiente imagen del *Lactobacillus casei* ATCC 393 que se presenta en la fig. 3.2, en donde se muestra una morfológica de bacilo alargado, Gram positivo y sin presencia de contaminación de ningún tipo de bacteria Gram negativa ni de ninguna otra clase de morfología, con este resultado se puede entender que son aptos para la producción de bacteriocinas.

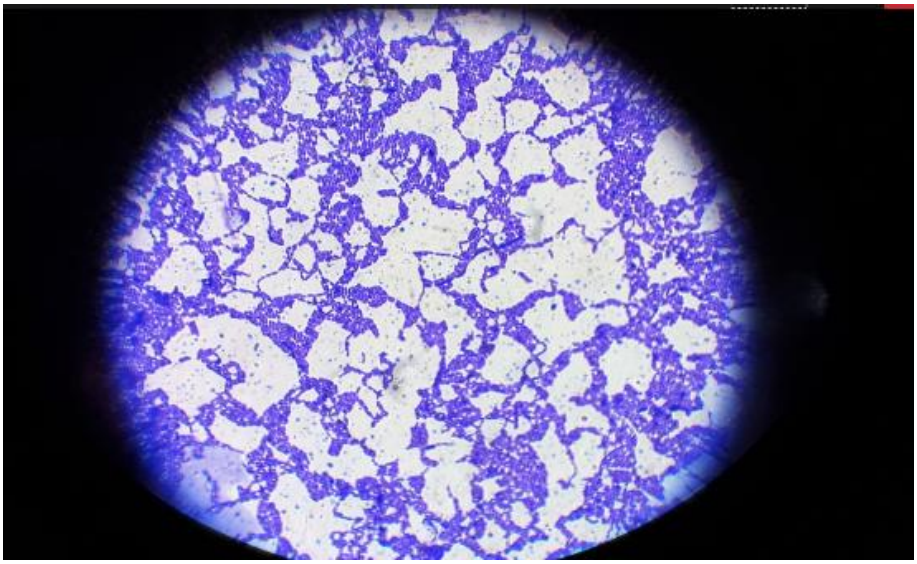


Fig. 3.2 Lactobacillus casei ATCC 393

3.3 ADN Resultados.

Cabe mencionar que, con los resultados del ADN, se consiguió observar a las diferentes bandas del análisis, las mismas que, posteriormente se van a extrapolar para obtener el resultado de los distintos pesos moleculares, similares para los *Lactobacillus casei* ATCC 334 y 393. Se comprobó:

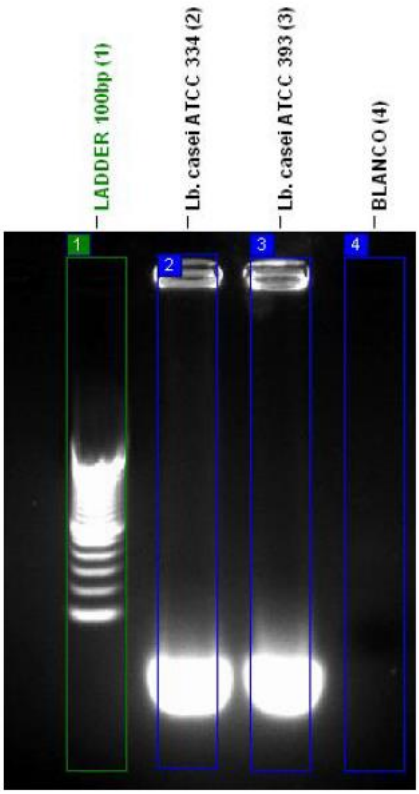


Fig. 3.3 Corrida gel de agarosa

Para los detalles podemos observar el ANEXO 21

3.4. Pruebas de inhibición. Resultados

Para esta prueba experimental se toma como medida base 7mm para una prueba positiva de inhibición, ya que los discos no son estandarizados como los discos comerciales de pruebas de antibiogramas. Las diferentes medidas se observan en las siguientes tablas:

Tabla 3.1 Lactobacillus casei ATCC 334

***Lactobacillus casei* ATCC 334**		
	MEDIDAS A DIFERENTES TEMP	
BACTERIAS	**30°C**	**37°C**
E.coli	10mm	6mm
Salmonella	6mm	6mm
Listeria	6mm	6mm

En el ANEXO 8 podemos observar el halo de inhibición presente en *E.coli* en el agar mueller hinton.

Tabla 3.2 Lactobacillus casei ATCC 393

***Lactobacillus casei* ATCC 393**		
	MEDIDAS A DIFERENTES TEMP	
BACTERIAS	**30°C**	**37°C**
E.coli	8mm	6mm
Salmonella	6mm	8mm
Listeria	6mm	6mm

El resultado que podemos encontrar para *E.coli* podemos observar en el Anexo 8 y para el resultado de *Salmonella* se lo puede observar en el Anexo 19.

3.5 Bradfor. Resultados

Una vez obtenido el color, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV, calibrándolo a 595nm que nos pide la técnica para su correcta lectura. En donde se procedió de la siguiente manera:

Encerar con el blanco como primera lectura y colocamos uno a uno los patrones de concentración conocida.

Para la curva de calibración se utilizó a 0, 125, 250, 500 ppm y se obtuvo las diferentes absorbancias expresadas en la Tabla. 6.

Tabla 3.3 Absorbancia y concentración en ppm

ABSORBANCIA (595nm)	**CONCENTRACIÓN (ppm)**
0	0
0,56	125
1,015	250
1,837	500
1,04	270,0358
0,86	220,6672

Después de obtener todos los valores, se graficó y se obtuvo los valores de concentración de bacteriocinas presentes en el medio de cultivo.

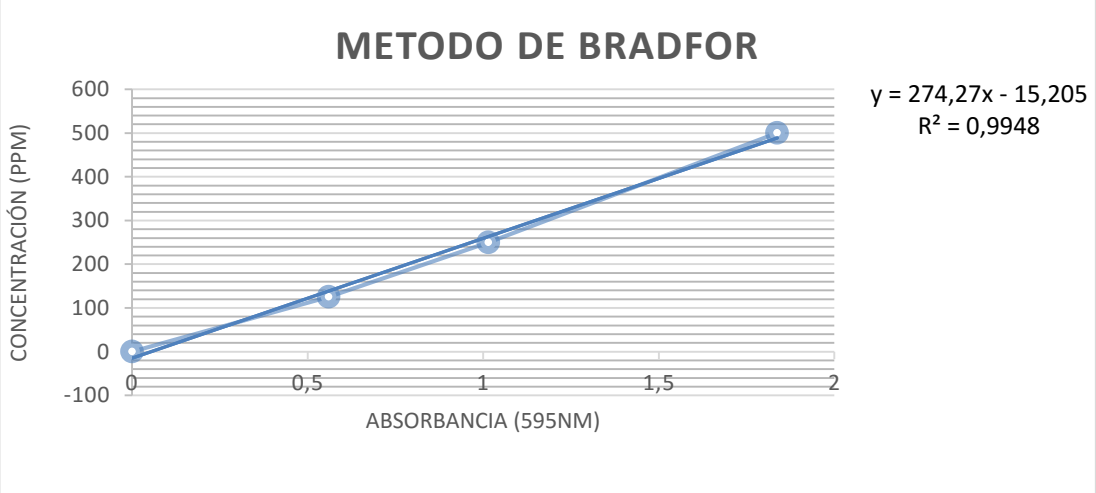


Fig. 3.4 Curva de calibración Bradford

La activación de las bacterias acido lácticas tuvo un buen resultado realizando todas las indicaciones brindadas por el manual de Merck (1994) en donde no se tuvo que realizar ningún cambio de lo ya establecido por el protocolo.

Para las tinciones de Gram se realizó mediante el manual de Merck (1994) se obtuvo un buen desempeño en la tinción de las diferentes bacterias ácido lácticas no existió ningún cambio en el desarrollo de la técnica.

Rodríguez y Torres (2006) en su tesis acerca de la evaluación de sustancias antimicrobianas, en el método de extracción de las bacteriocinas hicieron los ensayos con una concentración posterior a la neutralización del medio que contenía las bacteriocinas, en el caso de la investigación la metodología descrita no funcionó, mediante diferentes pruebas variando la concentración del sustrato se determinó que la concentración del sustrato termina inactivando las propiedades bacteriocinogenicas, para ello se optó por no concentrar la solución y se trabajó con el producto de las bacterias acido lácticas regulado el pH de 6 a 7 para que no exista inhibición por ácidos orgánicos.

En la investigación de Bauza (2012) en su recopilación, explica varias características generales sobre bacteriocinas, brinda datos acerca de la inhibición de las bacteriocinas las que son efectivas en mayor proporción en bacterias Gram positivas patógenas, en el estudio realizado muestra un dato interesante con respecto a la inhibición de bacterias Gram negativas ya que define que las bacterias Gram positivas que pueden ser inhibidas ocurre si el medio ha sido sometido a elevadas temperaturas en donde se destruyen una buena cantidad de bacterias, en esta investigación las bacterias patógenas no fueron sometidas a ningún tratamiento térmico y además fueron usadas en concentraciones elevadas para su crecimiento y existió un comportamiento favorecedor en la inhibición de *E.coli* a una temperatura de 30°C, que fue usada para representar la temperatura del medio ambiente en la que puede encontrarse un alimento en almacenamiento.

En la parte de las pruebas de inhibición Rodríguez (2006) brinda un dato curioso al tomar a una prueba positiva al halo de inhibición mayor a 6mm con un McFarland de 0,5 ($1,5X10^8$ UFC/ml), lo que da una pauta para futuras investigaciones para el mejoramiento de la técnica, en este caso se utilizó un McFarland de 2 ($6X10^8$ UFC/ml) una variante significativa al momento de observar la inhibición de las bacterias patógenas, con lo que se puede definir de una manera más significativa la eliminación de bacterias patógenas a altas concentraciones de microorganismos.

CONCLUSIONES

- Se activó las dos bacterias *Lactobacillus casei* ATCC 334 y 393, primero en caldo MRS y se pudo observar un crecimiento deficiente que llegó a 10^5UFC/ml lo que presento problemas, se tuvo que cambiar el crecimiento de caldo MRS a leche enriquecida con tiamina y usando un tampón de citrato de sodio para su mejor crecimiento.

- La taxonomía se verificó mediante el microscopio su forma de bacilo alargado, Gram positivo en los dos casos las bacterias eran muy similares en su crecimiento, y taxonomía. Conjuntamente lo del ADN para los dos casos se obtuvieron pesos moleculares de 25,9kda y 24,6kda para cada *Lactobacillus casei* ATCC 393 y 334 respectivamente.

- Se determinó la cantidad de proteínas obtenidas de cada bacteria observando la prueba colorimétrica mediante espectrofotometría en la que se obtuvo para el *Lactobacillus casei* ATCC 393 una cantidad de 220ppm y para el *Lactobacillus casei* ATCC 334 se produjo 270ppm en las mismas condiciones y con el mismo método de extracción

- Las pruebas inhibitorias dieron como resultado una prueba positiva en los dos casos, para el *Lactobacillus casei* ATCC 393 inhibió al *E.coli* a 30°C y a la *Salmonella* a 37°C, en el caso del *Lactobacillus casei* ATCC 334 existió inhibición solamente en *E.coli* a 30°C, en los dos casos no se obtuvo inhibición para *Listeria*. Lo que da como conclusión que este género de bacterias produce un compuesto inhibitorio efectivo contra Gram negativas, lo cual es un buen resultado debido a que normalmente estos compuestos son efectivos en su mayoría para Gram positivas.

GLOSARIO

BAL = Bacterias Ácido Lácticas

CMB = Concentración mínima bactericida

kDa = Unidad de masa atómica unificada

Bifidobacterias = bacterias que habitan en los intestinos. Se pueden producir fuera del cuerpo y pueden ingerirse vía oral.

Lactobacilos = Bacterias presentes en el sistema digestivo, urinario y genital, no son dañinas en el organismo. Además, se puede encontrar en derivados lácteos como el yogur.

Lactobacillus Plantarum = Bacterias que realizan fermentación láctica.

KDa = Unidad de masa atómica unificada o dalton

Termolábiles = Sustancias que pierden sus características cuando llegan a una temperatura determinada

Citocromo = proteína útil para el transporte de energía química en todas las células vivas

BIBLIOGRAFÍA

Agudelo, Natalia. *Estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos.* Medellín, 2013.

Bauza, Beristain et al. *Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos.* Puebla, 2012.

Cartes, Paula. *Viabilidad de las Cepas de Lactobacillus casei shirota y Bifidobacterium lactis en un Postre de Leche con Salsa de Cranberry.* Valdivia, 2005.

Castejón, Esperanza. "Probióticos". Barcelona. Internet. *http://www.scpediatria.cat/primaria/wp-content/uploads/PROBIOTICOS.pdf.* Acceso: 28 diciembre 2015.

García, Jorge. *Técnicas moleculares aplicadas a la caracterización y estudio de la supervivencia de bacterias lácticas del yogur.* Valencia, Editorial Universitat Politécnica de Valencia, 2012.

Gonzales, Leticia. "Caracterización de las bacterias lácticas aisladas del queso Genestoso: Identificación, aptitud tecnológica y actividad antimicrobiana. León, 2013.

Jaramillo, Diana, Adelina del Pilar Meléndez y Oscar Sánchez. *Evaluación de la Producción de Bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias.* Bogotá, Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 2010.

Larrea, Hernani, Martha Flóres y José Huapaya. *"Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I".* Lima, Revista Horizonte Médico, 2007.

Merck. *Manual de medios de cultivo.* Darmstadt, 1994.

Monroy, María del Carmen *et al. Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas.* Ciudad de México, 2009.

Mora, Nancy y Andrés García. *Susceptibilidad de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos.* Pachuca, 2007.

Moreira, Wagner. *Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por Pediococcus sp. 347, de origen cárnico.* Madrid, 1993.

Padilla, Carmen *et al.* "Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmidico". Córdova. Internet: *http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf.* Acceso: 05 enero de 2016.

Parra, Ricardo. *Review. Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos.* Tunja, 2010.

Promega Corporation. "*Technical Manual. Wizard® DNA Purification kit".* Madison, WI. 2010. Internet: *https://www.promega.com/~/media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20Protocol.pdf.* Acceso: 06 diciembre de 2015.

Ramírez et al. *Bacterias lácticas Importancia en Alimentos y sus efectos en la salud.* Nayarit. 2011.

Rodriguez, Evelin *et al.* "Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio". Universidad de Costa Rica. 2006. Internet: *http://books.google.es/books?id=vwB0fgirgN0C&pg=PA63&dq=tincion+de+gram&hl=es&sa=X&ei=7fBgVNabLcaqNvLcgrgN&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=tincion%20de%20gram&f=false*. Acceso: 18 de diciembre de 2015.

Rodríguez, Jenny y Lina Torres. *Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño.* Bogotá, 2006.

Rojas, Carolina y Pedro Vargas. *Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria.* San José, Editorial Tecnológica de Costa Rica, 2007.

Santos, Efrén *et al. Trasformación genética en plantas*. *Usos y aplicaciones de genes reporteros / GUS, GFP, LUC.* Guayaquil, 2014.

Tamay de Dios, L. *et al.* "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real". Distrito Federal. 2013.

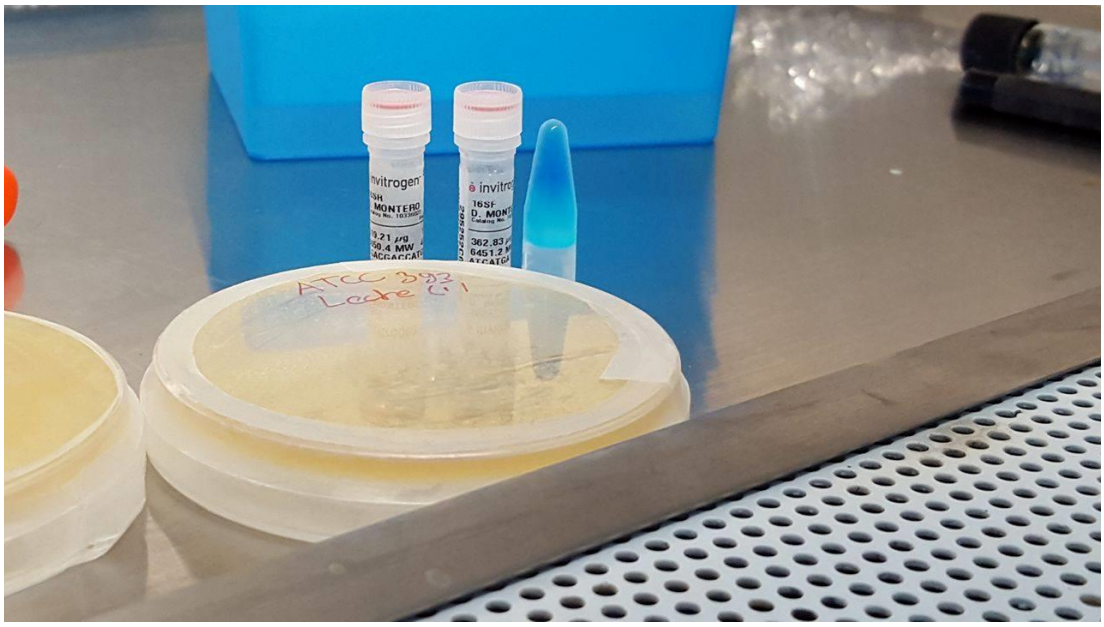
Internet: *http://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf*. Acceso: 05 enero de 2016.

ANEXOS

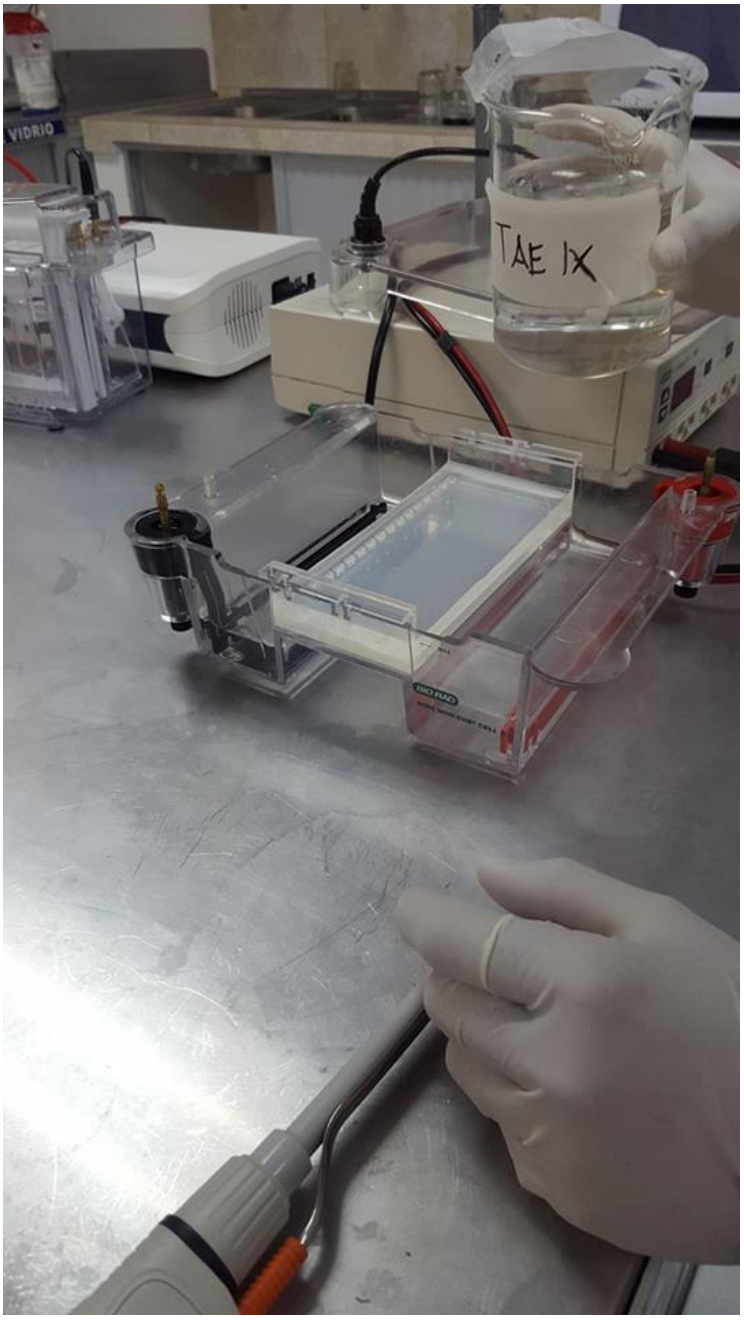
Anexo 1 Pipeteo Electrofóresis

Anexo 2 Uso de equipo para PCR

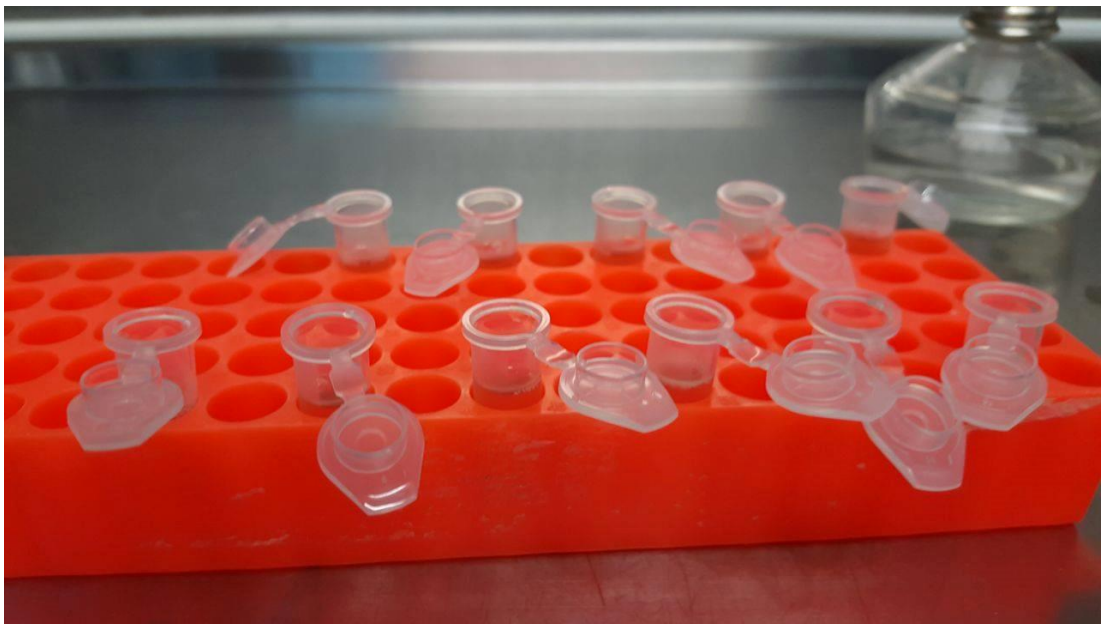
Anexo 3 Preparación de tubos para PCR



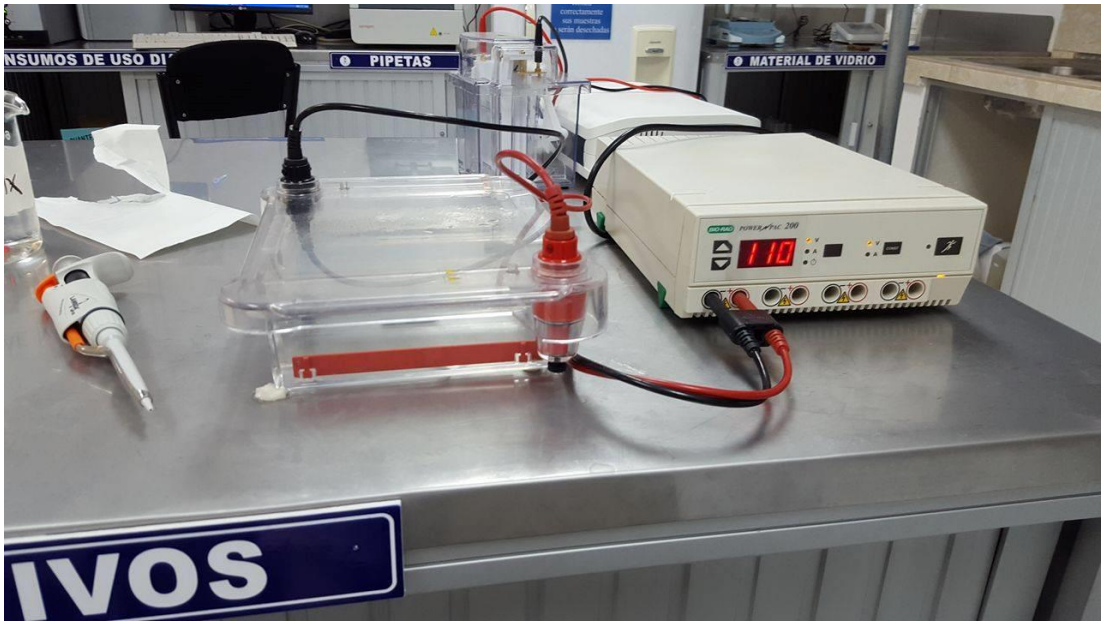
Anexo 4 Cámara de electroféresis



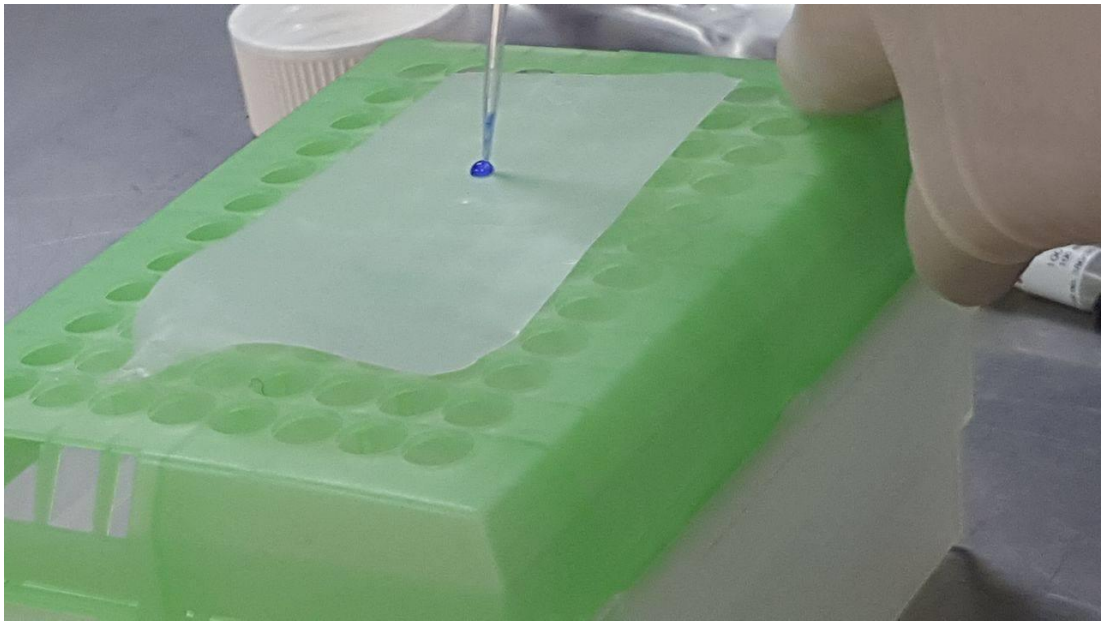
Anexo 5 Preparación de tubos para Bacteriocinas



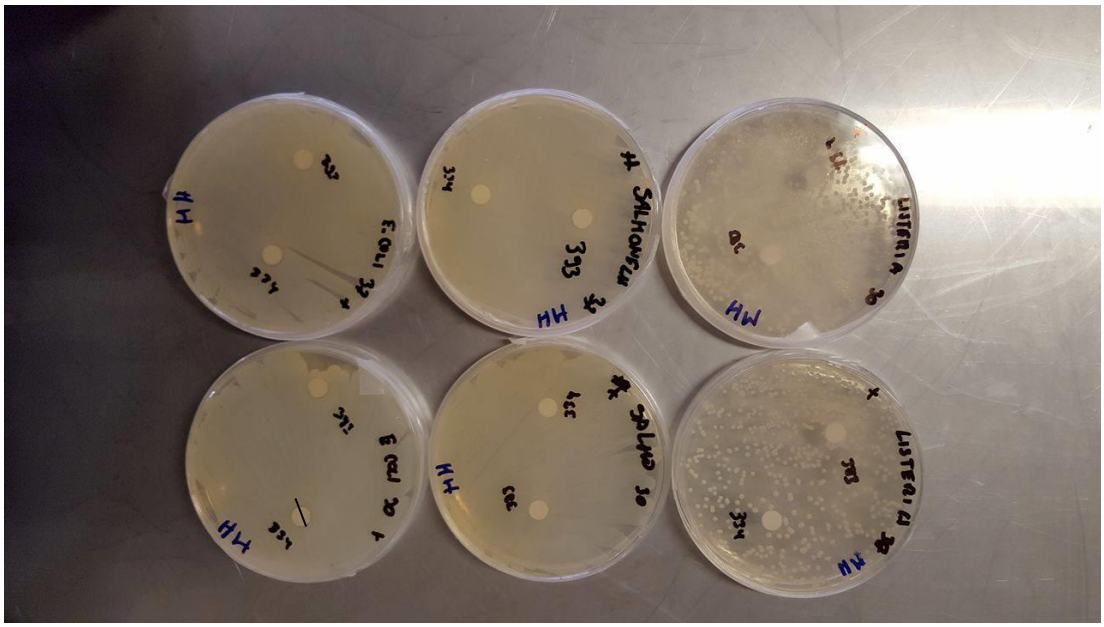
Anexo 6 Equipo de electroforesis



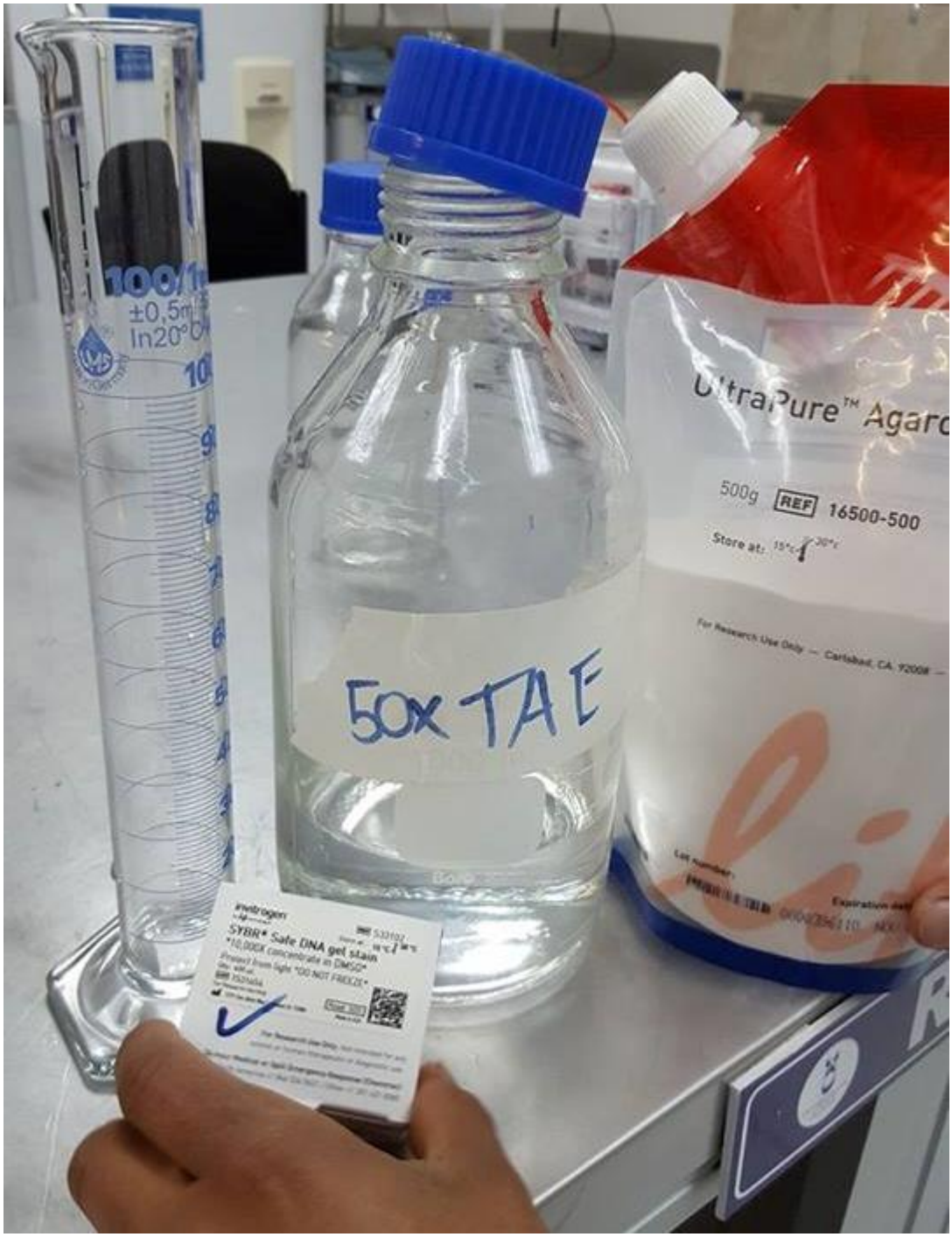
Anexo 7 Muestra de ADN



Anexo 8 Pruebas de inhibición a 30°



Anexo 9 Preparación gel agarosa

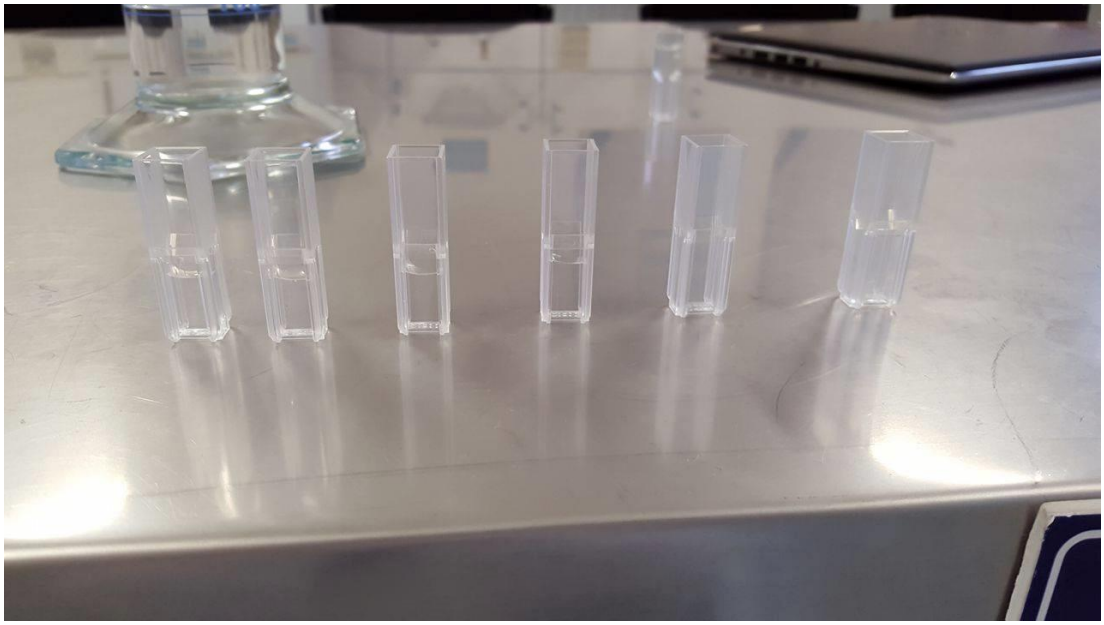


Anexo 10 Ladder 100 bp

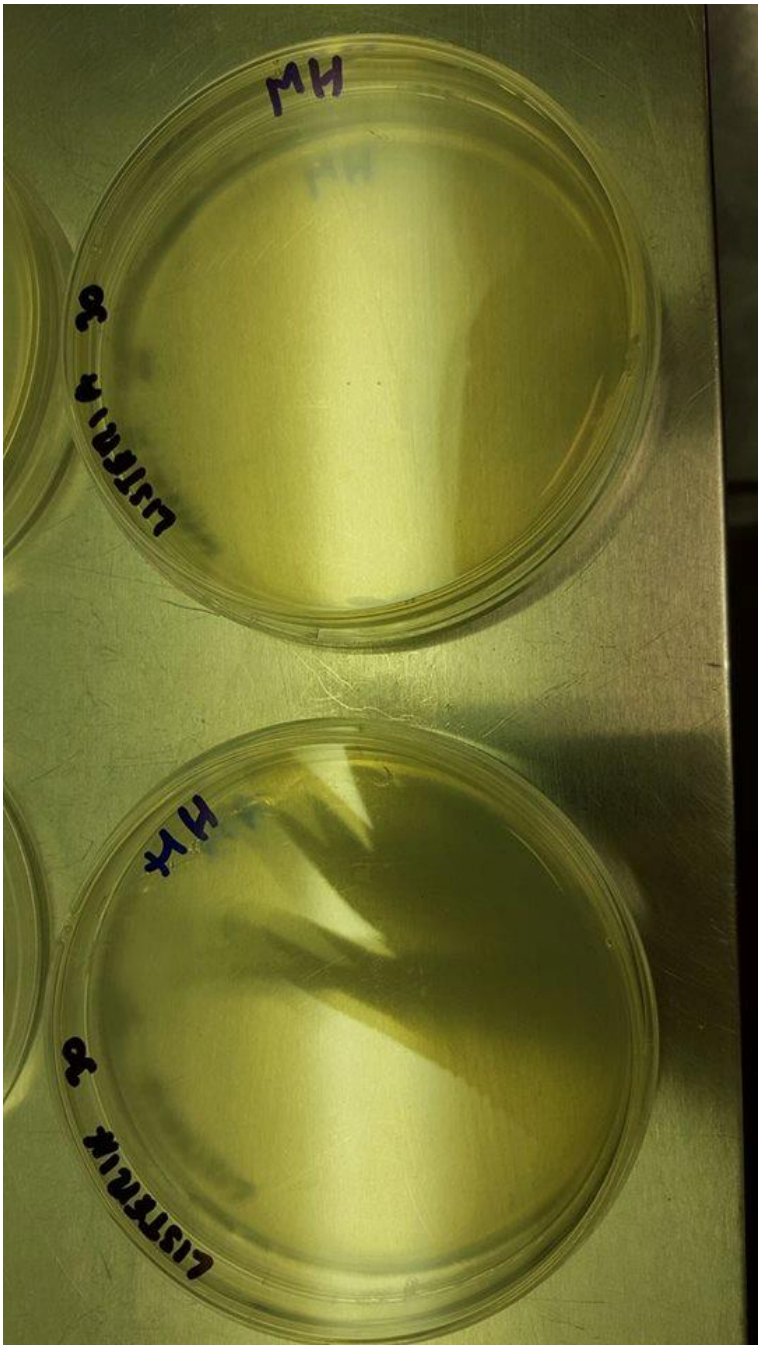
Anexo 11 Adición de muestra de ADN en gel de agarosa

Anexo 12 PCR

Anexo 13 Cubetas para espectrofotómetro



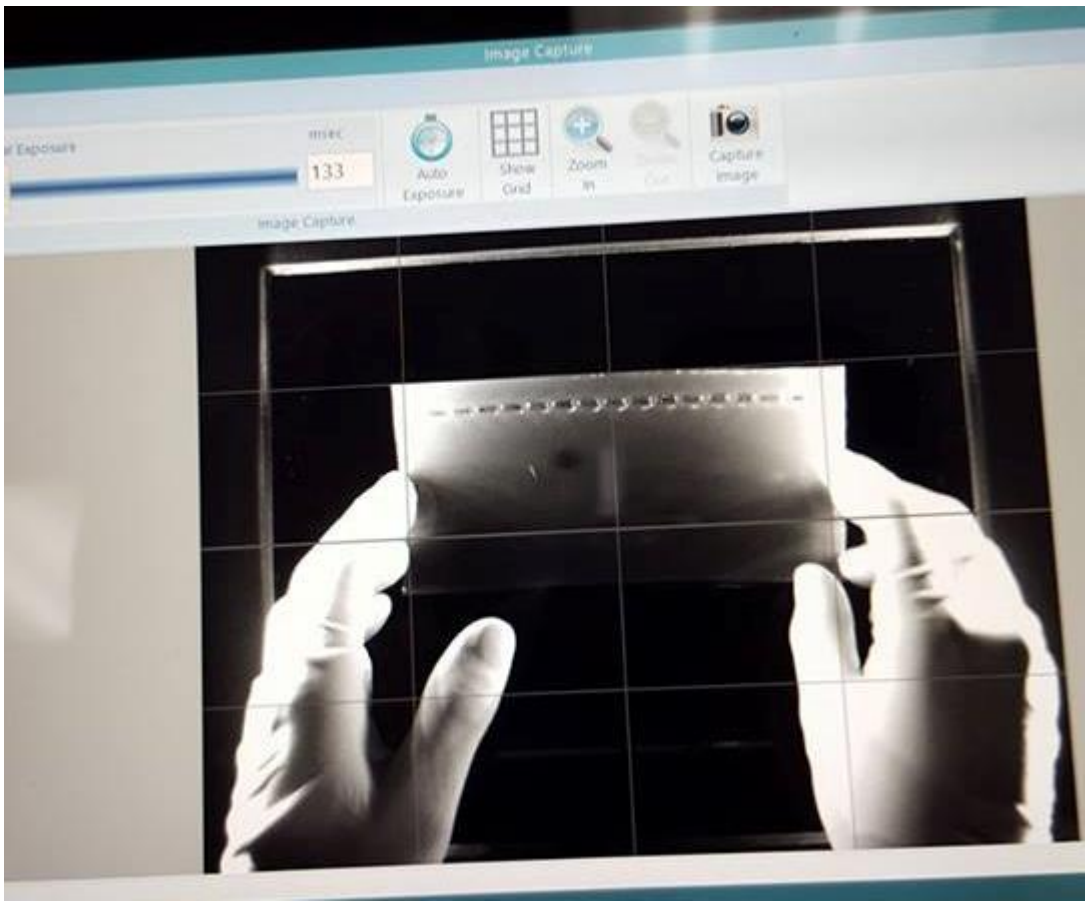
Anexo 14 Inoculación de bacterias patógenas



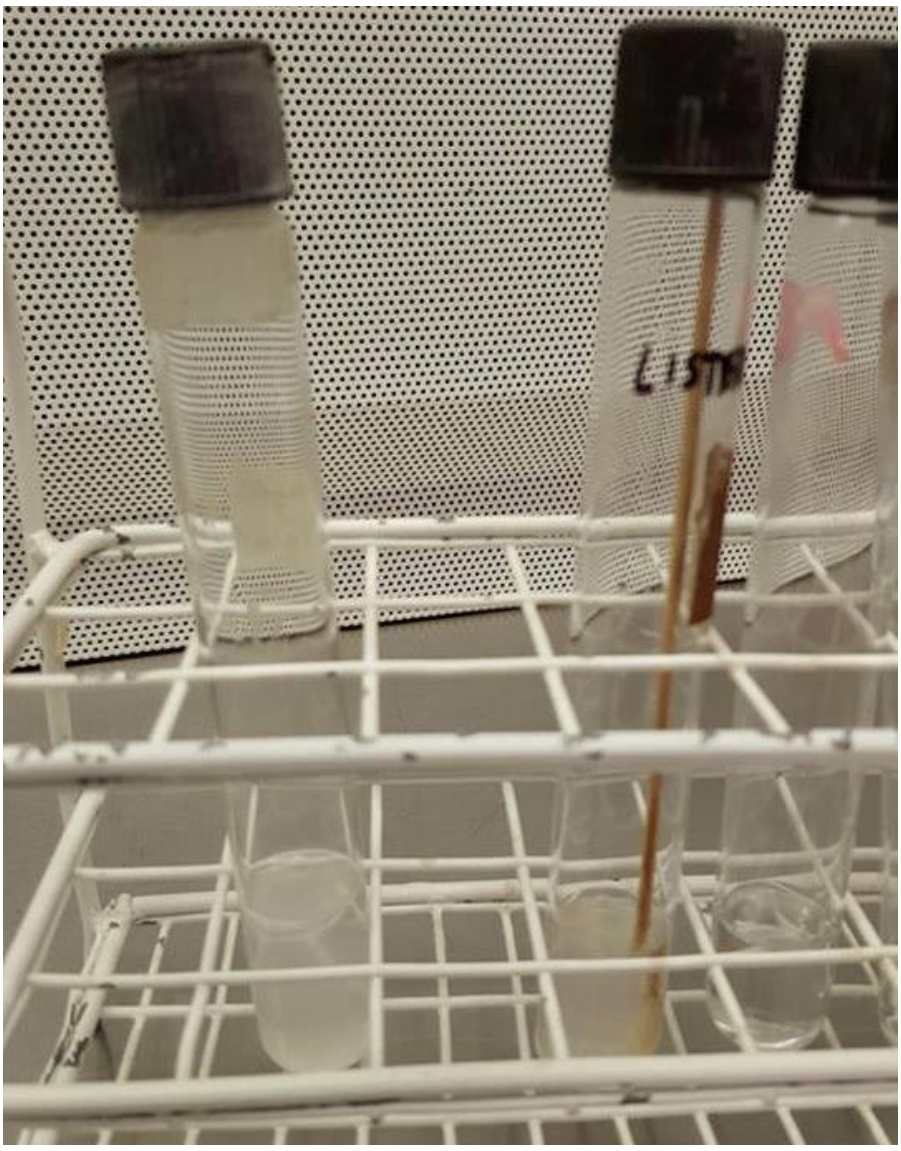
Anexo 15 Master Mix

Anexo 16 Crecimiento de bacterias lácticas

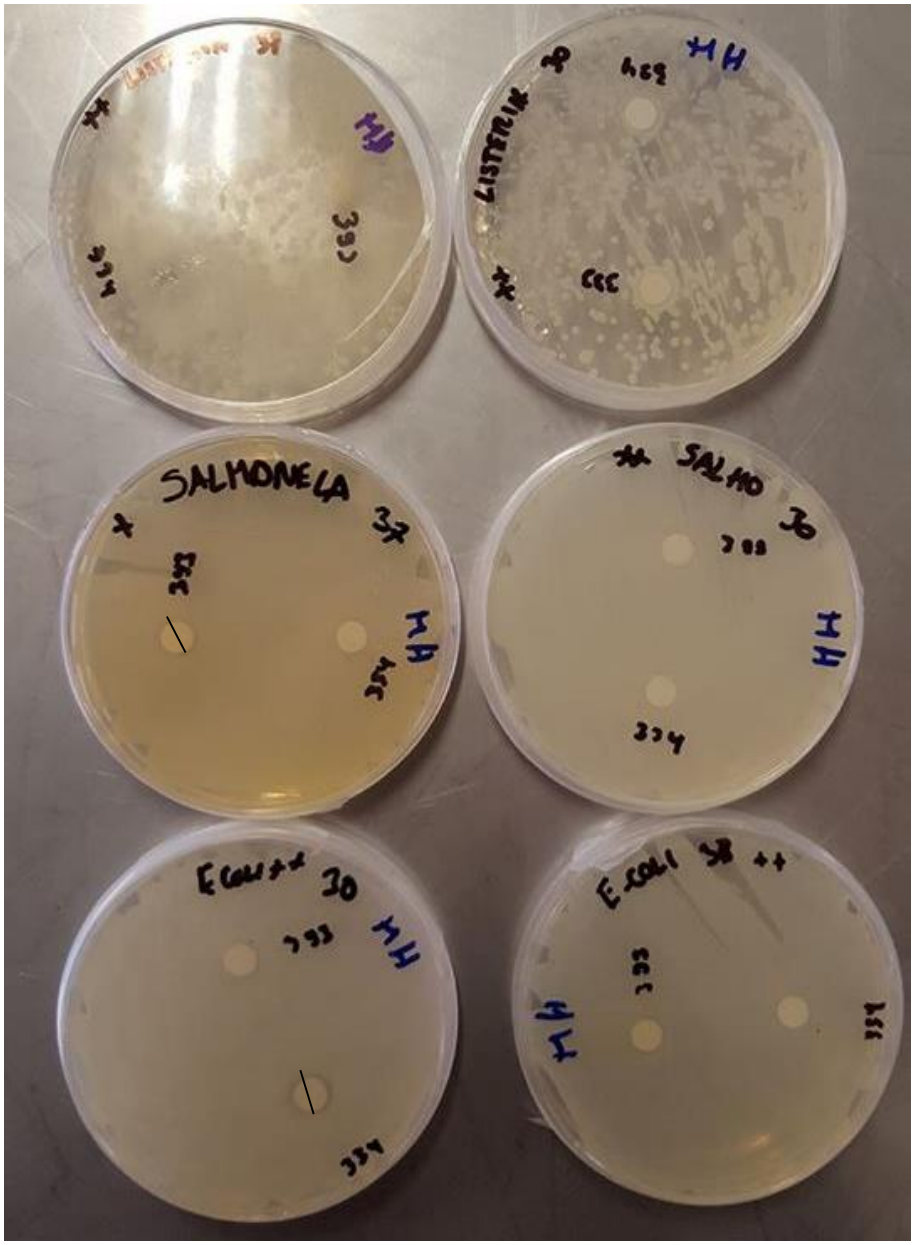
Anexo 17 Fotografía en trasiluminador



Anexo 18 Índice de Mcfarland



Anexo 19 Pruebas de inhibición a 37°



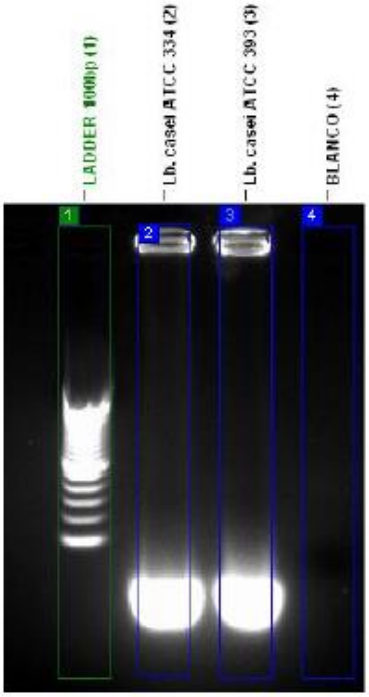
Anexo 20 Tinción de Gram

Anexo 21 Análisis en totallab

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
Time of Report: 18:26 12/01/2016 (Hora est. del Pacífico de SA)

totallab

Analysis Report: diego montero tesis 2.tif



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
LADDER 100bp	4	102281184,00	1090827232,00
Lb. casei ATCC 334	1	966209456,00	1083755264,00
Lb. casei ATCC 393	1	959081008,00	1085973376,00
BLANCO	0	0,00	0,00

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
Time of Report: 18:26 12/01/2016 (Hora est. del Pacífico de SA)

totallab

Lane Data Report: diego montero tesis 2.tif, Lane 1

Summary

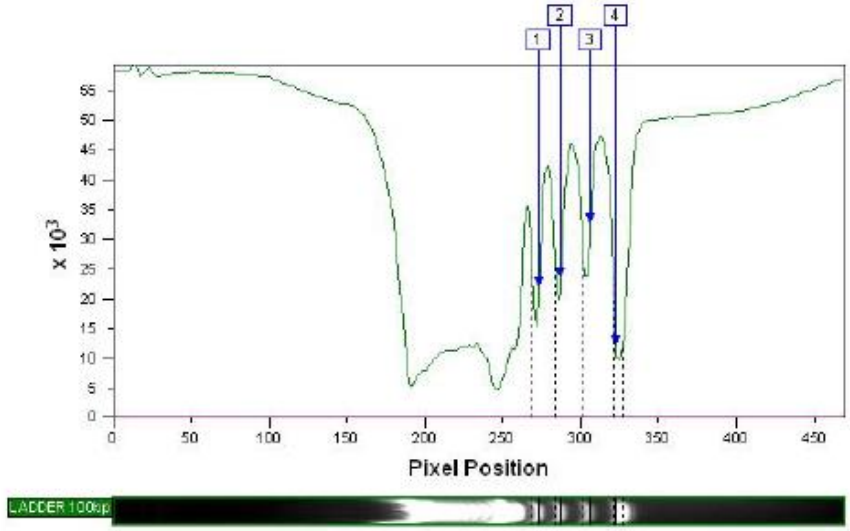
Name:	LADDER 100bp

Background

Background Type:	None Calculated

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Percentage
Percentage:	1
Band Positions Edited:	Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(pmole)
1	84	297	273	96,33	25122528,00	25122528,00	-
2	84	311	287	101,27	34874848,00	34874848,00	-
3	84	330	306	107,97	39238560,00	39238560,00	-
4	84	347	323	113,97	3045248,00	3045248,00	-

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	810	-	0,583
2	972	-	0,613
3	1026	-	0,654
4	270	-	0,690

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
Time of Report: 18:26 12/01/2016 (Hora est. del Pacífico de SA)

totallab

Lane Data Report: diego montero tesis 2.tif, Lane 2

Summary

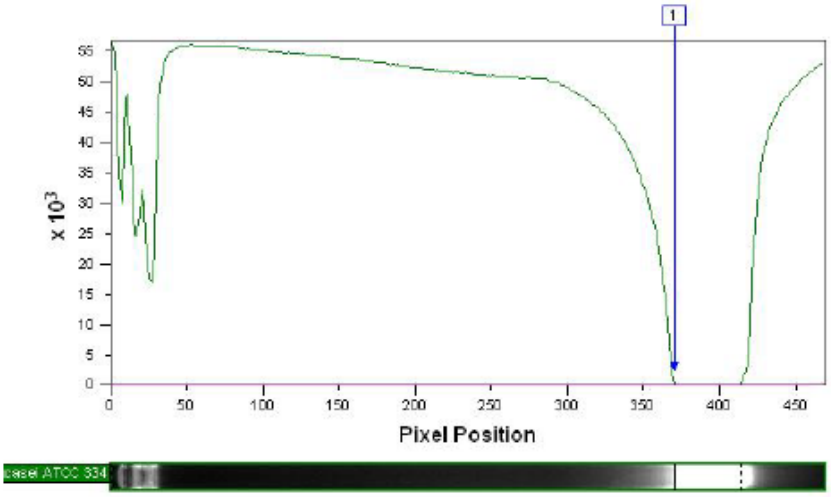
Name:	Lb. casei ATCC 334

Background

Background Type:	None Calculated

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Percentage
Percentage:	1
Band Positions Edited:	Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(pmole)
1	167	391	370	130,56	966209456,00	966209456,00	-

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	22356	-	0,791

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
Time of Report: 18:26 12/01/2016 (Hora est. del Pacífico de SA)

totallab

Lane Data Report: diego montero tesis 2.tif, Lane 3

Summary

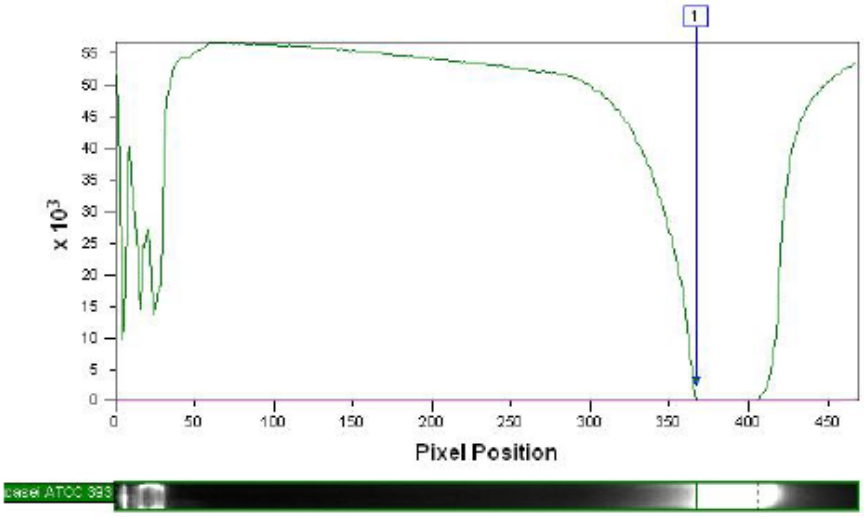
Name:	Lb. casei ATCC 393

Background

Background Type:	None Calculated

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Percentage
Percentage:	1
Band Positions Edited:	Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(pmole)
1	251	390	367	129,50	959081008,00	959081008,00	-

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	21924	-	0,784

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
Time of Report: 18:26 12/01/2016 (Hora est. del Pacífico de SA)

totallab

Lane Data Report: diego montero tesis 2.tif, Lane 4

Summary

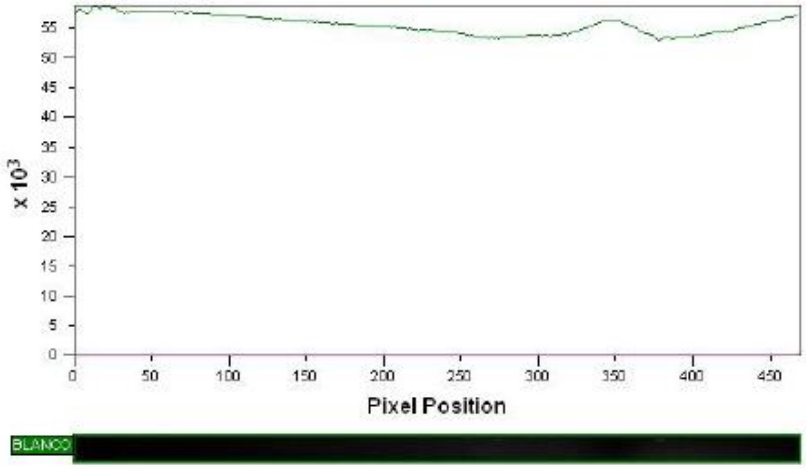
Name:	BLANCO

Background

Background Type:	None Calculated

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Automatic Edges
Band Positions Edited:	No



Band Table