UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA ACADÉMICO DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

**Evaluación de tres Medios de Cultivo para el Desarrollo Estable de la
Microbiota del Tocosh**

TESIS

Para optar el título profesional de Licenciado en Nutrición y Dietética

AUTORES

Galindo Flores, Edshon Ayrton (<https://orcid.org/0000-0002-6723-1685>)

Salazar Villacorta, Valeria Fernanda (<https://orcid.org/0000-0002-0716-4441>)

ASESORES

Milon Mayer, Pohl Luis (<https://orcid.org/0000-0001-6679-5473>)

Alcántara Estela, Roberto Hugo (<https://orcid.org/0000-0003-2028-631X>)

Lima, 26 de agosto de 2020

DEDICATORIA

A nuestros padres por su constante apoyo en todos estos años de carrera universitaria. Así mismo, a nuestros asesores, Pohl Milón y Roberto Alcántara quienes nos guiaron en todo el camino y apoyaron en toda la realización de este trabajo. Lo dedicamos también a todos los integrantes del equipo del Centro de Investigación de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC) por su disposición y apoyo. Por ende, el presente trabajo no hubiera sido posible sin la contribución de todos lo anteriormente mencionados.

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica mediante convenio 154-2017-Fondecyt.

RESUMEN

Una amplia variabilidad microbiológica es la característica principal de la microbiota donde diversos factores intrínsecos y extrínsecos pueden afectar la composición de esta, y alteraciones de la misma pueden llevar a diversas patologías. En particular, la dieta alta en alimentos crudos y fermentados puede modular la microbiota intestinal de las personas. En el Perú el consumo de fermentados de tubérculos, Tocosh, es característico y tradicional. Si bien se inicia a conocer su composición bacteriana y su potencial benéfico, se desconocen las condiciones que podrían permitir el cultivo de una o más de las especies coexistentes en el Tocosh. Con el objetivo de estudiar como la microbiota del Tocosh varía durante cultivos controlados, en el presente estudio se evaluaron tres medios de cultivo no selectivos (Luria Bertani, Brain-Heart Infusion y Caldo Nutritivo) y se analizó la variación de la composición de la microbiota del tocosh en el tiempo mediante secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés) de ADN bacteriano. El análisis de la muestra inicial del tocosh crudo utilizado para este estudio presentó 335 especies diversas, distribuidas principalmente en 29 filos. Los tres medios evaluados promovieron un desarrollo cualitativamente variado de microbiota mostrando entre 14 y 61 especies representadas. El análisis cuantitativo mostró que las especies que abundaban en la muestra inicial, *Clostridium neuense group* y *Prevotella*, disminuyeron notoriamente a lo largo del tiempo de cultivo en los tres medios. De manera contraria, nuestros resultados indican una clara predominancia para las familias *Bacillaceae* y *Paenibacillaceae* y específicamente para la especie *Bacillus cereus* en los tres medios estudiados. En conclusión, se evidenció que la variación de la microbiota de tocosh se ve afectada por el tiempo y las características de los medios de cultivo utilizados. Se encontró que los tres medios de cultivo evaluados no favorecieron el crecimiento estable y variado de la microbiota de Tocosh, observándose una preferencia al desarrollo de *Bacillus cereus*, presente inicialmente en la muestra de microbiota, y potencialmente nociva para la salud. Estudios futuros con miras al desarrollo industrial de tocosh deberían prestar particular atención a evaluar otros factores como temperatura, pH, oxigenación, entre otros.

Palabras clave: NGS, microbiota, tocosh.

Evaluation of three growth medium for a stable development of the tocosh microbiota

ABSTRACT

The main characteristic of the microbiota is a wide variety of microbiological variability. However, various intrinsic and extrinsic factors can affect its composition, where alterations of it can lead to various pathologies. In particular, diets high in raw and fermented foods can modulate people's gut microbiota. In Peru, the consumption of fermented tubers, Tocosha, is characteristic and traditional. Although its bacterial composition and its beneficial potential are beginning to be known, the conditions that could allow the cultivation of one or more of the coexisting species in Tocosha are unknown. In order to study how the Tocosha microbiota varies during controlled media cultures, in the present study three non-selective culture media (Luria Bertani, Brain-Heart Infusion and Nutritive Broth) were evaluated and the variation in the composition of Tocosha microbiota over time through the use of next generation sequencing (NGS) of bacterial DNA. The analysis of the initial sample of the raw tocosha used for this study presented 335 diverse species, distributed mainly in 29 phylum. The three-culture media evaluated promoted a qualitatively varied development of microbiota, showing between 14 and 61 species represented. However, the quantitative analysis showed that species that were abundant in the initial sample, *Clostridium neuense* group and *Prevotella*, decreased markedly throughout the culture time in the three media. On the contrary, our results indicate a clear predominance for the *Bacillaceae* and *Paenibacillaceae* families and specifically for the *Bacillus cereus* species in the three media studied. In conclusion, it was evidenced that the variation of the Tocosha microbiota is affected by time and the characteristics of the culture media used. It was found that the three culture media evaluated did not favor the stable and varied growth of the Tocosha microbiota, observing a preference for the development of *Bacillus cereus*, initially present in the microbiota sample, and potentially harmful to health. Thus, future studies focused on the industrial development of Tocosha should pay particular attention to evaluating other factors such as temperature, pH, oxygenation, among others.

Keywords: NGS, microbiota, tocosha.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
A. MATERIALES	13
B. MÉTODOS	14
i. Extracción de la muestra de Tocosh	14
ii. Determinación del tiempo de incubación del cultivo	14
iii. Cultivo de tocosh en tres medios no diferenciales	15
iv. Purificación y cuantificación de ADN	16
v. Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR)	16
vi. Purificación de PCR	17
vii. Electroforesis en gel de Agarosa	18
viii. Introducción de índices de secuenciación mediante PCR y purificación	18
ix. Electroforesis PCR 2	19
x. Cuantificación, normalización y agrupación de muestras para secuenciar	19
xi. Análisis bioinformático	19
4. RESULTADOS	20
A. CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO	20
B. COMPARACIÓN CUANTITATIVA DE ADN PERTENECIENTES A MUESTRAS MICROBIOLÓGICAS OBTENIDAS DE CADA MEDIO DE CULTIVO	21
C. CUANTIFICACIÓN DE ADN TRAS LA AMPLIFICACIÓN POR PCR	22
D. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	23
E. INCORPORACIÓN DE CÓDIGOS IDENTIFICATIVOS MEDIANTE PCR Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS MEDIANTE ELECTROFORESIS	25
F. TAXONOMÍA DE LA MUESTRA INICIAL DE TOCOSH	26
G. DIVERSIDAD CUALITATIVA ENCONTRADA EN LOS MEDIOS DE CULTIVO A LAS 72 HORAS (FAMILIA-GÉNERO-ESPECIE)	28
H. VARIACIÓN EN EL TIEMPO DE LOS FILOS IDENTIFICADOS EN CADA MEDIO DE CULTIVO	31

I. PROGRESIÓN TEMPORAL DE LAS FAMILIAS MÁS ABUNDANTES EN LOS TRES MEDIOS DE CULTIVO EVALUADOS	33
J. IDENTIFICACIÓN DE LOS GÉNEROS MÁS ABUNDANTES EN LOS TRES MEDIOS DE CULTIVO A LO LARGO DEL TIEMPO.....	34
K. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES MÁS ABUNDANTES EN LOS TRES MEDIOS DE CULTIVO A LO LARGO DEL TIEMPO.....	35
5. DISCUSIÓN.....	36
6. CONCLUSIONES	41
7. REFERENCIAS.....	42
8. ANEXOS.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Desarrollo de microbiota de tocosh en los tres medios de cultivo.	20
Figura 2: Comparación de la concentración de ADN en los tres medios de cultivo.	22
Figura 3: Electroforesis de la PCR purificada de todos los tiempos de extracción	23
Figura 4: Electroforesis de la PCR purificada para muestras LB 4 y CN5 en 8, 10 y 12 ciclos.	24
Figura 5: Electroforesis tras Index PCR (8 ciclos)	25
Figura 6: Electroforesis tras Index PCR (12 ciclos)	26
Figura 7: Clasificación taxonómica desde Filo a especie de la muestra de tocosh cruda.....	27
Figura 8: Comparación de las familias bacterianas encontradas en los tres medios de cultivo estudiados al cabo de 72 horas de incubación	28
Figura 9: Comparación de los géneros bacterianos encontrados en los tres medios de cultivo estudiados al cabo de 72 horas de incubación	29
Figura 10: Comparación de las especies bacterianas encontradas en los tres medios de cultivo estudiados al cabo de 72 horas de incubación	30
Figura 11: Comparación de las familias presentes en tres medios de cultivo en el tiempo	33
Figura 12: Comparación de los géneros presentes en tres medios de cultivo en el tiempo	34
Figura 13: Comparación de las especies presentes en tres medios de cultivo en el tiempo	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Materiales y equipos utilizados en el estudio	14
Tabla 2: Información de los pasos de la secuenciación	17
Tabla 3: Distribución de muestras para el Index PCR.....	18
Tabla 4: Cuantificación de ADN tras PCR.....	22
Tabla 5: Comparación de filos por tiempo de las muestras en medio de Luria Bertani (LB)	31
Tabla 6: Comparación de filos por tiempo de las muestras en medio de Caldo Nutritivo (CN)	32
Tabla 7: Comparación de filos por tiempo de las muestras en medio de Brain-Heart Infussion (BHI).....	32

1. INTRODUCCIÓN

El término microbiota hace referencia a todo un conjunto de microorganismos que colonizan un ambiente específico. Dentro de este grupo se encuentran tanto bacterias como microorganismos del reino fúngico, archaea, virus y protozoarios (1). La relación encontrada de microorganismos y el huésped de estos se puede calificar como beneficiosa, perjudicial o indiferente (2). La composición se caracteriza según el tipo de microorganismo, el número y la distribución de estos (3). La flora microbiana normal a la que se refiere con mayor frecuencia habita en superficies externas e internas de los seres humanos convencionalmente sanos (4). De todos ellos el más complejo y diversos es la asociada al aparato digestivo, en especial el ciego, donde la densidad de microorganismos es la mayor de todo el cuerpo humano (5). La importancia de la flora humana es que sirve como defensa en los huéspedes (3), contribuye al desarrollo de la respuesta inmunológica, ya que evita la colonización de la piel o de las mucosas por especies que pueden ser patógenas (3). Entre los principales beneficios que brinda la microbiota al hospedero se puede considerar a la producción de bacteriocinas, metabolitos, la reducción del potencial redox, capacidad de protección al impedir el asentamiento de microorganismos extraños sobre la mucosa, entre otros (3, 4). Diversas condiciones intrínsecas de cada hábitat de la microbiota pueden afectar su composición, entre estos factores encontramos la temperatura, el pH, motilidad, concentración de oxígeno, recambio epitelial, mucosa, entre otros (5).

Como se mencionó anteriormente, existen condiciones que pueden alterar la composición microbiana. Por ejemplo, se ha visto que el uso de antibióticos altera la barrera de protección creada por la microbiota intestinal y genera alteraciones como inflamación, diarreas, infecciones, estreñimiento, etc., siendo los más perjudicados los pacientes inmunocomprometidos (6) (7). Uno de los antibióticos con mayor impacto a nivel de la microbiota es la clindamicina, ya que incrementa la susceptibilidad de infección por *Clostridium difficile* y *Salmonella typhimurium* (8). La exposición temprana de antibióticos a niños, al igual que en modelos animales en ratas, está correlacionado positivamente al desarrollo de problemas de inflamación respiratoria y al incremento de peso (9). Este último se postula sea debido a la variación entre *Firmicutes* y *Bacteroides* que son los dos filos más representados entre los microorganismos intestinales. Entre otras de las funciones reportadas de la microbiota es modular la respuesta del sistema inmune, ya que una alteración en esta puede ocasionar enfermedades a largo plazo como artritis reumatoide, diabetes, obesidad y asma (8). Por otro lado, bacterias lácticas que se encuentran en su mayoría en

alimentos fermentados se muestran resistentes a ambientes del tracto digestivo (10). Por ejemplo, se ha encontrado que la bacteria *Lactobacillus reuteri* (WHH1689) son beneficiosas para el organismo debido a que son resistentes y sobreviven al tracto gastrointestinal y se ha visto que toleran el *stress* del ambiente gastrointestinal donde factores como pH, temperatura, presión osmótica, oxidación y sales biliares juegan un rol importante (10).

Un alimento fermentado que encontramos en la sierra peruana es el Tocosh. Este es el producto de la fermentación de la papa, y se le atribuyen diversos beneficios para la salud. El consumo de este producto ya sea en forma fresca o cocida resultó tener efecto citoprotector en la mucosa gástrica como lo menciona Escudero y colaboradores (11), quienes evaluaron el efecto del extracto acuoso del tocosh sobre las úlceras inducidas en ratas albinas de laboratorio. El estudio concluyó que las concentraciones de tocosh usadas estaban directamente relacionadas al efecto protector en la mucosa gástrica asociada a su capacidad antioxidante, antimicrobiana y citoprotectora. La capacidad antimicrobiana del Tocosh está atribuida a bacterias probióticas siendo una de estas el *Lactobacillus spp*, así lo refieren Gutiérrez y colaboradores, quienes evaluaron el efecto antagónico *in vitro* de esta bacteria de forma aislada frente a enterobacterias patógenas como *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhi*. Este efecto fue asociado a los metabolitos producidos en la fermentación por *Lactobacillus* referidas a ácidos orgánicos y a proteínas con efectos bactericidas y antibiótica (12).

Investigaciones previas sobre la microbiota del tocosh, su composición y comportamiento han sido ya publicadas. En específico, una investigación publicada en el 2019, a cargo de Jiménez y colaboradores, tuvo como objetivo determinar los cambios en la composición microbiana presente en distintos procesos de elaboración del tocosh, evaluando así el perfil microbiano encontrado en tocosh fresco, seco y cocido (13). Entre los resultados, se encontró la presencia de variaciones taxonómicas en los 3 diferentes estados de producción, hallándose como filos predominantes en la muestra cruda los *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Entre uno de los cambios tras la cocción de la muestra, se pudo observar la modificación en la proporción de estos filos, ya que el 80% fue representado por *Firmicutes*. Se evidenció que entre los géneros, *Clostridium* y *Prevotella* predominan en los tres estados de producción. Además, en la muestra seca se reconoció el incremento en el desarrollo de dos filos bacterianos a comparación de la muestra fresca y el desarrollo de género de *Bacteroides*, los cuales no fueron identificados como dominantes en las otras dos muestras. De otro lado, el género

Acetobutilycum predominó en las muestras de tocosh fresco y cocido a diferencia de otros géneros bacterianos. Es por eso que se observó que los cambios en la microbiota de este alimento fermentado tiene como factor influyente la temperatura. Cabe mencionar que el estudio encontró presencia de géneros productores de antibióticos, que varían en su proporción en cada tipo de muestra evaluada, por lo que evaluar qué otros factores podrían influir en su desarrollo, podrían ser de gran uso para estudios biotecnológicos (13).

Con el fin de evaluar la microbiota, se han creado muchos métodos de análisis de su composición. Por un lado, la investigación de la microbiota se ha ampliado tras la utilización de técnicas moleculares como secuenciación masiva, en la que se distingue a la NGS (Next Generation Sequencing) (14). Hoy en día, la forma ideal de investigación de la microbiota es a partir de su detección por secuenciación de ADN, debido a que la investigación por cultivos microbiológicos da resultados con muchos sesgos (14). De esta forma se permite la identificación de la mayoría de microorganismos por taxonomía sin necesidad de realizar algún cultivo (14). La simulación de la microbiota en sistemas de cultivos implica el uso de equipos e instrumentos necesarios sumamente caros y especiales (15). Otros métodos utilizados para el análisis de la microbiota son los que son realizados en medios de cultivo, sólidos y líquidos (16). Uno de los más utilizados en investigaciones *in vitro* es el de agar ya que no afecta el crecimiento bacteriano (16). Se requiere el desarrollo de sistemas costo efectivos que permitan el estudio de la microbiota en ambientes controlados.

Por otro lado, también existen modernos métodos experimentales que sirven para recrear la microbiota humana de diversas zonas del aparato digestivo; TIM-1 (*Netherlands Organisation for Applied Scientific Research -TNO*) simula la región del estómago e íleon, TIM-2 la del colon, SHIME (*Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*) la del estómago y colon al igual que el método modificado M-SHIME y HMI (17, 18). Estos sistemas son utilizados para evaluar el comportamiento de la microbiota intestinal frente a estímulos externos como nutrientes, fármacos y para el análisis de los metabolitos generados en estos procesos (17, 18). La combinación de tecnologías de secuenciación de alta performance y sistemas de cultivo simples podría brindar una plataforma rápida para evaluar el efecto de fármacos en sistemas de microbiota. Por ejemplo, se ha logrado evaluar el impacto de clorpirifos, insecticida utilizado en la industria agrícola, en la microbiota simulada en SHIME encontrando una variación entre las familias que componen la microbiota humana estabilizada (19). Además de conocer la relación de antibióticos con un sistema complejo

microbiano, podemos investigar también como es que bacterias probióticas actúan y sobreviven al tracto gastrointestinal.

Debido a lo arriba expuesto, el cultivo del tocosh podría permitir el desarrollo de especies bacterianas con potencial biotecnológico y con funciones deseadas en una microbiota intestinal saludable. El presente estudio compara la propagación de todas las especies bacterianas que componen el tocosh en un sistema microbiológico controlado y en función de tres medios de cultivos permisivos. Además, el estudio desarrolla una nueva herramienta para el monitoreo individual de especies bacterianas en un contexto complejo como el de la microbiota.

2. OBJETIVOS

Objetivo General: Evaluar el desarrollo de la microbiota del tocosh en tres medios no selectivos mediante secuenciación de próxima generación.

Objetivos específicos:

- Determinar la composición de la microbiota total del tocosh crudo.
- Comparar tres medios de cultivo no selectivos para la propagación de microbiota del tocosh
- Estimar los cambios en poblaciones microbianas a lo largo del tiempo en cultivos del tocosh en tres medios no selectivos mediante secuenciación de próxima generación

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

Tabla 1: Materiales y equipos utilizados en el estudio

Materiales	Equipos
<ul style="list-style-type: none"> ● Micropipetas (10 µl, 100 µl, 1000µl) ● Beakers ● Matraces ● Probetas ● Placas Petri ● Cucharilla ● Tubos de microcentrífuga ● Tips de micropipetas ● Papel Aluminio ● Tubos Eppendorf ● Racks ● Cubetas 	<ul style="list-style-type: none"> ● Agitador Vórtex ● Autoclave ● Cabina ● Agitador magnético ● Incubadora ● Espectrofotómetro ● Balanza analítica ● Refrigeradora 1-4 °C ● Congeladora ● NanoDrop One

B. MÉTODOS

i. Extracción de la muestra de Tocosh

La muestra de Tocosh evaluada fue obtenida previamente como parte del estudio “Tipificación y determinación de los cambios en la composición de la microbiota presente en los distintos procesos de elaboración del tocosh de papa (*Solanum tuberosum*)” (13). Brevemente, la muestra se extrajo de los pozos de agua de una zona productora de Tocosh, ubicada en el distrito de Heroínas Toledo, provincia de la Concepción (Junín, Perú). Para la extracción de la muestra fresca, se utilizaron materiales esterilizados mediante rayos UV como espátula, tubos Falcon y guantes. La muestra fresca fue colocada en un contenedor con hielo para mantener las condiciones originales y posteriormente fueron almacenadas a -80°C en el laboratorio.

Para este estudio, se homogeneizó una muestra de tocosh un tubo Falcon. La muestra descongelada se le agregó con 5 ml de medio de cultivo. Luego, se mezcló con ayuda de un vórtex y manualmente por 20 minutos por periodos de 3 y 2 minutos respectivamente. Finalizado el proceso, se dejó reposar y se extrajo el sobrenadante en volúmenes de 1 ml, para ser almacenados en congelación a -80°C.

ii. Determinación del tiempo de incubación del cultivo

Con el objetivo de determinar el tiempo de incubación necesario para alcanzar el mayor crecimiento microbiano, se llevaron a cabo cuatro experimentos secuenciales

en donde se utilizó el medio de cultivo de Luria Bertani (LB) (10 g Triptona, 10 g de Cloruro de Sodio, 5 g Extracto de levadura). Se inoculó un mililitro de muestra de Tocosha en el medio de cultivo y se dejó incubar por distintos días a temperatura de 15 a 19°C a 180 RPM. Para cada ensayo se utilizó tiempos de incubación distintos que permitieron conocer la dinámica del crecimiento de la microbiota y definir el tiempo de incubación que se utilizaría para los experimentos posteriores. En cada toma de muestra se extrajo un mililitro y se midió la absorbancia a 600 nm por triplicado y se sembraron en placas con agar LB con el objetivo de obtener una relación entre el crecimiento microbiano determinado por el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y la absorbancia a 600 nm. Tras estos experimentos se determinó que la toma de la primera muestra se realizaría a partir de las 24 h de cultivo y a temperatura ambiente, puesto que solo a partir de este tiempo se evidenció crecimiento mediante absorbancia.

iii. Cultivo de tocosha en tres medios no diferenciales

Los tres medios de cultivos elegidos fueron aquellos que se caracterizan por ser no selectivos; por ende, permiten el desarrollo de diversos microorganismos. A continuación, se describe la composición de los medios utilizados, el medio Luria Bertani contiene 10 g de triptona, 10 g de Cloruro de Sodio y 5 g de extracto de levadura por litro; el medio Brain Heart Infusion (BHI) fue elaborado utilizando 37 g del medio ya preparado en 1 L de agua destilada. La composición del medio es de 10 g de enzimas digestivas de tejidos animales, 12.5 g de infusión de cerebro de ternero deshidratado, 5 g de infusión de corazón de res deshidratado, 2g de glucosa, 5g de cloruro de sodio y 2.5 g de Fosfato disódico. Finalmente, el Caldo Nutritivo (CN) (5 g de peptona de carne y 3g extracto de carne) para el cual se usó la proporción de 8g del medio preparado cada 1 L de agua destilada.

A estos tres medios de cultivo se les inoculó 1 ml de muestra aislada de Tocosha obtenidos como se detalla anteriormente y se dejó incubar en agitación de 180 RPM a temperatura ambiente. Para cada medio de cultivo se extrajeron 5 replicados de 1 ml cada 24 horas en un rango de 5 días. Se utilizó una de las alícuotas para la medición de la absorbancia y las demás se conservaron en congelación para utilizarlas en los otros procedimientos.

iv. Purificación y cuantificación de ADN

Para la purificación del ADN se utilizó el kit “Quick-DNA Miniprep Plus kit” (18). Cada muestra fue diluida para que presente una un número de células menor a 5×10^6 . Se extrajeron ADN a partir de las muestras colectadas en los 5 tiempos de incubación de cada uno de los medios de cultivo (LB, BHI y CN) y dos de la muestra inicial de tocosh (MTC). La extracción se realizó siguiendo el manual del fabricante. Brevemente, se mezcló 200 μ L de muestra con 200 μ L de BioFluid & Cell Buffer y 20 μ L de Proteinase K para realizar la digestión de la membrana celular, se mezcló con ayuda del vórtex por 10 segundos. Las muestras se dejaron en la incubadora a 55°C por 10 minutos. Luego, se añadió 420 μ L el Genomic Binding Buffer en cada uno de los tubos, se mezcló y se transfirió el contenido a los tubos Zymo-Spin IIC-XLR Column con un tubo colector en la base para ser centrifugado a 12000 x g por 1 min y se descartó lo filtrado en el tubo colector. Posteriormente, se realizaron pasos de lavado utilizado 400 μ L del DNA Pre-Wash Buffer, se centrifugó a 12000 xg/min y se descartó el contenido del tubo colector. Luego, se añadió 700 μ L de g-DNA Wash Buffer y se centrifugó a la misma velocidad y tiempo y se descartó lo del tubo colector. Se volvió a añadir 200 μ L de g-DNA Wash Buffer y se siguió el mismo procedimiento. Finalmente, para la elución de DNA se cambió a un tubo de microcentrífuga limpio y se añadió 50 μ L de DNA Elution Buffer en la parte superior. Las muestras se incubaron por 5 minutos y luego se centrifugaron 1 min a 12000 g. Una vez realizada la purificación de ADN, se procedió a realizar la cuantificación mediante absorbancia UV a 260 nm en el equipo NanoDrop, el cual indicó la concentración de ADN presente en las diferentes muestras.

v. Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR)

Para la realización de la PCR se utilizó la polimerasa Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Se utilizaron los siguientes primers: Amplicon PCR Forward Primer 5'.

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGC
AG y Amplicon PCR Reverse Primer 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATC
TAATCC, los cuales están dirigidos a amplificar la región V3 y V4 del gen del ARN

ribosomal 16S. Para obtener un volumen total de reacción de 50 µl se utilizaron 25 µl de MasterMix y 5 µl de cada primer en concentración de 1 µM. La cantidad de ADN utilizada varió en proporción a la concentración de este mismo con el fin de conseguir 50 ng de ADN genómico. Las cantidades utilizadas para cada reacción se pueden visualizar en (tabla 1, Anexos).

La amplificación se realizó acorde a las siguientes condiciones:

Tabla 2: Información de los pasos de la secuenciación

Paso	Temperatura °C	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 s	20
Hibridación	50	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	10 in	1

vi. Purificación de PCR

Para la purificación de la PCR se utilizaron las nanopartículas magnéticas AMPure XP, la principal ventaja de este método de purificación es que permite la purificación selectiva de fragmentos de ADN mayores 100 nt logrando la eliminación de primers remanentes y productos inespecíficos de menor longitud. Se utilizaron 40 µL de cada una de las muestras amplificadas por PCR y se les añadió 40 µL AMPure XP beads, dejándolas reposar por 5 minutos. Seguidamente, estas fueron colocadas en el soporte magnético por 2 minutos y se extrajo el sobrenadante de todas estas con ayuda de una micropipeta (100 µL). Con los tubos aún en el soporte magnético, se procedió a realizar el lavado y se les añadió 200 µL etanol al 80% recién preparado y se dejaron reposar por 30 segundos. El sobrenadante fue extraído con una micropipeta (200 µL), se descartó y se repitió el mismo procedimiento una segunda vez. Finalizado el último lavado, la muestra quedó en reposo por 10 minutos. Después, se añadió 30 µL de 10 mM Tris pH 8.5 a cada uno de los tubos y fueron mezclados mediante pipeteo 10 veces y se dejó reposar por 2 minutos. Finalmente, los tubos fueron colocados sobre el soporte magnético por 2 minutos y el sobrenadante, esta vez conteniendo los fragmentos de ADN purificados, fueron guardados en tubos nuevos.

vii. Electroforesis en gel de Agarosa

La visualización del producto de PCR se realizó mediante electroforesis con gel de agarosa con el objetivo de verificar que los productos de PCR correspondan con el tamaño esperado (550 bp aproximadamente). Se realizó utilizando gel de agarosa al 1% en Tris Borato-EDTA (TBE) 1X. Se utilizaron dos marcadores de peso molecular (DNA Ladder) Gene Ruler 1Kb de la marca Thermo Scientific y otro de 100 bp. Se preparó 2 µL de colorante + 8µL de DNA marcador de tamaño. La separación de los fragmentos de ADN en el gel se realizó a 80 V por 60 min. El gel se visualizó en un transiluminador de luz azul y se foto documentó en una cámara Canon.

viii. Introducción de índices de secuenciación mediante PCR y purificación

De acuerdo al protocolo de Illumina, se introdujeron índices únicos de ADN a cada muestra obtenida en cada uno de los tiempos analizados. Este proceso se realizó mediante PCR en las muestras usando Nextera XT Index Kit. Se le añadió Index 2 primers (1, 2, 3,4) e Index 1 primers (A, B, C, D, E y F) a las muestras CN, LB y BHI. El resultado se explica en la siguiente tabla:

Tabla 3: Distribución de muestras para el Index PCR

	A	B	C	D	E	F
1	CN1	CN2	C4	CN5	LB1	LB2
2	BHI1	BHI2	BHI3	MTC	MTC	10 3
3	10 6	10 5	10 2	10 6	10 5	10 2
4	CN3	BHI 4	BHI5	LB3	LB4	LB5
<p>*La fila 4 contiene a las muestras con la menor concentración de ADN después de la primera PCR, como se observa en la electroforesis previa. El número de ciclos para esta fila fue de 12 ciclos en el termociclador, mientras las otras muestras fueron ampliadas en 8 ciclos.</p> <p>*Los nombres CN1, LB1 y BHI 1 corresponden a las muestras a las 24 hrs de cultivo. CN2, LB2 y BH2 a las 48 hrs de cultivo. CN3, LB3 y BHI3 a las 72 hrs de cultivo. CN4, LB4 y BHI4 a las 96 hrs de cultivo. CN5, LB5 y BHI5 a las 120 hrs de cultivo.</p> <p>*Las muestras 10 ^3, 10 ^6, 10 ^5, 10 ^2, 10 ^6, 10 ^5, 10 ^2, son cultivos de <i>Eschericha coli</i>.</p> <p>*MTC: Muestra de tocosh</p>						

De esta manera, cada muestra se encuentra codificada por dos secuencias adyacentes que funcionan como códigos de barras y permitirán su identificación durante el análisis bioinformático. Se realizaron dos PCRs con distintos números de ciclos en función de la concentración de ADN de las muestras. Aquellas con mayor concentración usaron 8 ciclos mientras aquellas con menor concentración usaron 12.

ix. Electroforesis PCR 2

La electroforesis correspondiente al PCR2 se realizó de también con gel de agarosa al 1% en Tris Borato-EDTA (TBE) 1X. El tamaño esperado de la amplificación fue de 630 bp. Se mezcló 3 µL de colorante (Run safe) 6x de la marca Thermo Scientific con 10 uL de reacción obtenida de index PCR. El marcador de peso molecular (DNA Ladder) fue el Gene Ruler 1Kb de la marca Thermo Scientific. Se separaron las muestras en dos geles, en cada uno se colocó el marcador de peso molecular de 1Kb. En un gel se colocaron todas las muestras excepto dos correspondientes al PCR de 8 ciclos de amplificación y en el otro se colocaron las dos muestras restantes de 8 ciclos y todas las pertenecientes a una amplificación de 12 ciclos. Los geles se corrieron a 83V por 1 hora.

x. Cuantificación, normalización y agrupación de muestras para secuenciar

Para la secuenciación se utilizó el chip de secuenciación de Illumina, el cual recomienda cuantificar las muestras utilizando el método de fluorometría que usa colorantes que se unen a las cadenas dobles de ADN. Se realiza una dilución del ADN concentrado usando el Buffer de resuspensión (RSB) o 10 nM Tris pH 8.5 a 4 nM. Este método permite la agrupación de hasta 96 muestras dando una salida de MiSeq de más de 20 millones de lecturas.

xi. Análisis bioinformático

La secuenciación de todas las muestras se analizó mediante la plataforma BaseSpace de Illumina. En breve, BaseSpace utiliza los índices para identificar las muestras y sucesivamente agrupa las lecturas proporcionando su secuencia un número de cada una. Sucesivamente, la plataforma contrasta cada lectura con su base de datos para identificar cada una de ellas y así asignar la taxonomía a la que pertenece. Una vez que cada lectura es asignada se procedió a exportar la data taxonómica asociada a la abundancia de cada secuencia indicada por el número de lecturas. Dichas tablas se utilizaron para estimar de manera relativa la abundancia de cada especie en cada una de las muestras presentes.

4. RESULTADOS

a. Crecimiento de microorganismos en diferentes medios de cultivo

Con el fin de evaluar el crecimiento de todas las bacterias de la microbiota del tocosh se utilizaron tres medios de cultivo no selectivos, LB, BHI y CN. El crecimiento de las bacterias de cada muestra, en los diferentes tiempos de cultivos con intervalos de 24 hrs, se midió mediante absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia medida es proporcional a la densidad celular en el medio.

Figura 1: Desarrollo de microbiota de tocosh en los tres medios de cultivo. 100 mL de cada medio de cultivo fueron inculados con 1 mL de muestra aislada de Tocosh. El crecimiento del cultivo celular midió mediante absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro.

En la figura 1, se puede observar que los tres medios de cultivo favorecen el crecimiento y desarrollo de la microbiota del Tocosh. Las mediciones del OD de cada muestra en cada tiempo de cultivo se realizaron por triplicado. El incremento de las absorbancias en los diferentes tiempos, indican que a las 24 hrs de cultivo, el medio Luria Bertani (LB) ($OD_{600nm} = 0.730$), favorece el crecimiento en mayor medida que los medios Brain Heart Infussion (BHI) ($OD_{600nm} = 0.108$) y Caldo Nutritivo (CN) ($OD_{600nm} = 0.082$), siendo este último el que menos favorece el crecimiento de microbiota. Si bien la absorbancia del medio LB muestra un incremento constante y mayor en comparación a los otros dos medios a las 48 hrs ($OD_{600nm} = 3.100$), a las 72 hrs, el medio BHI presenta el mayor pico de crecimiento ($OD_{600nm} = 6.34$) en comparación al medio LB ($OD_{600nm} = 5.74$) y CN ($OD_{600nm} = 2.21$). Pasadas las 120 hrs de cultivo, el medio BHI ($OD_{600nm} = 8.20$), presentó el mayor valor de absorbancia y fue el medio que favorece a un mayor crecimiento, seguido del medio LB ($OD_{600nm} = 5.88$) y CN ($OD_{600nm} = 2.76$).

Nuestros resultados indican que la progresión del crecimiento de bacterias depende del medio en cual se cultivan los microorganismos. Se encontró que, a las 72 horas de tiempo de cultivo, las muestras correspondientes a LB, CN y BHI presentaron diferencias significativas con respecto a los valores de OD. La técnica utilizada no permite identificar que microorganismos predominan en cada medio y en cada intervalo de tiempo. Para elucidar en la composición microbiana y cómo varía, se realizará secuenciación masiva de todas las muestras siguiendo el manual de secuenciación 16S.

b. Comparación cuantitativa de ADN pertenecientes a muestras microbiológicas obtenidas de cada medio de cultivo

Con el fin de evaluar la concentración de ADN presente en los medios de cultivo LB, BHI y CN, se procedió a purificar el ADN de todas las muestras y se determinó su concentración mediante absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro tipo NanoDrop. Según el resultado de purificación, las concentraciones del material genético presente en cada una de las muestras fueron variables. Se esperaba que aquellas muestras con el OD más alto serían también las que presenten una mayor concentración de ADN. Sin embargo, a las 24 hrs de cultivo, la muestra con mayor concentración de ADN fue el medio BHI el cual presentó 18 ng/μl, seguida del medio CN (6.1ng/ μl) y LB (2.9 ng/ μl). A las 48 hrs, BHI se mantuvo con la mayor concentración de ADN, pero disminuyó a 15 ng/ μl a diferencia de los otros medios que incrementaron sus valores a CN (8.3 ng/ μl) y LB (5.6 ng/ μl). A las 72 hrs, el medio con mayor concentración de ADN fue CN con 13.1ng/ μl, alcanzando su máximo valor hasta las 120 hrs, el medio LB a las 96hrs (7.2ng/ μl).

Concentración de ADN (ng/uL) en relación a tiempo de cultivo

Figura 2: Comparación de la concentración de ADN en los tres medios de cultivo. Cuantificación de ADN posterior a la purificación. Para la cuantificación se utilizó 2 uL de muestra purificada y el NanoDrop.

En nuestros resultados no se encontró correlación aparente entre la concentración de ADN obtenido y el grado de crecimiento de la respectiva muestra (evaluado a partir de la absorbancia (OD 600nm) de las muestras). Los valores fueron variables en cada tiempo presentado. Sin embargo, las cantidades de ADN obtenidas fueron suficientes para amplificar el gen del 16S mediante PCR para su sucesiva secuenciación.

c. Cuantificación de ADN tras la amplificación por PCR

Con el objetivo de determinar la concentración de ADN después de la amplificación por PCR, se procedió a cuantificar las muestras LB, CN y BHI utilizando 2 µl de cada muestra en el equipo NanoDrop One.

Tabla 4: Cuantificación de ADN tras PCR

	Concentración ADN ng/ µl				
Medio de cultivo	Tiempo (horas)				
	24	48	72	96	120
LB	5	3.7	1.5	1.3	0.7
CN	12.8	6.3	4.1	6.5	6.1
BHI	7.2	8.7	4.7	6.7	7
Anotación: se cuantificó el ADN de la muestra de Tocosh sin haber estado en un medio de cultivo= 3 ng/uL					

Como se observa, la amplificación por PCR utilizando los primers Amplicon PCR Forward Primer 5' y Amplicon PCR Reverse Primer 5', tuvo como resultado cierta variación entre cada tiempo de cultivo en las muestras LB, CB y BHI. La concentración de ADN en el medio LB es la más variable en los 5 tiempos de cultivo, ya que presenta su mayor concentración a las 24 hrs (5 ng/ μ l) y su menor concentración a las 120 hrs (0.7 ng/ μ l). El medio CN presenta su mayor concentración de ADN a las 24 hrs (12.8 ng/ μ l) y se mantiene constante en los siguientes tiempos de cultivo. Finalmente, el medio BHI presenta una concentración de ADN constante en los 5 tiempos de cultivo. Para conocer el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados por los primers, se realizó la técnica de electroforesis.

d. Electroforesis en gel de Agarosa

Figura 3: Electroforesis de la PCR purificada de todos los tiempos de extracción

(1) LB1 (2) LB2 (3) LB3 (4) LB4 (5) LB5 (6) BHI1 (7) BHI2 (8) BHI3 (9) BHI4 (10) BHI5 (11) CN1 (12) Ladder 100bp (13) Ladder 1kb bp (14) CN2 (15) CN3 (16) CN4 (17) CN5 (18) MTC

* LB: Luria Bertani, BHI: Brain Heart Infussion, CN: Caldo nutritivo, MTC: Muestra pura de tocosh

Con el objetivo de determinar el tamaño de los fragmentos de ADN el gen 16S de cada muestra amplificados por la PCR realizada y purificados, se utilizó la técnica de electroforesis en gel, la cual permite separar las moléculas de ADN por su tamaño y carga. Se empleó el gel de agarosa al 1% y se corrieron las muestras a 80V por 60 minutos. En la figura 3 se puede ver dichos productos de PCR purificados de las 15 muestras de ADN extraídos (5 tiempos de extracción de ADN para los 3 medios de cultivo), agrupados por medio de cultivo utilizado, empezando con Luria Bertani (LB), seguido de Brain Heart Infussion (BHI) y por último de Caldo Nutritivo (CN). Además, se analizó la muestra pura

de Tocosh y dos marcadores de tamaño, uno de 100 pares de bases (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) y otro de 1kb de pares de bases (innuSTAR 1kb bp DNA Ladder) (números 12 y 13, respectivamente), estos se colocaron en el medio para poder tener un mejor punto de comparación con todas las muestras. Con los resultados obtenidos de la cuantificación de PCR se espera que los fragmentos amplificados alcancen una longitud aproximada de 550 bp. Podemos observar que las muestras que han sido separadas adecuadamente y las cuales la banda se puede visualizar, se acercan a los valores aproximados de 550 pb. Sin embargo, se puede observar que en las muestras 3,4,5,9,10 y 15 no presentan una banda del tamaño esperado. Esto puede deberse a dos razones: las moléculas de ADN amplificadas eran de distinto tamaño o que la concentración de ADN es mínima lo que genera que más tinte (Dye) se una a estas haciendo que se vean más grandes. Para evitar estas discrepancias, se modificaron el número de ciclos de amplificación por PCR de modo que permita que se generen mayor número de amplificaciones y se pueda alcanzar una representación más homogénea de todas las muestras.

Figura 4.: Electroforesis de la PCR purificada para muestras LB 4 y CN5 en 8, 10 y 12 ciclos. 1) LB 8 ciclos (2) CN 8 ciclos (3) LB 10 ciclos (4) CN 10 ciclos (5) LB 12 ciclos (6) Ladder 100bp (7) Ladder 1Kb (8) CN 12 ciclos

* LB: *Luria Bertani*, BHI: *Brain Heart Infussion*, CN: *Caldo nutritivo*

En la figura 4 se pueden observar los resultados de la electroforesis realizada para la determinación de ciclos a los que se deberían amplificar aquellas muestras que no se evidenciaron en el paso previo. Se utilizó 10 μ L de cada marcador de tamaño junto con 2 μ L de colorante y en caso de las muestras la proporción fue de 5 μ L y 1 μ L de colorante. El

tiempo fue de 60 min a 80V. Para este experimento se utilizó una muestra que no salió definida (LB4) y una en la que la banda si corrió correctamente a los 8 ciclos (CN5). Se realizó la PCR en ciclos de 8, 10 y 12 ciclos de amplificación para decidir la cantidad adecuada para obtener el número de bases correspondientes (550 pb). Como se observa en la imagen, las muestras correspondientes a 12 ciclos de amplificación fueron aquellas que mostraron un valor muy cercano al esperado, por ende, se llegó a la conclusión que el número de ciclos de amplificación a utilizar para aquellas muestras que salieron difuminadas iba a ser de 12.

e. Incorporación de códigos identificativos mediante PCR y evaluación de productos mediante electroforesis

La técnica de NGS requiere que cada muestra de fragmentos de ADN del gen 16S rRNA contengan un identificador único. Para lograr esto se utilizó la técnica de PCR utilizando los productos de PCR arriba obtenidos. Como medio de verificación del tamaño de fragmentos amplificados en el proceso se utilizó la técnica de electroforesis en gel, la cual permite separar las moléculas de ADN por su tamaño. Se empleó el gel de agarosa al 1% y se evaluaron las muestras a 83V por 65 minutos (figura 5) y 83V por 55 min (figura 6).

En la figura 5 se puede observar a todas las muestras que fueron amplificadas por 8 ciclos (excepto por la muestra 10₅ y 10₂ con Oligoclean). Se puede observar que todas las muestras

Figura 5: Electroforesis tras Index PCR (8 ciclos)

(1) CN1 (2) CN2 (3) CN4 (4) CN5 (5) LB1 (6) LB1 (7) LB2 (8) Ladder 1k pb (9) BHI1 (10) BHI2 (11) BHI3 (12) MTC (13) MTC (14) 10₃ (15) 10₆ (16) 10₅ (17) 10₂ (18) 10₆

LB: Luria Bertani, BHI: Brain Heart Infussion, CN: Caldo nutritivo, MTC: Muestra pura de tocosh

muestran número de pares de bases esperados, ya que se ha obtenido en todas las muestras valores cercanos a los 630 pb deseados, como lo indica el Protocolo de Secuenciación del 16S Metagenomic (16).

En la figura 6 se ubican las muestras amplificadas por 12 ciclos (muestras 3 a 9) y la banda 1 y 2 correspondientes a las muestras 10₅ y 10₂ de Oligoclean. Al igual que la figura 5, se puede evidenciar que los fragmentos amplificados muestran el tamaño deseado de 630 pb. De esta forma, se concluye que las muestras de ADN contienen los identificadores únicos y para su secuenciación.

Figura 6: Electroforesis tras Index PCR (12 ciclos)

(1) 10₅ (2) 10₂ (3) CN3 (4) BHI4 (5) BHI5 (6) Ladder 1k pb (7) LB3 (8) LB4 (9) LB5

LB: Luria Bertani, BHI: Brain Heart Infussion, CN: Caldo nutritivo

f. Taxonomía de la muestra inicial de tocosh

Las muestras arriba obtenidas se secuenciaron en un equipo MySeq de Illumina. Los datos obtenidos fueron clasificados según su identificador único y fueron subidos a la plataforma Ezbiocloud (20). Esta última analiza automáticamente cada secuencia obtenida, la compara con bases de datos de organismos conocidos (GreenGenes v.16.0), identifica su representación relativa en la muestra y organiza taxonómicamente. En general, cada muestra secuenciada fue representada por alrededor de 10-15 mil secuencias, entre las cuales existían hasta 335 secuencias únicas.

Se utiliza la taxonomía como ciencia para poder clasificar de una forma jerarquizada a los seres vivos, por ende, para un mejor análisis de los microorganismos presentes en las muestras secuenciadas se utilizó esta clasificación. Con el objetivo de conocer la composición

microbiana inicial, se realizó esta clasificación taxonómica en la muestra de tocosh cruda. Nuestro análisis identificó 335 especies distintas en la muestra inicial de tocosh crudo, indicando que una gran variedad de especies coexiste en esta muestra.

Figura 7: Clasificación taxonómica desde Filo a especie de la muestra de tocosh cruda.

La figura 7 muestra los resultados de la clasificación taxonómica de esta muestra inicial. Se puede observar que no se encontró gran variedad en los Filos de esta muestra, siendo el Filo predominante el de *Firmicutes* y en segundo lugar se encuentran los *Bacteroidetes*. En el caso de las clases, *Clostridia* fue la más significativa, seguido de la clase *Bacteroidia*. Por ende, en la categoría de orden se encontró mayor abundancia de los *Clostridiales* y en segundo lugar los *Bacteroidales*. Las familias de microorganismos encontrados en el tocosh crudo tuvieron una distribución muy parecida para los *Clostridiaceae* y *Prevotellaceae*, ya que se ve la presencia similar de ambas familias. En el caso de género y especie, estas fueron las clasificaciones donde se obtuvo mayor variedad. En el caso de los géneros fueron el *Clostridium* y *Prevotella* lo más abundantes; siendo el grupo de *Clostridium neuense* y *Prevotella JQ085665_s* las especies con mayor predominancia en la muestra. Además, se reconoce la presencia de *Lactobacillaceae_uc* y *Clostridium_uc* dentro de las especies.

g. **Diversidad cualitativa encontrada en los medios de cultivo a las 72 horas (Familia-Género-Especie)**

Figura 8: Comparación de las familias bacterianas encontradas en los tres medios de cultivo estudiados al cabo de 72 horas de incubación

La figura 8 tiene como objetivo mostrar las familias de microorganismos encontradas en cada uno de los medios de cultivo al cabo de las 72 horas de cultivo, se observan los microorganismos que se desarrollaron en los tres medios de cultivo como los que solo se pudieron observar en dos de ellos BHI- LB o CN-LB. En total, se identificaron 33 familias en este tiempo de incubación. En cuanto a las familias que se encontraron en los tres medios de cultivo, estas fueron siete. Dentro de estas encontramos a la familia de *Bacilaceae*, *Bacillales_uc*, *Clostridiaceae*, entre otras. Podemos observar que el medio de cultivo en el que se encontró mayor diversidad fue en CN y el de menor diversidad fue LB. Para conocer con mayor exactitud la diversidad encontrada en estas muestras, se utilizó la clasificación taxonómica que le continúa a la familia, género (Figura 9) y especies (Figura 10).

Figura 9: Comparación de los géneros bacterianos encontrados en los tres medios de cultivo estudiados al cabo de 72 horas de incubación

Los géneros encontrados en las muestras al cabo de 72 horas de cultivo fueron un total de 54 y de estos, 7 especies fueron las que se hallaron en los tres medios de cultivo. En cuanto a la distribución, esta fue mucho más equitativa, debido que se pudo observar un número de especies similares en cada uno de los medios de cultivo. Al igual que en el caso de las familias, los medios de cultivo que compartieron mayor similitud de especies fueron LB y BHI. Asimismo, en esta clasificación si se pudo observar que BHI y CN compartieron un solo género el cual fue *Ureibacillus*. El último nivel de clasificación es el de especies, y nos permite conocer de manera más precisa la variedad encontrada tres días después del cultivo.

Figura 10: Comparación de las especies bacterianas encontradas en los tres medios de cultivo estudiados al cabo de 72 horas de incubación

En esta figura se observa la gran diversidad cualitativa que presentan estas muestras. Fueron 77 las especies de microorganismos que mostraron desarrollo al cabo de tres días de cultivo. Las especies que se desarrollan en los tres medios de cultivo fueron 9. El medio de cultivo con mayor diversidad fue el de CN con 20 especies encontradas, seguido con 19 especies en LB y, por último, con 13 especies encontradas en BHI. Al igual que en los resultados anteriores, los dos medios que comparten mayor cantidad de microorganismos son BHI y LB, y en este caso los medios de cultivo BHI y CN tienen en común tres especies, siendo también tres especies las encontradas en CN y LB. Se observa mayor diversidad cualitativa en este gráfico, ya que se habla de las unidades mínimas de clasificación taxonómica, es decir acá se encuentran las especies que pertenecen a los géneros encontrados en el análisis superior y estos géneros pertenecen también a las familias representadas en la figura 10.

h. Variación en el tiempo de los filos identificados en cada medio de cultivo

El desarrollo de las bacterias puede presentar cambios a lo largo del tiempo. Este desarrollo puede verse afectado positiva- o negativamente, favoreciendo así el crecimiento variado de microorganismos o de lo contrario disminuiría su crecimiento. Por eso se realizó una comparación de los filos encontrados en las muestras pertenecientes a un mismo medio de cultivo en los cinco tiempos.

LURIA BERTANI (LB)

Tabla 5: Comparación de filos por tiempo de las muestras en medio de Luria Bertani (LB)

Phylum	24h		48h		72h		96h		120h	
	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
Firmicutes	15779	97.8421	30337	99.9703	40765	99.9412	32846	99.9239	18435	99.8538
Bacteroidetes	316	1.9594	x	x	x	x	1	0.003	1	0.0054
Proteobacteria	10	0.062	9	0.0297	22	0.0539	24	0.073	16	0.0867
Actinobacteria	7	0.0434	x	x	2	0.0049	x	x	10	0.0542
Parcubacteria_OD1	5	0.031	x	x	x	x	x	x	x	x
Spirochaetes	4	0.0248	x	x	x	x	x	x	x	x
Verrucomicrobia	3	0.0186	x	x	x	x	x	x	x	x
Berkelbacteria	2	0.0124	x	x	x	x	x	x	x	x
Acidobacteria	1	0.0062	x	x	x	x	x	x	x	x
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes										

Para poder conocer cómo afecta el tiempo en el crecimiento o desarrollo de los filos encontrados en las muestras incubadas en LB, se elaboró una tabla de comparación de las muestras de cada tiempo. Aquí se puede observar que la presencia de *Firmicutes* es permanente y estos representan a un 99% de todos los filos encontrados en los cinco tiempos. A las 24 hrs de incubación, el segundo filo que se encontró en mayor abundancia en esta muestra fueron los *Bacteroidetes* y en tercer lugar las *Proteobacterias*. Además, se puede reconocer que conforme pasa el tiempo la diversidad va disminuyendo, ya que es en el primer tiempo en donde se encontró mayor diversidad de filos y a las 120 hrs de incubación solo se encontraron cuatro tipos distintos. Se reconoció la presencia de *Proteobacterias* en los cinco tiempos de muestra en el medio LB y la presencia de *Bacteroidetes* fue en las muestras de los tiempos 24, 96 y 120 hrs. El grupo de Actinobacterias se encontró en el primer tiempo (24 hrs), el tercer tiempo (72 hrs) y el quinto (120 hrs).

CALDO NUTRITIVO (CN)

Tabla 6: Comparación de filos por tiempo de las muestras en medio de Caldo Nutritivo (CN)

Phylum	24h		48h		72h		96h		120h	
	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
Firmicutes	16811	99.73	9396	100	10445	99.77	15528	99.99	11548	100
Bacteroidetes	41	0.24	x	x	x	x	x	x	x	x
Proteobacteria	3	0.02	x	x	19	0.18	1	0.01	x	x
Planctomycetes	2	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
Actinobacteria	x	x	x	x	5	0.05	x	x	x	x
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes										

En la tabla 6, se puede observar que los *Firmicutes* son los que representan la mayoría de microorganismos en cada tiempo de incubación. Además, se puede visualizar en los resultados que la variedad va disminuyendo conforme pasa el tiempo, ya que es la muestra correspondiente a las primeras 24 horas la que posee mayor variedad de bacterias. Además de estar presentes en el primer tiempo, se encontró que las *Proteobacterias* también formaban parte de las muestras a las 72 y 96 horas de incubación.

BRAIN-HEART INFUSION (BHI)

Tabla 7: Comparación de filos por tiempo de las muestras en medio de Brain-Heart Infusion (BHI)

Phylum	24h		48h		72h		96h		120h	
	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
Firmicutes	16155	99.40	20319	99.94	8781	99.82	8919	99.74	11015	99.32
Bacteroidetes	96	0.59	2	0.01	x	x	1	0.01	x	x
Proteobacteria	x	x	6	0.03	6	0.07	16	0.18	75	0.68
Planctomycetes	2	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
Actinobacteria	x	x	2	0.01	6	0.07	6	0.07	x	x
Chloroflexi	x	x	2	0.01	x	x	x	x	x	x
Fusobacteria	x	x	x	x	4	0.05	x	x	x	x
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes										

En la tabla 7 se observa que en los cinco tiempos de la muestra de BHI, son los *Firmicutes* los que representan la mayoría de microorganismos, ya que todos los tiempos se encontró que este filo representaba el 99% de la muestra. Los *Bacteroidetes* por su parte, fueron parte de los dos primeros tiempos de incubación, es decir los primero dos días, pero en el tercer día al cabo de 72 horas ya no destacó su presencia, sin embargo, se observó que el crecimiento

volvió al paso de 96 horas. Las *Proteobacterias* empezaron su desarrollo al segundo día de incubación en este medio y tuvieron un aumento directamente proporcional al tiempo.

i. Progresión temporal de las familias más abundantes en los tres medios de cultivo evaluados

Figura 11: Comparación de las familias presentes en tres medios de cultivo en el tiempo. La figura muestra la abundancia relativa de los géneros identificados en la microbiota del tocosh en los medios LB (A), CN (B) y BHI (C) y su variación en los diferentes tiempos.

Los niveles taxonómicos con los que agrupan a las bacterias jerárquicamente son filo, clase, orden, familia, género y especie. Con el objetivo de identificar la variación en el tiempo de familias presentes en los tres medios de cultivo (LB, CN y BHI), se realizó la secuenciación masiva utilizando el método de secuenciación 16S. Como se observa en la **figura 11**, las familias más abundantes identificadas en la muestra de tocosh original (*Clostridiaceae* y *Prevotellaceae*) disminuyen progresivamente con el tiempo en los tres medios de cultivo y aquellas familias con una menor abundancia incrementan (*Bacillaceae*, *Bacillales_uc* y *Paenibacillaceae*). La familia más abundante identificada en los tres medios de cultivo es *Bacillaceae* y esta se mantiene en el tiempo. Los medios de cultivo, aparentemente, favorecen el crecimiento y desarrollo de la familia *Bacillaceae*.

j. **Identificación de los géneros más abundantes en los tres medios de cultivo a lo largo del tiempo**

Figura 12: Comparación de los géneros presentes en tres medios de cultivo en el tiempo. La figura muestra la abundancia relativa de los géneros identificados en la microbiota del tocosh en los medios LB (A), CN (B) y BHI (C) y su variación en los diferentes tiempos.

En la **figura 12**, los géneros más abundantes identificados en la muestra de tocosh original (*Clostridium* y *Prevotella*) disminuyen progresivamente con el tiempo en los tres medios de cultivo y aquellos géneros con una menor abundancia incrementan. Como se observa, el crecimiento a las 24 hrs en los 3 medios favorece notablemente al género *Bacillus*. El medio LB, a su vez, favorece al género *Bacillales_uc*, seguido de *Planococcaceae_uc*. El medio CN, al igual que LB, favorece a *Bacillales_uc*, pero en menor medida al género *Planococcaceae_uc*. En el medio BHI se puede observar que el segundo género favorecido en el tiempo es *Paenibacillus*, seguida de *Bacillales_uc*. Si bien el género *Clostridium* disminuye progresivamente en los tres medios, la ausencia de este se da a las 96 horas en el medio CN mientras que en el medio LB y BHI están presentes hasta las 120 hrs de cultivo. Los tres medios evaluados, aparentemente, resultan favorecer al crecimiento del género *Bacillus*.

k. Identificación de las especies más abundantes en los tres medios de cultivo a lo largo del tiempo

Figura 13: Comparación de las especies presentes en tres medios de cultivo en el tiempo. La figura muestra la abundancia relativa de las especies identificadas en la microbiota del tocosh en los medios LB (A), CN (B) y BHI (8) y su variación en los diferentes tiempos.

En la **figura 13**, las especies más abundantes identificadas en la muestra de tocosh original (*Clostridium neuense group* y *Prevotella JQ085665_s*) disminuyen progresivamente con el tiempo en los tres medios de cultivo y aquellas especies con una menor abundancia incrementan (*Bacillus cereus group*, *Bacillales_uc*). La especie más abundante identificada en los tres medios de cultivo es *Bacillus cereus* y ésta se mantiene en el tiempo. El medio LB también se observa que la especie *Planococcaceae_uc* es favorecida progresivamente hasta las 120 horas de cultivo. Por otro lado, en el medio CN, la ausencia de la especie *Prevotella JQ085665_s* se da a las 48 horas de cultivo, en el medio BHI a las 120 horas y finalmente en el medio LB no desaparece. Los medios de cultivo, aparentemente, favorecen el crecimiento y desarrollo de la especie *Bacillus cereus*. Si bien es cierto, se ha observado un desarrollo de distintas especies en los medios de cultivo, existiendo 61 de especies en el medio de cultivo LB, podemos identificar que esta variedad es cualitativa, sin embargo, el mayor número de especies es dominado por *Bacillus cereus*, demostrando así falta de variedad cuantitativa.

Si bien las figuras se pueden observar variaciones de los microorganismos a lo largo de los tiempos de cultivo y entre cada medio, la mayor proporción de estos pertenecen a una sola

especie (*Bacillus cereus* group). Encontramos que los tres medios evaluados no favorecen al crecimiento estable y variado de microorganismos, observándose una preferencia hacia las familias descritas anteriormente.

5. DISCUSIÓN

La presente investigación identificó la población microbiana del tocosh (familias, géneros y especies) en tres medios de cultivo (LB, BHI y CN) y su variación en el tiempo. Nuestros resultados muestran que los tres medios de cultivo evaluados no favorecen el desarrollo variado de microorganismos inicialmente presentes en la muestra de tocosh, al contrario, favorece el desarrollo una sola especie (*Bacillus cereus*). Al respecto, estudios realizados sobre esta bacteria, refieren que la temperatura óptima de crecimiento del *Bacillus cereus* radica entre los 30 a 40°C y existen cepas que crecen desde los 7°C, todas en presencia de materia orgánica (21). Esta es una bacteria gram-positiva facultativa, formadora de esporas y productora de toxinas (emética y diarreica), patógena para animales y seres humanos, que es resistente a distintas condiciones ambientales de temperatura, humedad, pH, O₂, etc. Además, está ampliamente distribuida en la tierra, agua, intestino de insectos e incluso en la microbiota humana (22). Esto explicaría su abundancia en los tres medios evaluados en esta investigación, ya que los cultivos se realizaron a temperatura ambiente (15-19°C) bajo agitación con presencia de oxígeno y los medios poseían material orgánico como parte de su composición. Por ende, como se detalló anteriormente, los medios de cultivo utilizados contienen material orgánico que fue determinante para la predominancia en el crecimiento de la bacteria *B. cereus*. Además, las condiciones ambientales durante la incubación favorecieron el desarrollo de la misma.

Otra explicación acerca del predominio del género *Bacillus* en los tres medios de cultivo es que esta especie produce metabolitos antibióticos (Iturinas, surfactinas y fengicinas) que afecta a otras bacterias y hongos. Villarreal y colaboradores, estudiaron los efectos antimicrobianos del género *Bacillus* y los mecanismos de acción que favorecen el control fitopatógeno en la industria agrícola (23). De igual manera, Tejera y colaboradores mencionan que la especie *Bacillus cereus* es de gran importancia en el control de patógenos en el cultivo de alimentos, pues produce zwirtemincina A, un antibiótico que suprime el crecimiento de hongos y potencia el efecto de las toxinas producidas por *Bacillus thuringiensis*, además de producir quitinasas que podrían ayudar a la misma función. (24). Estudios recientes en *Bacillus cereus* indican que esta especie posee genes que codifican

antibióticos (25). Wang y colaboradores, realizaron un estudio con *Bacillus cereus* donde lograron identificar los genes que codifican antibióticos (cerecidinas), presentes en esta especie, que son péptidos cíclicos sintetizados ribosómicamente que tienen efecto antimicrobiano sobre diversas bacterias. Este gen fue co-expresado en *E.coli* y el resultado de cerecidinas con actividad microbiana fue mayor (25). De igual manera, Xin y colaboradores, indican que la supervivencia y adaptabilidad atribuidos a la formación de esporas, característico de este grupo, se ve incrementada al producir sustancias con poder antimicrobiano de amplio espectro como los antibióticos (cerecidina y turicina) (26). De acuerdo a lo mencionado, se presume que los mecanismos utilizados por *B. cereus* favoreció a su crecimiento e inhibió el desarrollo de otras bacterias llevando a un predominio casi total de esta especie en los medios de cultivo.

La predominancia del género *Clostridium* en la muestra inicial de tocosh crudo, se puede explicar por su naturaleza como microorganismos fermentadores. Todas estas se caracterizan por ser especies sacarolíticas, en donde utilizan las rutas de glicólisis para la fermentación de productos. (27). Jiménez y colaboradores, mencionan haber obtenido resultados similares al encontrar abundancia de este género en las muestras de papa conservadas 1 a 8 meses. La papa al estar compuesta por 18-20% de carbohidratos donde 16% es almidón, permite que este es utilizado como sustrato de las rutas sacarolíticas antes mencionadas, otorgando como productos de fermentación H₂, CO₂, ácido acético y butírico. El crecimiento de bacterias debería estar relacionada directamente con la degradación de almidón. (28). La especie *Clostridium neuense* es la especie en mayor abundancia en esta muestra inicial, a la cual la bibliografía le atribuye características como anaerobia y la cual produce moléculas de hidrógeno como principal resultado de fermentación a partir de glucosa, aunque también se sabe que el CO₂, acetato y butirato son otros de las sustancias producidas tras este proceso (29).

Sobre esta especie no se conoce mucho, pero se ha encontrado una similitud en la secuencia de 96.4% con *Clostridium acetobutylicum*. (29). Este último es un organismo anaerobio, heterofermentativo, sin embargo, en estudios se evaluó la presencia de oxígeno para el crecimiento de esta especie y se encontró que la utilización de glucosa en un ambiente aerobio era menor comparada con uno anaerobio. Por otro lado, se observó que la producción de acetato era similar en ambos ambientes. Además, se encontró que la exposición de oxígeno en un tiempo corto no era letal, sino que podía detener el crecimiento y evitar la síntesis de ADN, ARN y proteínas (30).

Otra característica de este género de especies es que suelen agruparse en *biofilms*, siendo la más conocida y la que se relaciona más estrechamente con la salud la de *Clostridium difficile*. Se reconoce que esta bacteria puede ser la causante de infecciones gastrointestinales severas (31). Sin embargo, se sabe que no todas las especies son patógenas para el humano, ya que no todos los pacientes colonizados se vuelven sintomáticos, sino que estas colonias podrían producir anticuerpos a la *C. difficile* sin causar infección y que estos anticuerpos sean protectores de otras infecciones a futuro. Con respecto al intestino, los cambios en la microbiota pueden producir una alteración en el ecosistema y disminuir la resistencia a la colonización de esta bacteria, produciendo así ecotoxinas (31).

El crecimiento y desarrollo de *Bacillus cereus*, se podría evitar disminuyendo la temperatura, o modificando las variables como pH y actividad de agua. El estudio realizado por Chorin y colaboradores en el cual también se utilizó el medio BHI para la inoculación de la especie, se quiso probar el crecimiento de esta manipulando los factores arriba mencionados y se encontró con resultados que indican que a temperaturas de aproximadamente 4°C ya no se observó crecimiento en ninguna condición de pH (32). A temperaturas de 20-30°C, no se observó crecimiento excepto cuando la actividad de agua (a_w) era elevada. A la actividad de agua la entendemos como un factor clave en el desarrollo de microorganismos, el rango de la actividad de agua va de 0-1. Se sabe que A_w para la mayoría de bacterias que producen un deterioro en alimentos es alrededor de 0.90, y que para el crecimiento de hongos y levaduras el valor es próximo a 0.61 (32). Asimismo, los resultados demostraron que las cepas no crecían cuando el pH era menor a 5 o la actividad de agua menor a o igual a 0.95 (32). Esto tiene sentido, ya que al inocularse la muestra de tocosh fresco en los medios de cultivo cuyo pH era cercano a la normalidad, promovió el desarrollo de *Bacillus*, cuyo desarrollo no se da en la muestra fermentada de tocosh debido a temperaturas frías y pH ácido. Además, de la disminución de humedad que se ha visto en las papas cuando se supera los 60 días (33). Por otro lado, las concentraciones de NaCl en el medio deben ser factores a tener en cuenta para el crecimiento de estas cepas, puesto que mencionan que, a mayor concentración de NaCl en el medio, mayor debe ser la concentración del inoculado (34). Para una mayor diversidad cuantitativa de las muestras se recomienda que el crecimiento se realice en ambientes o ecosistemas lo más cercanos o similares al del tocosh de papa o del origen de la microbiota, ya que existe una relación entre la carga microbiana, específicamente de mesófilos viables a mayor fermentación-putrefacción, al menos hasta los 30 días de fermentación (33). En el caso de mohos y levaduras, se encontró que el número de estos incrementa significativamente hasta los 30 días, para luego estabilizarse; sin embargo, sucede una disminución a los 60 días, debido

que se encontró que las bacterias ácido-lácticas, cuyo crecimiento es proporcional al tiempo, son eficaces para la inhibición de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. (33).

La diversidad cualitativa de la muestra se vio reflejada en las figuras 8, 9 y 10. Esta fue evaluada tras las 72 horas de cultivo, debido a que al tercer día se evidenció crecimiento significativo mediante OD. Los medios evaluados promovieron el desarrollo de microorganismos con una variabilidad distinta de familias/géneros/especies. Se encontró que el medio CN y BHI fueron los medios donde se presentaron mayor variabilidad, mayor número de bacterias distintas. Al respecto, en el estudio realizado por Lau J y colaboradores (35), se realizaron cultivos de muestras fecales de personas, en 66 condiciones diferentes de cultivo relacionados a sustratos, presencia/ausencia de oxígeno, y se realizó el secuenciamiento del gen 16S rRNA de cada una de estas (35). De manera similar a nuestro estudio, se determinó que la mayor variabilidad molecular estuvo presente en los medios de cultivo enriquecidos en comparación a las muestras sin cultivar (35). Además, en el mismo estudio se lograron cultivar sólo las células viables de la muestra original y recuperar a aquellas bacterias que estaban en menor abundancia encontrándose diferencias entre las 66 condiciones diferentes de cultivo (35). Al igual que en este estudio, el cultivo de la muestra de tocosh, en tres medios diferentes (BHI, LB y CN) logró evidenciar la diversidad viable de bacterias presentes en la muestra de tocosh inicial, observándose que cada medio de cultivo favorece al crecimiento de ciertas familias/géneros/especies que pueden ser estudiadas de forma aislada para comprender su rol dentro de la composición del tocosh (35).

El estudio realizado por Fu Y y colaboradores evaluó el efecto de 4 medios de cultivo sobre la muestra de microbiota fecal. Los medios evaluados fueron Brain Heart Infusion (BHI), Gut Microbiota Medium (GMM), Fastidious Anaerobe Broth (FAB) y Bacterial Grow Media (BGM). Este estudio también analizó la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), por tratarse de una muestra de microbiota humana, y se encontró que el medio GMM favoreció a una mayor producción de SCFA (36). Análisis de secuenciación del gen 16S rRNA similar al que utilizamos en el presente estudio determinó que el medio con mayor diversidad de microorganismos estuvo en el medio BHI (36). Si bien nuestro estudio trabajó con una muestra de microbiota de origen vegetal fermentado (Tocosh), se presume que estos producen metabolitos secundarios a partir de los sustratos de los medios de cultivo BHI, LB y CN que a su vez podrían influenciar la variabilidad entre cada una de estas muestras. Otro hallazgo encontrado en este estudio es la similitud de ciertos géneros de bacterias presentes en la microbiota fecal y las encontradas en el tocosh. Los géneros reportados en la microbiota

intestinal cultivados a las 48 hrs fueron *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia* - *Shigella* y *Streptococcus* con la disminución de otros géneros como *Prevotella* y *Ruminococcaceae* en los 4 medios de estudio con una abundancia relativa de *Bacteroides* y *Lachnospira* en el medio BHI (36). De la misma manera, en nuestro estudio, se evidencia una variación de microorganismos en el tiempo, siendo el género *Clostridium* el que se encuentra en los tres medios de cultivo a las 48 hrs y una abundancia relativa del género *Bacillus* en el medio BHI. (36).

La variabilidad cualitativa puede ser influenciada a partir de distintos factores, tal como lo señalan Delevigne y col., en su estudio acerca de la heterogeneidad fenotípica microbiana (37). Los autores exponen que existen diferencias en las características fenotípicas de los microorganismos durante el crecimiento y desarrollo y que estas dependen de factores como densidad celular, sustratos disponibles, vías metabólicas utilizadas, etc. (38, 37). La variabilidad puede ser a su vez metabólica al interno de cada especie bacteriana. Por ejemplo, se demostró que los microorganismos pueden adquirir heterogeneidad metabólica estudiando microorganismos sometidos a altas concentraciones de glucosa y donde se reveló la coexistencia de dos rutas de glucólisis (37). Por otro lado, también se demostró que la densidad celular puede influenciar significativamente a la densidad de la población. Es decir que la concentración microbiana del cultivo puede ser un factor que influye en la composición final tras el crecimiento y desarrollo microbiano (39). Se observó que una sola célula cultivada en un ambiente sin la presencia de otras muestras que compitan por sustratos también puede revelar crecimiento celular demostrando que ella misma puede sobrevivir y adaptarse al medio (37). Otro hallazgo interesante indica que el comportamiento metabólico se reparte a lo largo de toda la población donde las bacterias de una misma especie se reparten funciones (37). En ese estudio, las células fueron cultivadas individualmente en cámaras de microfluidos (de un volumen mucho menor) y exhibían una mejor capacidad en responder a la densidad celular comparadas a pruebas de laboratorio con sistemas de cultivo a mayor escala como biorreactores industriales. Esta información nos indica que son diversos factores los que determinan el crecimiento microbiano en cualquier medio, evidenciado la diversidad presente en toda microbiota y que la variabilidad cualitativa de cualquier población puede cambiar en el tiempo debido a la densidad celular, composición de la microbiota, especialización metabólica y la producción de metabolitos (37, 38, 39). Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que la diversidad microbiana del tocosh puede ser definida por sustratos presentes en cada medio de cultivo, como la respuesta de los microorganismos de la muestra en cada uno, además de factores exógenos. La respuesta

microbiana puede variar por características mínimas, siendo esta una de las bases de la gran diversidad microbiana en cada uno de los seres humanos.

6. CONCLUSIONES

- El presente estudio ha utilizado el secuenciamiento de próxima generación (NGS) en función de la propagación de bacterias en un sistema de cultivo complejo. Este método nos ha permitido confirmar la variedad de la microbiota del tocosh crudo y como esta se ve modificada a lo largo del tiempo en tres medios de cultivo distintos.
- La composición microbiana en las tres muestras varió en comparación a la inicial, la cual tenía *Clostridium* como género más abundante, siendo luego *Bacillus* el género con mayor predominancia en los tres medios de cultivo. Además, se encontró menor variedad de especies en todas las muestras secuenciadas en comparación a la variedad inicial de microbiota de tocosh. Sin embargo cada medio cultivo presenta especies únicas.
- La prevalencia de especies del género *Bacillus* puede ser debido a la formación esporas como mecanismo de supervivencia y a la producción de metabolitos que tienen la capacidad de actuar como antibióticos, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos. Estudios futuros podrían realizar pruebas controlando los factores ambientales que se asemejen al ecosistema natural del crecimiento de tocosh y así reducir la presencia de *Bacillus*.
- El presente estudio confirmó la presencia de bacterias probióticas a las cuales se le atribuye el efecto benéfico para la salud como es el caso de *Lactobacillus*, presente en la muestra inicial de tocosh. Sin embargo, tras la incubación de la muestra cruda en los tres medios de cultivo no selectivos se evidenció una disminución casi total de *Lactobacillus* y un predominio de *Bacillus cereus* en los tres medios, siendo este último considerado como un microorganismo patógeno.

7. REFERENCIAS

1. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. World J Gastroenterol. 2015 Aug 7;21(29):8787-803.
2. Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y. Skin microbiota-host interactions. Nature. 2018 Jan 24;553(7689):427-436.
3. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Migliano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. Microorganisms. 2019 Enero 10; 7(1):14.
4. Dicks L, Dreyer L, Smith C, D.van Staden A. A Review: The Fate of Bacteriocins in the Human Gastro-Intestinal Tract: Do They Cross the Gut–Blood Barrier? Front. Microbiol.2018; 9:1-14.
5. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol. 2015 Agosto 7; 21 (29):8787-803.
6. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. Immunol Rev. 2017; 279(1):90–105.
7. Ohkusa T, Koido S, Nishikawa Y, Sato N. Gut Microbiota and Chronic Constipation: A Review and Update. Front Med (Lausanne). 2019; 6:19.
8. Keeney K, Yurist-Doutsch S, Arrieta M, Finlay B. Effects of Antibiotics on Human Microbiota and Subsequent Disease. Annual Review of Microbiology. 2014: 68(1); 217–235.
9. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. Trends in Molecular Medicine. 2016: 22(6); 458–478.
10. Chen L, Gu Q, Li P, Chen S, Li Y. Genomica análisis of *Lactobacillus reuteri* WHH1689 reveals its probiotic properties and stress resistance. Food Sci Nutr. Feb 2019; 7(2):844-857.
11. Escudero L, Alvarez P. Efecto Gastroprotector del Extracto Acuoso del Tocosh de *Solanum Tuberosum* en las Úlceras Gástricas en Ratas Albinas [Tesis de Titulación]. Perú: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018.
12. Gutiérrez I. Efecto Antagónico in vitro de *Lactobacillus spp.* aislados de Tocosh-*Solanum sp.*, proveniente de Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas [Tesis de Titulación]. Perú: Universidad Norbert Wiener; 2019.

13. Jiménez C, Bernardi D. Tipificación y determinación de los cambios en la composición de la microbiota presente en los distintos procesos de elaboración del tocosh de papa (*Solanum tuberosum*) [Tesis de Titulación]. Perú: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2019.
14. Alarcón Cavero T, D'Auria G, Delgado Palacio S, Del Campo Moreno, R, Ferrer Martínez, M. Microbiota. 59. Del Campo Moreno R, coordinadora. Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editores. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016.
15. Viadel B, Porta S, Rodrigo A, Gómez JL, Valverde M, Rivera D. Modulación in vitro de la microbiota intestinal para el estudio de la funcionalidad de compuestos bioactivos. AINIA Centro Tecnológico. 2011.
16. Holgado R, Irina E. Análisis del crecimiento bacteriano en diversas zonas vivas e inertes. [Trabajo de investigación]. Madrid: Instituto Juan Gris. 2016.
17. Tamargo A, Gil I, Miralles B, Matín D, Rodríguez M, Fornari T et al. Simulador gastrointestinal dinámico (simgi®): una herramienta potencialmente útil en nutrición clínica. Nutr Hosp. [Internet].2017 [Consultado 2019 Abr 12]; 34(6): 1489-1496. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112017000900032&lng=es
18. Venema K, Abbeele P. Experimental models of the gut microbiome. Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology. 2013; 27(1); 115-126.
19. Joly C, Gay-Quéheillard J, Léké A, et al. Impact of chronic exposure to low doses of chlorpyrifos on the intestinal microbiota in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) and in the rat. Environ Sci Pollut Res. 2013; 20(5):2726-2734.
20. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. Int J Syst Evol Microbiol. 67:1613-1617
21. Sánchez J, Correa M, Castañeda-Sandoval LM. *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. Rev. Fac. Nac. Salud Pública; 34(2): 230-242.
22. Bottone E. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. Clinical Microbiology Reviews. 2010; 23(2): 382-398.

23. Villarreal M, Villa E, Cira L, Estrada M, Parra F, Santos S. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Rev. Mex. Fitopatol.* 2018; 36(1): 95-130.
24. Tejera B, Rojas M, Heydrich M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológicos de hongos fitopatógenos. *CENIC.* 2011; 42(3): 131-138.
25. Wang J, Zhang L, Teng K, Sun S, Sun Z, Zhong J. Cerecidins, Novel Lantibiotics from *Bacillus cereus* with Potent Antimicrobial Activity. *Applied and Environmental Microbiology.* 2014; 80(8): 2633-2643.
26. Xin B, Zheng J, Xu Z, Song X, Ruan L, Peng D, et al. The *Bacillus cereus* is an Excellent Reservoir of Novel Lanthipeptides. *Applied and Environmental Microbiology.* 2015; 81(5): 1765- 1774. Dürre P. Physiology and Sporulation in *Clostridium*. American Society for Microbiology Press. 2014:1-14.
27. Jiménez E, Yépez A, Pérez A, Ramos E, Zúñiga D, Vignolo G, et.al. Exploring diversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria from tocosh- Traditional Peruvian fermented potatoes - By high throughput sequencing (HTS) and culturing. *LWT Food Science and Technology.* 2017.
28. Zhao X, Li D, Guo Z, Zhang Y, Man L, Jiang B, et al. *Clostridium guangxiense* sp. Nov. And *Clostridium neuense* sp. Nov., two phylogenetically closely related hydrogen-producing species isolated from lake sediment. *Int J Sys Evol Microbiol.* 2017; 67:710-715.
29. Obrien R, Morris J. Oxygen and the Growth and Metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of General Microbiology.* 1997; 68:307-318.
30. Dapa T, Unnikrishnan M. Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut Microbes.* 2013;4(5):397-402.
31. Lab-Ferrer. Actividad de agua en alimentos. Fichas técnicas
32. Chorin E, Thuault D, Cléret J, Bourgeois C. Modelling *Bacillus cereus* growth. *International Journal of Food Microbiology.* 1997: 229-234.
33. Yábar E, Reyes V. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del tocosh de papa (*Solanum tuberosum*) durante su elaboración. Prospectiva Universitaria. Depósito legal en la biblioteca Nacional del Perú. 2017.

34. Marrku R, Genigeorgis C. Effect of pH and Sodium Chloride on Growth of *Bacillus cereus* in Laboratory Media and Certain Foods. American Society for Microbiology. 1975; 29(1): 68-73.
35. Lau J, Whelan F, Herath I, et al. Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. Genome Medicine. 2016; 8:12.
36. Yousi F, Kainan C, Junnan Z, et al. Evaluation of the effects of four media on human intestinal microbiota culture in vitro. AMB Expr. 2019; 9: 69.
37. Delvigne F, Zune Q, Lara A, Al-Soud W, Sorensen S. Metabolic variability in bioprocessing: implications of microbial phenotypic heterogeneity. Trends in Biotechnology. 2014;32(12): 608-616.
38. Basu S, Bose C, Ojha N, Das N, Das J, Pal M, Khurana S. Evolution of bacterial and fungal growth media. Bioinformation. 2015 Apr 30;11(4):182-4.
39. Rodas-Gaitán Heberto A., Rodríguez-Fuentes Humberto, Flores-Mendiola Gerardo, Vidales-Contreras Juan A., Aranda-Ruiz Juana, Luna-Maldonado Alejandro I. Efecto de la densidad celular de inoculación en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* CLV2 cultivada bajo condiciones mixotróficas. Rev. fitotec. mex. 2012 Sep; 35(spe5): 83-86.

8. ANEXOS

Tabla 1. Cantidad de ADN a utilizar para un volumen total de 50 µL					
	Tiempo (horas)				
	24	48	72	96	120
LB	17	9	9	7	9
CN	8	6	4	5	4
BHI	3	3	9	5	5
Anotación: Para la muestra de tocosh puro se necesitará 3 µL					

Comparación de filos y familias encontradas en cada medio de cultivo

Tabla 2. Comparación de filos de microorganismos presentes según medio de cultivo (24hrs)						
Phylum	CN		BHI		LB	
	Counts	%	Counts	%	Counts	%
Firmicutes	16811	99.7271	16155	99.397	15779	97.8421
Bacteroidetes	41	0.2432	96	0.5907	316	1.9594
Proteobacteria	3	0.0178	x	x	10	0.062
Actinobacteria	x	x	x	x	7	0.0434
Parcubacteria_OD1	x	x	x	x	5	0.031
Spirochaetes	x	x	x	x	4	0.0248
Verrucomicrobia	x	x	x	x	3	0.0186
Berkelbacteria	x	x	x	x	2	0.0124
Acidobacteria	x	x	x	x	1	0.0062
Planctomycetes	2	0.0119	2	0.0123	x	x
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes						

En los siguientes cuadros se puede observar los resultados que se obtuvo respecto a cada tiempo. Es decir, se comparará los filos y las familias encontradas en cada muestra dentro del mismo tiempo. Esto con el objetivo de identificar como influencia el medio de cultivo en el desarrollo de microorganismos dentro de cada tiempo de toma de muestra (24, 48, 72, 96, 120 horas). Según el resultado, a las 24 horas de cultivo (tabla 2), se puede observar que el porcentaje de microorganismos en los tres medios pertenecen a *Firmicutes*. El medio CN con un 99.7% de *Firmicutes*, BHI con el 99.3% y LB con el 97.8%. El medio LB presenta una mayor variedad de microorganismos de diferentes filos en comparación a CN y BHI, sin embargo, se encuentran en porcentajes $< 1\%$.

Los microorganismos más abundantes encontrados en los tres medios pertenecen a la familia *Bacillaceae* (Tabla 3). El medio CN con un 95.6%, BHI con el 93% y el medio LB con el 90%. El medio LB presenta la mayor diversidad de microorganismos de distintas familias en comparación a los otros medios, pero se encuentran en porcentajes $< 1\%$.

Tabla 3. Comparación de familias de microorganismos presentes según medio de cultivo (24hrs)

Familia	CN		BHI		LB	
	Counts	%	Counts	%	Counts	%
Bacillaceae	16115	95.5983	15149	93.2074	14532	90.1098
Clostridiaceae	307	1.8212	271	1.6674	613	3.8011
Prevotellaceae	41	0.2432	96	0.5907	315	1.9532
Paenibacillaceae	143	0.8483	111	0.683	187	1.1595
Bacillales_uc	119	0.7059	177	1.089	143	0.8867
Lactobacillaceae	39	0.2314	32	0.1969	128	0.7937
Ruminococcaceae	35	0.2076	27	0.1661	86	0.5333
Selenomonadaceae	8	0.0475	13	0.08	22	0.1364
Defluviitaleaceae	11	0.0653	10	0.0615	20	0.124
Planococcaceae	12	0.0712	328	2.0181	12	0.0744
Lachnospiraceae	x	x	3	0.0185	8	0.0496
Coriobacteriaceae	x	x	x	x	7	0.0434
Bacilli_uc	6	0.0356	10	0.0615	5	0.031
Moraxellaceae	x	x	x	x	5	0.031
Aerococcaceae	1	0.0059	4	0.0246	4	0.0248
Spirochaetaceae	x	x	x	x	4	0.0248
Syntrophaceae	1	0.0059	x	x	4	0.0248
CP011215_f	x	x	x	x	4	0.0248
Clostridiales_uc	2	0.0119	5	0.0308	4	0.0248
Carnobacteriaceae	3	0.0178	6	0.0369	3	0.0186
Listeriaceae	7	0.0415	9	0.0554	3	0.0186
Sporomusaceae	x	x	x	x	3	0.0186
Mogibacterium_f	x	x	x	x	3	0.0186
Pedosphaera_f	x	x	x	x	3	0.0186
Syntrophomonadaceae	x	x	x	x	2	0.0124
CP011213_f	x	x	x	x	2	0.0124
Desulfovibrionaceae	2	0.0119	x	x	1	0.0062
Enterococcaceae	x	x	x	x	1	0.0062
Prolixibacteraceae	x	x	x	x	1	0.0062
AB669257_f	x	x	x	x	1	0.0062
PAC001813_f	x	x	x	x	1	0.0062
Lactobacillales_uc	3	0.0178	x	x	x	x
Planctomycetaceae	2	0.0119	2	0.0123	x	x

”x” indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes

Según el resultado, a las 48 horas de cultivo, se puede observar que el porcentaje de microorganismos en los tres medios pertenecen al filo *Firmicutes* (tabla 4). El medio CN con un 100% de *firmicutes*, BHI con el 99.9% y LB con el 99.9%. En este tiempo de cultivo, el medio que presenta mayor diversidad de microorganismos que pertenecen a diferentes *phylum* es BHI, sin embargo, se encuentran en porcentajes < 1%.

Tabla 4. Comparación de phylum de microorganismos presentes según medio de cultivo (48 hrs)

Phylum	CN		BHI		LB	
	Counts	%	Counts	%	Counts	%
Firmicutes	9396	100	20319	99.941	30337	99.9703
Proteobacteria	x	x	6	0.0295	9	0.0297
Actinobacteria	x	x	2	0.0098	x	x
Bacteroidetes	x	x	2	0.0098	x	x
Chloroflexi	x	x	2	0.0098	x	x

"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes

Los microorganismos más abundantes encontrados en los tres medios pertenecen a la familia *Bacillaceae* (Tabla 5). El medio CN con un 99.4%, BHI con el 98.7% y el medio LB con el 66.8%. En el medio LB, se observa un incremento de microorganismos de la familia de *Bacillales_uc* (22%) en comparación al medio CN (0.48%) y BHI (0.6%).

Tabla 5. Comparación de familias de microorganismos presentes según medio de cultivo (48 hrs)

Familia	CN		BHI		LB	
	Counts	%	Counts	%	Counts	%
Bacillaceae	9335	99.3508	20062	98.6769	20283	66.8391
Bacillales_uc	45	0.4789	118	0.5804	6839	22.5367
Planococcaceae	3	0.0319	77	0.3787	1143	3.7666
Clostridiaceae	4	0.0426	26	0.1279	14	0.0461
Paenibacillaceae	4	0.0426	18	0.0885	2005	6.6071
Bacilli_uc	3	0.0319	4	0.0197	2	0.0066
Methylobacteriaceae	x	x	4	0.0197	x	x
Ruminococcaceae	x	x	4	0.0197	x	x
Selenomonadaceae	x	x	4	0.0197	x	x
Aerococcaceae	2	0.0213	2	0.0098	5	0.0165
Micrococcaceae	x	x	2	0.0098	x	x

prevotellaceae	x	x	2	0.0098	x	x
syntrophomonadaceae	x	x	2	0.0098	x	x
ay921707_f	x	x	2	0.0098	x	x
enterobacterales_uc	x	x	2	0.0098	x	x
carnobacteriaceae	x	x	1	0.0049	2	0.0066
lactobacillales_uc	x	x	1	0.0049	x	x
listeriaceae	x	x	x	x	40	0.1318
moraxellaceae	x	x	x	x	9	0.0297
christensenellaceae	x	x	x	x	1	0.0033
erysipelotrichaceae	x	x	x	x	1	0.0033
lactobacillaceae	x	x	x	x	1	0.0033
clostridiales_uc	x	x	x	x	1	0.0033
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes						

Según el resultado, a las 72 horas de cultivo, se puede observar que el porcentaje de microorganismos en los tres medios pertenecen al filo *Firmicutes* (tabla 6). El medio CN con un 99.7% de *firmicutes*, BHI con el 99.8% y LB con el 99.9%. En este tiempo de cultivo, el medio que presenta mayor diversidad de microorganismos que pertenecen a diferentes *phylum* es BHI, sin embargo, se encuentran en porcentajes < 1%.

Tabla 6. Comparación de phylum de microorganismos presentes según medio de cultivo (72 hrs)

Phylum	CN		BHI		LB	
	Counts	%	Counts	%	Counts	%
Firmicutes	10445	99.7708	8781	99.8181	40765	99.9412
Actinobacteria	5	0.0478	6	0.0682	2	0.0049
Proteobacteria	19	0.1815	6	0.0682	22	0.0539
Fusobacteria	x	x	4	0.0455	x	x

"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes

Los microorganismos más abundantes encontrados en el medio CN y BHI pertenecen a la familia Bacillaceae (CN: 90%, BHI: 86%) (tabla 7), mientras que el medio LB presenta un mayor porcentaje de microorganismos que pertenecen a la familia Bacillales_uc (62.5%), seguida de Bacillaceae (29.1%).

Tabla 7. Comparación de familias de microorganismos presentes según medio de cultivo (72hrs)						
Family	CN		BHI		LB	
	Count	%	Count	%	Count	%
Bacillaceae	9461	90.3716	7606	86.4613	11886	29.1402
Bacillales_uc	894	8.5395	72	0.8185	25498	62.512
Clostridiaceae	21	0.2006	25	0.2842	23	0.0564
Paenibacillaceae	21	0.2006	1037	11.7881	1156	2.8341
Planococcaceae	21	0.2006	29	0.3297	2127	5.2146
Lachnospiraceae	9	0.086	x	x	x	x
Aerococcaceae	5	0.0478	2	0.0227	2	0.0049
Micrococcaceae	5	0.0478	x	x	x	x
Moraxellaceae	5	0.0478	x	x	13	0.0319
Ruminococcaceae	5	0.0478	1	0.0114	3	0.0074
Sporomusaceae	4	0.0382	x	x	x	x
Hydrogenophilaceae	3	0.0287	x	x	x	x
Streptococcaceae	3	0.0287	x	x	x	x
Pleomorphomonas_f	3	0.0287	x	x	x	x
Enterobacterales_uc	3	0.0287	x	x	3	0.0074
Syntrophaceae	2	0.0191	x	x	x	x
Sulfurimonas_f	2	0.0191	x	x	x	x
Caldicoprobacteraceae	1	0.0096	x	x	x	x
Rhodospirillaceae	1	0.0096	x	x	x	x
Propionibacteriaceae	x	x	6	0.0682	x	x
Enterobacteriaceae	x	x	4	0.0455	x	x
Fusobacteriaceae	x	x	4	0.0455	x	x
Bacilli_uc	x	x	2	0.0227	3	0.0074
Listeriaceae	x	x	2	0.0227	62	0.152
Pseudomonadaceae	x	x	2	0.0227	1	0.0025
Lactobacillales_uc	x	x	2	0.0227		
Carnobacteriaceae	x	x	1	0.0114	1	0.0025
Lactobacillaceae	x	x	1	0.0114	1	0.0025
Selenomonadaceae	x	x	1	0.0114	x	x
Alphaproteobacteria_uc	x	x	x	x	5	0.0123
Corynebacteriaceae	x	x	x	x	2	0.0049
Staphylococcaceae	x	x	x	x	2	0.0049
Erysipelotrichaceae	x	x	x	x	1	0.0025
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes						

Según el resultado, a las 96 horas de cultivo, se puede observar que el porcentaje de microorganismos en los tres medios pertenecen al filo *Firmicutes*(Tabla 8). El medio CN con un 99.9% de *firmicutes*, BHI con el 99.7% y LB con el 99.9%. En este tiempo de cultivo, el medio que presenta mayor diversidad de microorganismos que pertenecen a diferentes

phylum es BHI, sin embargo, se encuentran en porcentajes < 1%.

Tabla 8. Comparación de phylum de microorganismos presentes según medio de cultivo (96 hrs)

Phylum	CN		BHI		LB	
	Count	%	Count	%	Count	%
Firmicutes	15528	99.9936	8919	99.7428	32846	99.9239
Proteobacteria	1	0.0064	16	0.1789	24	0.073
Bacteroidetes	x	x	1	0.0112	1	0.003
Actinobacteria	x	x	6	0.0671	x	x
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes						

Los microorganismos más abundantes encontrados en los tres medios pertenecen a la familia *Bacillaceae* (tabla 9). El medio CN con un 99.1%, BHI con el 79.3% y el medio LB con el 57.7%. En el medio LB, se observa un 29.9% de *Bacillales_uc*, seguido de *Planococcaceae* (7.6%).

Tabla 9. Comparación de familias de microorganismos presentes según medio de cultivo (96 hrs)

Family	CN		BHI		LB	
	Count	%	Count	%	Count	%
Bacillaceae	15394	99.1307	7096	79.3558	18959	57.677
Bacillales_uc	118	0.7599	102	1.1407	9831	29.9078
Planococcaceae	5	0.0322	19	0.2125	2494	7.5872
Paenibacillaceae	5	0.0322	1671	18.6871	1206	3.6689
Clostridiaceae	1	0.0064	19	0.2125	269	0.8184
Peptostreptococcaceae	x	x	x	x	54	0.1643
Moraxellaceae	1	0.0064	10	0.1118	13	0.0395
Bacilli_uc	x	x	1	0.0112	6	0.0183
Listeriaceae	1	0.0064	2	0.0224	6	0.0183
Firmicutes_uc	x	x	x	x	4	0.0122
Aerococcaceae	x	x	5	0.0559	4	0.0122
Comamonadaceae	x	x	x	x	4	0.0122
Caulobacteraceae	x	x	x	x	3	0.0091
Peptoniphilaceae	x	x	x	x	3	0.0091
Christensenellaceae	x	x	x	x	2	0.0061
Lactobacillaceae	x	x	3	0.0335	2	0.0061
Leuconostocaceae	x	x	x	x	2	0.0061
Xanthomonadaceae	x	x	x	x	2	0.0061
Clostridiales_uc	x	x	x	x	2	0.0061
Carnobacteriaceae	2	0.0129	x	x	1	0.003
Prevotellaceae	x	x	1	0.0112	1	0.003
Pseudomonadaceae	x	x	x	x	1	0.003
Natronincola_f	x	x	x	x	1	0.003
Enterobacterales_uc	x	x	x	x	1	0.003
Propionibacteriaceae	x	x	5	0.0559	x	x
Hydrogenophilaceae	x	x	4	0.0447	x	x
Pseudoalteromonadaceae	x	x	2	0.0224	x	x
Actinomycetaceae	x	x	1	0.0112	x	x
Enterococcaceae	x	x	1	0.0112	x	x
Lactobacillales_uc	1	0.0064	x	x	x	x

”x” indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes

Según el resultado, a las 120 horas de cultivo, se puede observar que el porcentaje de microorganismos en los tres medios pertenecen al filo *Firmicutes*(tabla 10). El medio CN con un 100% de *firmicutes*, BHI con el 99.3% y LB con el 99.9%. En este tiempo de cultivo, el medio que presenta mayor diversidad de microorganismos que pertenecen a diferentes *phylum* es LB, sin embargo, se encuentran en porcentajes < 1%.

Tabla 10. Comparación de phylum de microorganismos presentes según medio de cultivo (120 hrs)

Phylum	CN		BHI		LB	
	Count	%	Count	%	Count	%
Firmicutes	11548	100	11015	99.3237	18435	99.8538
Proteobacteria	x	x	75	0.6763	16	0.0867
Bacteroidetes	x	x	x	x	1	0.0054
Actinobacteria	x	x	x	x	10	0.0542
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes						

Los microorganismos más abundantes encontrados en los tres medios pertenecen a la familia *Bacillaceae*. El medio CN con un 99.2%, BHI con el 86.1% y el medio LB con el 63.6%. En el medio LB, se observa un 20.6% de *Planococcaceae*, seguido de *Bacillales_uc* (10.5%).

Tabla 10. Comparación de familias de microorganismos presentes según medio de cultivo (120 hrs)						
Familia	CN		BHI		LB	
	Count	%	Count	%	Count	%
Bacillaceae	11465	99.2813	9546	86.0775	11747	63.628
Planococcaceae	5	0.0433	47	0.4238	3810	20.637
Bacillales_uc	61	0.5282	111	1.0009	1934	10.4756
Paenibacillaceae	3	0.026	1228	11.073	768	4.1599
Clostridiaceae	7	0.0606	42	0.3787	157	0.8504
Moraxellaceae	x	x	65	0.5861	8	0.0433
Bacilli_uc	1	0.0087	1	0.009	6	0.0325
Enterobacterales_uc	x	x	4	0.0361	6	0.0325
Listeriaceae	x	x	5	0.0451	4	0.0217
Syntrophomonadaceae	x	x	x	x	4	0.0217
Intrasporangiaceae	x	x	x	x	3	0.0162
Mycobacteriaceae	x	x	x	x	3	0.0162
Aerococcaceae	3	0.026	1	0.009	2	0.0108
Corynebacteriaceae	x	x	x	x	2	0.0108
Propionibacteriaceae	x	x	x	x	2	0.0108
Pseudomonadaceae	x	x	x	x	2	0.0108
Erysipelotrichaceae	x	x	x	x	1	0.0054
Lactobacillaceae	1	0.0087	4	0.0361	1	0.0054
Prevotellaceae	x	x	x	x	1	0.0054
Lactobacillales_uc	x	x	x	x	1	0.0054
Lachnospiraceae	x	x	25	0.2254	x	x
Methylobacteriaceae	x	x	5	0.0451	x	x
Clostridiales_uc	x	x	3	0.0271	x	x
Enterococcaceae	x	x	1	0.009	x	x
Hydrogenophilaceae	x	x	1	0.009	x	x
Thermoanaerobacterium_f	x	x	1	0.009	x	x
Firmicutes_uc	1	0.0087	x	x	x	x
Christensenellaceae	1	0.0087	x	x	x	x
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes						

Se observa que, en los 5 tiempos de cultivo, los medios CN, BHI y LB presentan un mayor porcentaje de microorganismos pertenecientes al *phylum firmicutes*. La presencia de *phylums* diferentes en estos medios, no alcanzan el 1%. Así mismo, la variedad de familias encontradas en los diferentes tiempos de cultivo, no difieren considerablemente entre cada uno de los medios. Los medios CN, BHI y LB presentan en su mayoría microorganismo pertenecientes a la familia *Bacillaceae*. Sin embargo, en el medio LB se observa una mayor variación entre las familias *Bacillaceae*, *Planococcaceae* y *Bacillales_uc*.

a. Resultados obtenidos del mismo medio de cultivo en diferentes tiempos

En los siguientes cuadros se puede observar los resultados que se obtuvo respecto a cada muestra. Es decir, se comparará las familias encontradas en las muestras del mismo medio de cultivo y como cambia la composición microbiana conforme aumenta el tiempo.

LURIA BERTANI (LB)

Tabla 11. Comparación de familias por tiempo de las muestras en medio de Luria Bertani (LB)										
Familia	24h		48h		72h		96h		120h	
	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
Bacillaceae	14532	90.11	20283	66.84	11886	29.14	18959	57.7	11747	63.6
Clostridiaceae	613	3.80	14	0.05	23	0.06	269	0.8	157	0.9
Prevotellaceae	315	1.95	x	x	x	x	1	0.0	x	x
Paenibacillaceae	187	1.16	2005	6.61	1156	2.83	1206	3.7	768	4.16
Bacillales_uc	143	0.89	6839	22.54	25498	62.51	9831	29.9	1934	10.48
Lactobacillaceae	128	0.79	1	0.00	1	0.00	2	0.0	1	0.01
Ruminococcaceae	86	0.53	x	x	3	0.01	x	x	x	x
Selenomonadaceae	22	0.14	x	x	x	x	x	x	x	x
Defluviitaleaceae	20	0.12	x	x	x	x	x	x	x	x
Planococcaceae	12	0.07	1143	3.77	2127	5.21	2494	7.59	3810	20.64
Lachnospiraceae	8	0.05	x	x	x	x	x	x	x	x
Coriobacteriaceae	7	0.04	x	x	x	x	x	x	x	x
Bacilli_uc	5	0.03	2	0.01	3	0.01	6	0.02	6	0.03
Moraxellaceae	5	0.03	9	0.03	13	0.03	13	0.04	8	0.04
Aerococcaceae	4	0.02	5	0.02	2	0.00	4	0.01	2	0.01
Spirochaetaceae	4	0.02	x	x	x	x	x	x	x	x
Syntrophaceae	4	0.02	x	x	x	x	x	x	x	x
CP011215_f	4	0.02	x	x	x	x	x	x	x	x
Clostridiales_uc	4	0.02	1	0.003	x	x	2	0.006	x	x
Carnobacteriaceae	3	0.02	2	0.01	1	0.00	1	0.003	x	x
Listeriaceae	3	0.02	40	0.13	62	0.15	6	0.018	4	0.02
Sporomusaceae	3	0.02	x	x	x	x	x	x	x	x
Mogibacterium_f	3	0.02	x	x	x	x	x	x	x	x
Pedosphaera_f	3	0.02	x	x	x	x	x	x	x	x
Syntrophomonadaceae	2	0.01	x	x	x	x	x	x	4	0.022
CP011213_f	2	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
Desulfovibrionaceae	1	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
Enterococcaceae	1	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x

Prolixibacteraceae	1	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
AB669257_f	1	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
PAC001813_f	1	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
Christensenellaceae	x	x	1	0.003	x	x	2	0.0061	x	x
Erysipelotrichaceae	x	x	1	0.003	1	0.00	x	x	1	0.01
Alphaproteobacteria_uc	x	x	x	x	5	0.01	x	x	x	x
Enterobacterales_uc	x	x	x	x	3	0.01	1	0.003	6	0.03
Corynebacteriaceae	x	x	x	x	2	0.00	x	x	2	0.01
Staphylococcaceae	x	x	x	x	2	0.00	x	x	x	x
Pseudomonadaceae	x	x	x	x	1	0.00	1	0.0	2	0.01
Peptostreptococcaceae	x	x	x	x	x	x	54	0.2	x	x
Firmicutes_uc	x	x	x	x	x	x	4	0.01	x	x
Comamonadaceae	x	x	x	x	x	x	4	0.01	x	x
Caulobacteraceae	x	x	x	x	x	x	3	0.01	x	x
Peptoniphilaceae	x	x	x	x	x	x	3	0.01	x	x
Leuconostocaceae	x	x	x	x	x	x	2	0.01	x	x
xanthomonadaceae	x	x	x	x	x	x	2	0.01	x	x
Natronincola_f	x	x	x	x	x	x	1	0.00	x	x
Intrasporangiaceae	x	x	x	x	x	x	x	x	3	0.02
Mycobacteriaceae	x	x	x	x	x	x	x	x	3	0.02
Propionibacteriaceae	x	x	x	x	x	x	x	x	2	0.01
Prevotellaceae	x	x	x	x	x	x	x	x	1	0.01
Lactobacillales_uc	x	x	x	x	x	x	x	x	1	0.01
"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes										

En la tabla 11 se encuentra la comparación de las muestras incubadas en LB según tiempo. Se puede observar que la familia de *Bacillaceae* es la más abundante en todos los tiempos con excepción al tiempo correspondiente de 72 hrs, en donde la mayoría de microorganismos son de la familia de *Bacillales_uc* (62.5%). Podemos observar que la mayor diversidad de microorganismos en términos de familias, es la que correspondiente al primer tiempo (24 hrs), seguido de la muestra a las 96 hrs de incubación. Algunas de las familias que permanecen en todos los tiempos son la *Paenibacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Planococcaceae*, *Bacilli_uc*, *Moraxellaceae*, *Aerococcaceae*.

Tabla 12. Comparación de familias por tiempo de las muestras en medio de Caldo Nutritivo (CN)										
Familia	24h		48h		72h		96h		120h	
	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%

Bacillaceae	16115	95.60	9335	99.35	9461	90.37	15394	99.13	11465	99.28
Clostridiaceae	307	1.82	4	0.04	21	0.20	1	0.01	7	0.06
Paenibacillaceae	143	0.85	4	0.04	21	0.20	5	0.03	3	0.03
Bacillales_uc	119	0.71	45	0.48	894	8.54	118	0.76	61	0.53
Prevotellaceae	41	0.24	3	0.0	x	x	x	x	x	x
Lactobacillaceae	39	0.23	x	x	x	x	x	x	1	0.01
Ruminococcaceae	35	0.21	x	x	5	0.05	x	x	x	x
Planococcaceae	12	0.07	3	0.03	21	0.20	5	0.03	5	0.04
Defluviitaleaceae	11	0.07	x	x	x	x	x	x	x	x
Selenomonadaceae	8	0.05	x	x	x	x	x	x	x	x
Listeriaceae	7	0.04	x	x	x	x	1	0.01	x	x
Bacilli_uc	6	0.04	x	x	x	x	x	x	1	0.0087
Carnobacteriaceae	3	0.02	x	x	x	x	2	0.01	x	x
Lactobacillales_uc	3	0.02	x	x	x	x	1	0.01	x	x
Desulfovibrionaceae	2	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
Planctomycetaceae	2	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
Clostridiales_uc	2	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
Aerococcaceae	1	0.01	2	0.0213	5	0.05	x	x	3	0.03
Syntrophaceae	1	0.01	x	x	2	0.02	x	x	x	x
Lachnospiraceae	x	x	x	x	9	0.09	x	x	x	x
Micrococcaceae	x	x	x	x	5	0.05	x	x	x	x
Moraxellaceae	x	x	x	x	5	0.05	1	0.01	x	x
Sporomusaceae	x	x	x	x	4	0.04	x	x	x	x
Hydrogenophilaceae	x	x	x	x	3	0.03	x	x	x	x
Streptococcaceae	x	x	x	x	3	0.03	x	x	x	x
Pleomorphomonas_f	x	x	x	x	3	0.03	x	x	x	x
Enterobacterales_uc	x	x	x	x	3	0.03	x	x	x	x
Sulfurimonas_f	x	x	x	x	2	0.02	x	x	x	x
Caldicoprobacteraceae	x	x	x	x	1	0.01	x	x	x	x
Rhodospirillaceae	x	x	x	x	1	0.01	x	x	x	x
Enterococcaceae	x	x	x	x	x	x	1	0.01	x	x
Firmicutes_uc	x	x	x	x	x	x	x	x	1	0.01
Christensenellaceae	x	x	x	x	x	x	x	x	1	0.01

"x" indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes

En la tabla 12, se observa que la familia de *Bacillaceae* es la más abundante en los 5 tiempos de las muestras en el medio de cultivo CN. Esta familia representa un 90-99% de los microorganismos de este medio de cultivo. Asimismo, la familia de los *Bacillales_uc* se encuentra en todos los medios y se posiciona en segundo lugar con respecto a abundancia de microorganismos. Tanto el primer tiempo (24 h) como el tercer tiempo 72 horas tienen

igual número de familias encontradas, es decir fueron las muestras con mayor variedad taxonómica, siendo la muestra de 48 h la de menor variedad. Entre otra de las familias que se han podido encontrar en todas las muestras son la de *Clostridiaceae*, *Paenibacillaceae*, y *Planococcaceae*.

Tabla 13. Comparación de familias por tiempo de las muestras en medio de Brain-Heart Infusion (BHI)

Familia	24h		48h		72h		96h		120h	
	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
Bacillaceae	15149	93.21	20062	98.68	7606	86.46	7096	79.36	9546	86.08
Planococcaceae	328	2.02	77	0.38	29	0.33	19	0.21	47	0.42
Clostridiaceae	271	1.67	26	0.13	25	0.28	19	0.21	42	0.38
Bacillales_uc	177	1.09	118	0.58	72	0.82	102	1.14	111	1.00
Paenibacillaceae	111	0.68	18	0.09	1037	11.79	1671	18.69	1228	11.07
Prevotellaceae	96	0.59	2	0.01	x	x	1	0.01	x	x
Lactobacillaceae	32	0.20	x	x	1	0.01	3	0.03	4	0.04
Ruminococcaceae	27	0.17	4	0.02	1	0.01	x	x	x	x
Selenomonadaceae	13	0.08	4	0.02	1	0.01	x	x	x	x
Bacilli_uc	10	0.06	4	0.02	2	0.02	1	0.01	1	0.01
Defluviitaleaceae	10	0.06	x	x	x	x	x	x	x	x
Listeriaceae	9	0.06	x	x	2	0.02	2	0.02	5	0.05
Carnobacteriaceae	6	0.04	1	0.00	1	0.01	x	x	x	x
Clostridiales_uc	5	0.03	x	x	x	x	x	x	3	0.03
Aerococcaceae	4	0.02	2	0.01	2	0.02	5	0.06	1	0.01
Lachnospiraceae	3	0.02	x	x	x	x	x	x	25	0.23
Planctomycetaceae	2	0.01	x	x	x	x	x	x	x	x
Methylobacteriaceae	x	x	4	0.02	x	x	x	x	5	0.05
Micrococcaceae	x	x	2	0.01	x	x	x	x	x	x
Syntrophomonadaceae	x	x	2	0.01	x	x	x	x	x	x
Lactobacillales_uc	x	x	1	0.00	2	0.02	x	x	x	x
Propionibacteriaceae	x	x	x	x	6	0.07	5	0.06	x	x
Enterobacteriaceae	x	x	x	x	4	0.05	x	x	x	x
Fusobacteriaceae	x	x	x	x	4	0.05	x	x	x	x
Pseudomonadaceae	x	x	x	x	2	0.02	x	x	x	x
Moraxellaceae	x	x	x	x	x	x	10	0.11	65	0.59
Hydrogenophilaceae	x	x	x	x	x	x	4	0.04	1	0.01
Pseudoalteromonadaceae	x	x	x	x	x	x	2	0.02	x	x
Actinomycetaceae	x	x	x	x	x	x	1	0.01	x	x
Enterobacterales_uc	x	x	2	0.0098	x	x	x	x	4	0.04
Thermoanaerobacterium_f	x	x	x	x	x	x	x	x	1	0.01
AY921707_f	x	x	2	0.0098	x	x	x	x	x	x
Enterococcaceae	x	x	x	x	x	x	1	0.01	x	x

”x” indica los valores inferiores al número de lecturas mínimas o inexistentes

La tabla 13 nos muestra que los *Bacillaceae* es la familia más abundante en todas las muestras de este medio de cultivo, al igual que los medios anteriores, sin embargo, se reconoce que la presencia de esta familia varía mucho en cada tiempo, ya que existe una disminución y un aumento a lo largo de los cinco días de incubación. La familia de los *Planococcaceae*, fueron la segunda familia más abundante de la muestra correspondiente al primer día, sin embargo, se reconoció que al paso del tiempo los microorganismos de esta familia iban disminuyendo en número. Algunas de las familias que se encontraron a lo largo del tiempo de incubación fueron los *Planococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Bacillales_uc*.

Con estas tablas, se puede concluir que se repite el patrón del grupo en mayor abundancia tanto para phylum (*Firmicutes*) como para familia (*Bacillaceae*) en los tres medios de cultivo en los tiempos. Asimismo, se reconoce que hay microorganismos que se desarrollan solo en un tiempo determinado a pesar de pertenecer al mismo medio de cultivo.