



## SHORT COMMUNICATION

### Aislamiento de péptidos inhibidores de bacterias a partir de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo del lechón e identificación mediante prueba proteómica

Isolation of bacterial inhibitory peptides from lactic acid bacteria of the piglet digestive tract and identification by proteomic test

Héctor Sánchez Suárez<sup>1,\*</sup>; Gloria Ochoa Mogollón<sup>1</sup>; Carmen Rojas Mogollón<sup>1</sup>; Tessy Peralta Ortiz<sup>2</sup>; Alberto Ordinola Zapata<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento Académico de Sanidad Vegetal y Producción Pecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Tumbes, Peru.

<sup>2</sup> Departamento de Biología y Biotecnología, Facultad de Ingeniería Pesquera, Universidad Nacional de Tumbes, Peru.

Received March 29, 2017. Accepted November 26, 2017.

#### Resumen

En la alimentación porcina se usan antibióticos los cuales son un riesgo latente para la salud animal y pública. Los microorganismos son adquiridos del entorno durante las diferentes etapas de su vida, algunas bacterias que colonizan y logran ser parte de la flora natural digestiva ejercen acción antibiótica (sustancias extracelulares llamadas bacteriocinas), las cuales se obtuvieron de sustancias extracelulares de ocho bacterias ácido lácticas (BAL) nativas aisladas de dos lechones (*Sus scrofa domesticus*); las BAL se identificaron mediante pruebas bioquímicas y pruebas de antagonismo frente a *Escherichia fergusonii* y *Shigella sannei*. La identificación molecular de las bacterias y la sustancia proteica se realizó mediante proteómica, por el método Q proteome™ (método de extracción de la proteína directamente del cultivo de bacterias) donde inicialmente se realizó la digestión bacteriana con el Kit, los productos se sometieron a migraciones, en el gel de policrilamida, seleccionando aquellas de 5 a 2500 KD cortados del gel y una segunda digestión con método convencional con tripsina. Los productos fueron analizados mediante espectrometría de masas en Maldi TOF TOF, obteniendo fragmentos de péptidos que fueron comparados molecularmente a organismo pertenecientes al género Bacillus y luego con Lactobacillus, donde se encontró dos péptidos, llamado ornithine monooxygenase (*Bacillus firmus*) y RNase J family beta-CASP ribonuclease (*Lactobacillus saerimneri*) péptidos que tienen efecto inhibidor de bacterias, antimicrobiano que pueden ser bacteriocinas.

**Palabras clave:** bacteriocina; proteómica; antagonismos; BAL; bacterias nativas.

#### Abstract

In pig feed antibiotics are used which are a latent risk to animal and public health. Microorganisms are acquired from the environment during different stages of life, some bacteria that colonize and become part of the natural digestive flora and exert antibiotic action (extracellular substances called bacteriocins), Extracellular substances of eight lactic acid bacteria native to the digestive tract (*Sus scrofa domesticus*) were isolated from two post weaned piglets; BALs were identified by biochemical tests and tests of antagonism against *Echerichia fergusonii* and *Shigella sannei*. The molecular identification of the bacteria and the protein substance was performed proteomically mediated by the Q proteome™ method (method of extraction of the protein directly from the culture of bacteria) where the bacterial digestion was initially performed with the Kit, the products were subjected to Migrations in the polyacrylamide gel, selecting those of 5 and 2500 KD cut from the gel and a second digestion with conventional trypsin method. The products were analyzed by mass spectrometry in Maldi TOF TOF, obtaining fragments of peptides that were molecularly compared to organisms belonging to Bacillus and later with genus Lactobacilli, where two peptides named ornithine monooxygenase (*Bacillus firmus*) and RNase J family Beta-CASP ribonuclease (*Lactobacillus saerimneri*) peptides that have antimicrobial, inhibitory effect of bacteria that can be bacteriocins.

**Keywords:** Bacteriocin; proteomics; antagonisms; BAL; native bacteria.

#### 1. Introducción

Los antibióticos son usados en pequeñas cantidades como promotores de creci-

miento en la alimentación de cerdos los cuales a largo plazo producen contaminación y resistencia a los mismos

\* Corresponding author

E-mail: [hsanchezs@untumbes.edu.pe](mailto:hsanchezs@untumbes.edu.pe) (H. Sánchez).

© 2017 All rights reserved.

DOI: 10.17268/sci.agropecu.2017.04.15

(Bhandari *et al.*, 2010), en un mundo en el que la resistencia a los antimicrobianos constituye un problema global de gran relevancia para la salud pública (Del Coco, 2015).

Existen microorganismos que producen sustancias potenciales para mejorar el desempeño y la salud de cerdos, esto es debido al efecto bactericida que mejora la eficiencia del aparato digestivo e incluso que pueden ser utilizados como probióticos (García *et al.*, 2012) donde la mayoría de ellas son bacterias ácido láctico BAL, principalmente del género *Lactobacillus*, que generan productos extracelulares que pueden sustituir a los antibióticos (Cueto-Vigil *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012) y pueden controlar bacterias patógenas gracias a la producción de sustancias como el ácido láctico y compuestos proteicos, conocidos como bacteriocinas (Zohra, 2016; Geng, 2016; Cechova, 2016; Xue-Yuan, 2015). Bajo este contexto, con el fin de solucionar la problemática formulada, se planteó como objetivo identificar molecularmente, sustancias proteicas de acción inhibidor de bacterias y antimicrobiana (bacteriocinas) producidas por bacterias ácido lácticas del tracto digestivo del lechón.

## 2. Materiales y métodos

### Colecta de muestras de mucosa intestinal de lechones

El presente trabajo se realizó en la ciudad de Tumbes-Perú, donde se seleccionaron dos lechones de traspatio de siete días pos destete para realizar el aislamiento de las bacterias nativas, la primero toma se realizó en los Cedros, Distrito de San Pedro de Los Incas (Corrales) geográficamente ubicada a 3°36'58.24" S 80°31'49.75" O y la otra en el cercado de Tumbes, Tumbes - Perú ubicada 3°35'12.96" S 80°26'45.15" O, los lechones fueron alimentados con dieta comercial a base de maíz, soya y polvillo, sin antibiótico. Los aislamientos así como los análisis microbiológicos y genéticos se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología y

Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Tumbes; la toma de muestras se realizó según el método de laparotomía abierta (Sánchez, 2016), para eso se colectaron muestras de la mucosa intestinal con la ayuda de hisopos estériles, obteniendo 35 muestras de lechón I. (doce del estómago, dos del duodeno, cinco del yeyuno, cuatro del íleon, seis del ciego y seis del colon) y del lechón II se obtuvieron 39 muestras. (seis del estómago, cuatro del duodeno, siete del yeyuno, seis del íleon, tres del ciego y diez del colon).

Las muestras de mucosa fueron colocadas en tubos Falcón de 50 ml conteniendo caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y ajustadas a un pH de 5-6, estas fueron transportadas a temperatura ambiente hasta el Laboratorio de Biología Molecular. Las muestras fueron sembradas en agar MRS suplementada con azul de anilina (1,2%) y colonias que crecieron en éste fueron identificadas inicialmente como BAL de acuerdo a su morfología.

**Caracterización microbiológica.** Se realizó la caracterización fenotípica de las BAL aisladas siguiendo el método de Yimin *et al.* (1998), evaluándose si se mostraban Gram positivas, con producción de esporas, y negativas a las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa, se probó también como pruebas de viabilidad, su resistencia a condiciones adversas, cultivándolas en concentraciones de sales biliares de 1%, 5% y 10%, de cloruro de sodio de 5%, 10% y 18% y pH de 2,5; 3,5 y 4,5. Se obtuvieron del primer lechón, 2 cepas (estómago) y en el segundo lechón, 2 cepas (estómago), 4 (yeyuno) y 1 (íleon) con capacidad inhibitoria contra patógenos del lechón, utilizando pruebas de antagonismo por método difusión en (Vélez, 2014; Ramírez, 2009). Estas cepas fueron refrigeradas a 4 °C en tubos con agar MRS inclinado y congeladas a -20 °C en caldo MRS suplementado con 30% de glicerol. Luego se realizaron pruebas de antagonismo utilizando cepas patógenas, aisladas en medio específico (eosina azul de metileno) para *Escherichia* y para

*Salmonella*, *Shigella* (agar *Salmonella*, *Shigella*). Para la selección de bacterias con propiedades inhibitorias, se utilizó el método de inhibición *in vitro* (Vélez, 2014; Ramírez, 2009), colocándose discos sobre placas con medios de cultivo conteniendo las bacterias patógenas directamente discos de agar MRS (6 mm de diámetro) impregnado con la bacteria ácido láctica (BAL). La producción de halos de inhibición (zonas claras alrededor del disco), demostraron la actividad antibacteriana de las cepas aisladas, y finalmente se realizó la prueba de antagonismo utilizando el método de difusión en pocillo (Vélez, 2014).

#### Identificación molecular mediante secuenciación del gen 16S ARNr

Para la extracción de ADN de bacterias BAL se utilizó el método estándar CTAB-DTAB (Gustincich *et al.*, 1991), adaptado para células bacterianas (Dulanto, 2013) las que fueron sembradas en tubos de vidrio con 10 ml de caldo tripticosa soya (TSB) e incubadas a 28-30 °C por 24 h.

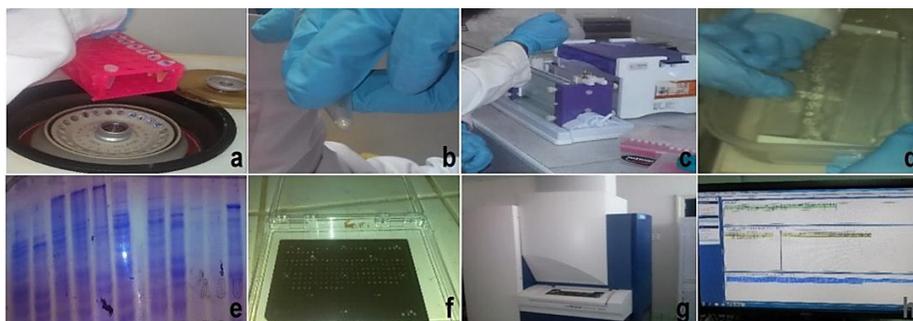
**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Para amplificar un fragmento de la región 16S ARNr, se utilizaron los cebadores universales 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1510R (5' GGC TAC CTT GTT ACG A 3') descritos por Weisburg para estudios filogenéticos bacterianos (Luque *et al.*, 2006).

**Migración del ADN.** Se utilizó 10 µl de cada producto de amplificación, en gel de agarosa al 1% con tampón de migración TAE 1X. Las muestras fueron empacadas

y enviadas a la empresa Macrogen de Corea, para realizar la secuenciación de las dos cadenas de cada producto amplificado. Con las secuencias obtenidas se preparó un árbol filogenético de las cepas bacterianas identificadas con aquellas y publicadas en la base de datos GenBank (NCBI).

#### Extracción de la proteína – péptidos de la BAL seleccionada.

Se extrajo proteínas directamente del cultivo de bacterias. Haciendo uso del kit del método Q proteome™ Bacterial Protein Preparation Handbook For preparation of soluble proteins from bacterial cell cultures, por este método se centrifugó la solución bacteriana a 1000 rpm por 10 min, se incubó el pellet a -20 °C por 15 min, se agregó 10 µl de buffer (buffer de lisis: lisozimas 10 µl, buffer nativo 1 ml); se agitó con vortex por 30 s, se sonificó durante 2 min e incubó sobre hielo por 30 min, luego se centrifugó a 14000 rpm por 20 min, se recuperó el sobrenadante 45 µl aproximadamente, donde se tomó 20 µl de lo recuperado en un microtubo, se adicionó el mismo volumen de buffer de carga (20 µl) e incubó a 95 °C por 5 min; posteriormente se cargó el gel de poliacriloamida SDS PAGE para la migración a 90 voltios por 2 a 3 h; se recuperó el gel para la rehidratación con agua bidestilada (5 a 30 min), se agregó la solución de fijación por 30 a 40 min, se agregó la solución de tinción, de 3 a 12 h para finalmente agregar la solución de lavado, hasta observar el gel. Se adicionó agua destilada para cortes y recuperación de las bandas de interés.



**Figura 1.** Extracción de péptidos bacterianos, (a) centrifugación (b) extracción directa con Kit, (c) migración en gel poliacrilamida (d) recuperación y digestión del gel (e), tinción de bandas en gel (f) matriz de ploteo de Maldi (g) equipo Maldi (h) lectura en Maldi TOF TOF espectrometro de masas.

### Digestión de las bandas del gel recuperado (pesos moleculares aproximados entre 5 a 25 kD)

Soluciones para el protocolo. Buffer de Reducción: 100mM de DTT, Buffer de Alquilación: 100mM de Iodoacetamide, Buffer de Digestión: 50mM de bicarbonato de Amonio en agua (pH 8.0), Concentración de Tripsina: 0.1 µg/ µl.

Protocolo a seguir: Adicionar 15 µl de buffer de digestión en un tubo de 0.2 ml. Adicionar 1.5 µl de buffer de reducción. Adicionar 10µl de muestra. Adicionar 5 µl de agua grado HPLC para completar un volumen de 27 µl final. Luego incubar a 95 °C durante 5 minutos. Dejar enfriar y forrar los tubos con papel aluminio para el proceso de alquilación. Adicionar 3 µl de buffer de alquilación. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, preferible en oscuridad. Luego adicionar 2 µl de tripsina a cada muestra. Incubar a 37 °C durante toda la noche. Para detener la acción de la tripsina se adiciona 5 µl de 20% de TFA (Figura 1).

Las muestras de proteínas digeridas fueron mezcladas con 1 µl de matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico (CHCA) (10 mg/ml) en 0,1 % de ácido trifluoroacético y 50 % de acetonitrilo (ACN) y depositadas en una placa MALDI. La placa fue colocada en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF ABI SCIEX TOF/TOF TM 5800 SYSTEM (AB Sciex, Estados Unidos).

Se obtuvo espectros de masa y de ellos se seleccionaron iones precursores para la fragmentación y obtención de secuencias de aminoácidos. Las secuencias obtenidas fueron procesadas con el software Protein Pilot (AB Sciex, Estados Unidos), utilizando bases de datos de proteínas de Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Dichas secuencias fueron analizadas con la base de datos de proteínas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y Mega 6.

### 3. Resultados y discusión

#### Identificación molecular de las proteínas BAL

En busca de alternativas que reemplacen el uso de los antibióticos como aditivos en la alimentación de lechones, se estudió bacterias y sus exudados con este efecto, los cuales también están en los objetivos del trabajo, esta alternativa es cada vez más cercana, específica y efectiva, y considerados viables por investigadores como Del Coco (2015), Bhandari *et al.* (2010) y Macouzet (2010).

Inicialmente se identificaron molecularmente bacterias con secuencias conservadas del gen 16S ARNr encontrando semejanzas genéticas entre ellos para *Bacillus fermentus* y *Lactococcus lactis*. Se logró identificar péptidos de cepas digeridas de la microbiota gastrointestinal en lechón pos destetado, mediante prueba de espectrometría de masas utilizando el MALDI TOF/TOF y comparadas con la base datos Uniprot y NCBI, programa de bioinformática MEGA 6 y Blast; para las cepas relacionadas con *Lactobacillus fermentus* llamadas BAL 2, 4, 6, 9 y 1, se encontró una proteína denominada ornithine monooxygenase común en este tipo de organismos proveniente con mayor identidad al *Bacillus firmus*, con una identidad de 100% y cobertura de 100% de la secuencia proteica:

```
>WP_048009930.1 ornithine monooxygenase [Bacillus firmus]
MIYEMTVQFRVLDMKEGLLWYETLLNKKPDLIPHE
GFAEWELITGCWLQIAEGSPSIGSGPIRLGVPDLEQER
ERLITELKITPFEIHRKEVPVKWATFADPWGNRIGY
FEYIDMHEKEIQIKKVNKEDWGR
```

Este péptido es común en bacterias con propiedades probióticas, como lo señalan autores que han utilizado *Bacillus firmus* y *Lactobacillus saerimneri* como probióticos (García *et al.*, 2012; NCBI, 2015) (Tabla 1 y Figura 2).

Para las cepas denominadas BAL 10, 14, 7 y 8 de las cepas relacionadas con *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis* se encontró un péptido que tiene dominio Nase J family beta-CASP ribonuclease (Tabla 1). Se halló que esta secuencia tuvo 100% de identidad y 100%

de cobertura con aquella proveniente de *Lactobacillus saerimneri* cuya secuencia proteica es:

```
>WP_009551846.1 RNase J family beta-CASP
ribonuclease [Lactobacillus saerimneri]
MKKLVKNNETA VFAVGLGEIGKNTYGVQFQDEII
LIDAGIKFPEDDLLGIDYVIPDYQYLVANRDKIKALVI
THGHEDHIGGIPYLLQQVNVPIYAGPLALALIKSKLE
EHGLLRSTKLHEIDEDTVLKFRKTSVSFFRTTHSIPDT
LGVAVKTPSGTIVETGDFKFDLTPITHQAPNFQKMA
RLGEEGVLCLLSDSTNAEVPNFTKSEQWVGKSIHRIF
EKVDGRIIFATFASNISR VQQA VSAALGKGRKIAVFG
RSMEAAIENGRRLGYLDIPDKALISAKELNSLPANKV
MILCTGSQGEPMAALSRIANGTHRQVSIHPGDTVVFS
SLPIPGNTLSV NKVINELEEAGANVIHGRINNIHASGH
GGQEEQRLMLRLIKPKYFMPHIGEYRMLKIHTELAE
QCGVPEENSFILKNGDVLALTKDSARYAGHFNADD
VYVDGSGVGDIGNIVLKDRRILSEEGLVVVVATIDM
KRRRILAGPDLLSRGFIYMRESGELINQARKQLFRSIT
RSLKGDVTEAKIRENIADLQSFLFDQTERHPMILP
MLITV
```

*Lactobacillus saerimneri* es productor de

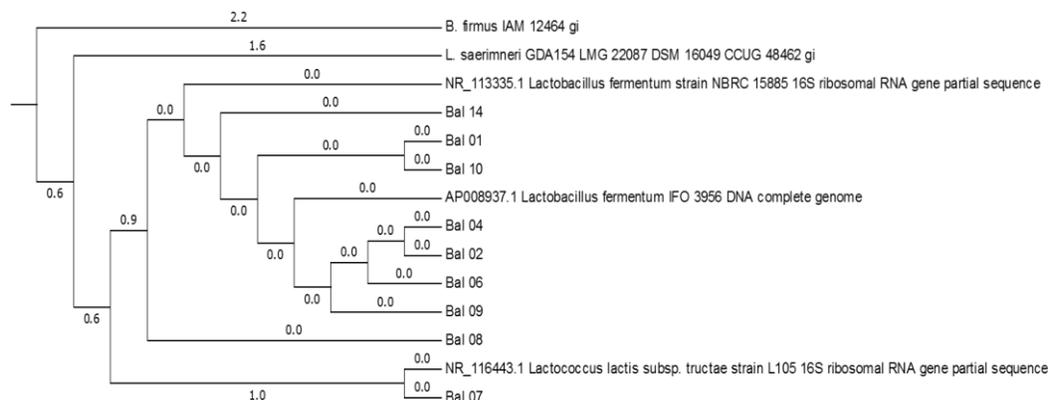
una proteína, fue reportado en la saliva de humanos y que tiene potencial inmuno-probiótico (Taweechoatpatr *et al.*, 2009) (Tabla 1 y Figura 2). El árbol filogenético de la Figura 2, muestra las afinidades filogenéticas basadas en el análisis de un fragmento del gen 16S ARNr de las cepas analizadas (BAL) y las que se hallan en la base de datos de GenBank. Como se puede observar, las cepas identificadas forman parte de las bacterias acidolácticas teniendo afinidad con *Bacillus firmus*, *Lactobacillus saerimneri*, *L. fermentum*, *Lactococcus lactis*. Sin embargo, su secuencia indica que las cepas analizadas corresponden a *L. fermentum*.

**Tabla 1**

Identificación molecular mediante espectrometría de masas MALDI TOF/TOF de proteínas de BAL asociadas al tracto digestivo de lechón

Cepa	Sitio de aislamiento	Tamaño de la secuencia (AA)	Proteína identificada	Especie Identificada	% de identidad	Nº de accesoión en GenBank
BAL 2	Estómago	133	ornithine monooxygenase [Bacillus firmus]	<i>Bacillus firmus</i>	100	WP_048009930.1
BAL 4	Estómago					
BAL 6	Estómago					
BAL 9	Yeyuno					
BAL 1	Estómago					
BAL 10	Yeyuno	262	RNase J family beta-CASP ribonuclease [Lactobacillus saerimneri]	<i>Lactobacillus saerimneri</i>	100	WP_009551846.1
BAL 14	Yeyuno					
BAL 8	Yeyuno					
BAL 7	Íleon					

Para obtener mayor información sobre la referencia ingrese al siguiente enlace: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> y digite el código de accesoión de cada bacteria cultivable.



**Figura 2.** Árbol filogenético mostrando la relación de las bacterias productoras de proteína (bacteriocina) con las BAL aisladas del tracto digestivo del lechón.

Las proteínas identificadas en las cepas analizadas (ornithine monooxygenase y RNase J family beta-CASP ribonuclease) son exudados no ácidos denominadas péptidos antibacterianos posiblemente bacteriocinas, que son considerados como proteínas con acción bactericida, que han sido encontradas en *Bacillus firmus*, y *Lactobacillus saerimneri* (Torres y Zapata, 2002), estas proteínas han sido caracterizadas molecularmente y en la actualidad son de gran interés en industria de producción de alimento por sus propiedades antibacterianas (García *et al.*, 2012; NCBI, 2015). La ornithine monooxygenase actúa como sideróforo A (SidA) y es una monooxygenasa dependiente de flavina que cataliza la hidroxilación dependiente de NAD (P) H y oxígeno de ornitina en la biosíntesis de sideróforos, que posteriormente se forma para generar los hidroxamatos quelantes de hierro del sideróforo pyoverdina, que limitan el uso de estos metales en la nutrición de *Escherichia* produciéndola muerte de la bacteria. Romero (2012) y Shirey (2013) reportaron que la ornithine monooxygenase interviene en el metabolismo al condicionar la acción de varios metales sobre la actividad enzimática y aumenta en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  poseyendo efectos fungicida, larvicida y quelante que impide la nutrición bacteriana de patógenos (Zohra, 2016; Geng, 2016; Cechova, 2016). La RNase J family beta-CASP ribonuclease actúa como una proteasa específica que causa destrucción celular de patógenos por su acción antibiótica, donde la acción de los iones magnesio indican resultados de la mutagénesis. En la división exoribonucleolítica procesada, también es reportado en su presencia dos iones catalíticos de zinc, con capacidad para catalizar la degradación endo- y exoribonucleolítica. La degradación exoribonucleolítica procede en la dirección 5' a 3' (destrucción enzimática de material genético) (Xue-Yuan, 2015).

De las bacterias caracterizadas molecularmente mediante la identificación de proteína por espectrofotometría de masa cinco poseen proteínas relacionadas con la de *Bacillus firmus* y cuatro con la de *Lactobacillus saerimneri*, las nueve bacterias pertenecen al orden Lactobacillales, las cuales están reportadas como bacterias benéficas en la producción de alimento y en uso para humanos.

Las proteínas encontradas en las bacterias seleccionadas tienen actividades probióticas con acción específica, ligada al efecto quelante (mono oxigenasa) y enzimáticos de destrucción de proteínas bacterianas (caspasa-ribonucleas). La ornithine monooxygenase y la RNase J family beta-CASP ribonuclease son de gran potencial para el reemplazo de los antibióticos en la alimentación de lechones.

#### 4. Conclusiones

Se identificaron los péptidos antibacterianos ornithine monooxygenase y RNase J family beta-CASP ribonuclease en las cepas BAL aisladas del tracto digestivo de lechones, consideradas como péptidos que fueron halladas en *Bacillus firmus* y *Lactobacillus saerimneri*, teniendo la primera efecto quelante y la segunda un efecto enzimático que les permite inhibir y controlar bacterias patógenas, estas bacterias tienen potencial uso como probiótico y posible productores de bacteriocinas.

#### Referencias bibliográficas

- Bhandari, S.K.; Opapeju, F.O.; Krause, D.O.; Nyachoti, C.M. 2010. Dietary protein level and probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88 challenge: Performance and gut microbial population. *Livestock Science* 133, no. 11th International Symposium on Digestive Physiology of Pigs, Part 1: 185-188.
- Cechova, D.; Novakova, k.; Mikulik k.; M.; Novotna, O.; Julak, J.; Zanvit, P.; Prokesova, L. 2013. Immunomodulatory properties of subcellular fractions of a G+ bacterium, *Bacillus firmus*. *Folia Microbiologica* 58(2): 111-21.
- Cueto-Vigil, M.C.; Acuña-Monsalve, Y.; Valenzuela-Riño, J. 2010. Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido-lácticas aisladas de suero costeño. *Actualidades Biológicas* 32(93): 129-138.
- Dulanto, G.R. 2013. Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de "langostino

- blanco" *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA).
- Del Coco, V.F. 2000. Los microorganismos desde una perspectiva de los beneficios para la salud. *Revista Argentina de Microbiología* 47: 171.
- García, M.; López, Y.; Carcasses A. 2012. Empleo De Probióticos En Los Animales. Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Popular de Angola. Empresa del Arroz, Vertientes. Disponible en <http://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/empleo-probioticos-animales-t29474.htm>
- Geng, C.; Nie, X.; Tang, Z.; Zhang, Y.; Lin, J.; Sun, M.; Peng, D. 2016. A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematocidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. *Scientific Reports* 6: 25012.
- Gustincich, S.; Manfiolett, G.; Del Sal, G.; Schneider, C.; Carnici, P. 1991. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 11(3): 298-302.
- Kim, H. B.; Borewicz, K.; White, B. A.; Singer, R. S.; Sreevatsan, S.; Tu, Z. J.; Isaacson, R. E. 2012. Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(38): 15485–15490.
- Luque, J.; Herraiz, A. 2006. *Biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en la salud*, departamento de bioquímica y biología molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares Madrid. Editorial Harcourt. Grafica Muriel S.A.
- Macouzet, M., Robert, N.; Lee, B.H. 2010. Genetic and functional aspects of linoleate isomerase in *Lactobacillus acidophilus*. *Applied microbiology and biotechnology* 87(5): 1737-1742.
- National Center for Biotechnology Information. 2015. Database resources of National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue): D6-D17.
- Ramírez, L.; Castaño, D. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* 42: 263-268.
- Romero, E.; Fedkenheuer, M.; Chocklett, S.W.; Qi, J.; Oppenheimer, M.; Sobrado P. 2012. Dual role of NADP (H) in the reaction of a flavin dependent N-hydroxylating monooxygenase. Contents lists available at SciVerse Science Direct, *Biochimica et Biophysica Acta* 1824: 850-857.
- Sánchez, H.; Ochoa, G. 2016. Producción y valoración de alimentos para animales monogástricos, con ensilado biológico de restos del procesamiento de langostino (*Litopenaeus vannamei*) fermentados con lactobacilos. *Scientia Agropecuaria* 7: 181-187.
- Shirey, C.; Badieyan, S.; Sobrado, P. 2013. Role of Ser-257 in the Sliding Mechanism of NADP(H) in the Reaction Catalyzed by the *Aspergillus fumigatus* Flavin-dependent Ornithine N5-Monooxygenase SidA. *The Journal of Biological Chemistry* 288(45): 32440–32448.
- Taweechoitipatr, M.; Iyer, C.; Spinler, J. K., Versalovic, J.; Tumwasorn, S. 2009. *Lactobacillus saerimneri* and *Lactobacillus ruminis*: novel human-derived probiotic strains with immunomodulatory activities. *FEMS Microbiology Letters* 293(1): 65–72.
- Torres, C; Zarazaga, M. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino?. *Logroño, Gaceta Sanitaria* 16(2): 109-112.
- Vélez, J. 2014. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granjas del Aburrá sur, Tesis de magister en biotecnología, aislamiento de cepas nativas de probióticos para su uso en animales, Producción, desarrollo y transformación de productos agropecuarios, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Medellín, Colombia.
- Xue-Yuan, P.; Bralley, P.; Jones, G.H.; Luisi, B.F. 2015. Linkage of catalysis and 5' end recognition in ribonuclease RNase J. *Nucleic Acids Research* 43(16): 8066-8076.
- Yimin, C.; Yoshimi, B.; Takashi, N.; Tae-Kwang, O. 1998. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. *The Journal of general and applied microbiology* 44(5): 311-316.
- Zohra, R.R.; Shah Ali, U.Q.; Sidra P.; Afsheen A. 2016. Influence of different metals on the activation and inhibition of  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus firmus* KIBGE-B28. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 29(4): 1275-1278.