

Análisis comparativo de métodos de extracción de ADN bacteriano en productos fermentados**Comparative analysis of bacterial DNA extraction methods in fermented products**Ivana Preciosa Fernández^{1,*}, Angelica Gonzalez¹, Sandra Alvarez¹ & Romina Chavez¹ ¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.*Autor correspondiente: ifernandez@facen.una.py.

Resumen. En los estudios moleculares, la calidad e integridad del ADN es esencial para la confiabilidad de los resultados, según el método de extracción utilizado, pues puede proveer contaminación residual con sales y solventes. El objetivo de este trabajo es analizar la eficiencia de diferentes métodos de extracción de DNA de productos fermentados. La metodologías utilizadas serán Método por Ebullición, Método de tiras reactivas y Método de extracción por Columna, donde se analizaron la concentración de ADN extraído y la pureza del mismo mediante espectrofotómetro y posterior análisis estadísticos. En los resultados se observó que con el Método de columna es la que mejor se adecua a los parámetros esperados, pese a su elevado costo para análisis más finos se recomienda la utilización de el método.

Palabras clave: extracción de ADN, bacteria, fermentación.

Abstract. In molecular studies, the quality and integrity of DNA is essential for the reliability of the results, depending on the extraction method used, as it can provide residual contamination with salts and solvents. The objective of this work is to analyze the efficiency of different methods of DNA extraction from fermented products. The methodologies used will be the Boiling Method, the Reactive Strip Method and the Column Extraction Method, where the concentration of extracted DNA and its purity were analyzed by spectrophotometer and subsequent statistical analysis. The results showed that the Column Method is the one that best suits the expected parameters, despite its high cost for finer analysis, the use of this method is recommended.

Keywords: DNA extraction, bacteria, fermentation.

Introducción

La identificación de microorganismos a través de técnicas moleculares ha tomado gran importancia en los últimos años gracias a su alta precisión. En los estudios moleculares, la calidad e integridad del ADN es esencial para la confiabilidad de los resultados. Se han reportado diversas técnicas de extracción de ADN con métodos relativamente sencillos y de bajo costo para diversos tipos de muestra, sin embargo, la misma podría ofrecer ADN poco purificado por lo que se debe añadir un paso adicional en la extracción y se opta generalmente por la filtración en columnas específicas, o realizar varios lavados para eliminar los residuos de los disolventes (Baena *et al.*, 2013).

La extracción del DNA genómico es un paso crucial cuando se desean realizar estudios moleculares, ya que existe variabilidad según el método de extracción utilizado, pues puede proveer con-

taminación residual con sales y solventes (Rios-Sanchez *et al.*, 2016). El procedimiento general de extracción de ácidos nucleicos consiste en tres etapas consecutivas: disgregación de las células o tejidos (lisis celular), inactivación de las nucleasas intracelulares y en separación de los ácidos nucleicos de los demás componentes celulares (Orfao *et al.*, 2011).

Los alimentos fermentados tradicionales se obtienen mediante fermentaciones naturales (en las que no se añaden inóculos) y están constituidos por microbiotas complejas, la producción de alimentos fermentados en condiciones controladas y su calidad dependen del conocimiento y control de la microbiota presente (Ruíz *et al.*, 2003). Los productos lácteos y no lácteos son considerados vehículos para la entrega de bacterias probióticas al tracto gastrointestinal humano. Algunas matrices han sido utilizadas en el desarrollo de productos probióticos no lácteos como frutas, vegetales, le-

gumbres y cereales. (Betoret N, Puente L, Diaz MJ *et al.*, 2003). La selección de probióticos se basa principalmente en propiedades como los beneficios específicos para la salud, la supervivencia y la persistencia en el huésped, y la seguridad y estabilidad demostradas (Tuomola *et al.*, 2001)

Se ha demostrado que ciertos microorganismos en las bebidas fermentadas ayudan a restaurar el equilibrio de la microbiota, especialmente después de tratamientos con antibióticos o en condiciones de disbiosis, denominados probióticos (Radford-Smith *et al.*, 2023). Se han aislado cepas de *Lactobacillus* de varias fuentes vegetales, como frutas, hierba, hojas, savia de árboles, flores, verduras fermentadas y bebidas fermentadas como vino, whisky de malta, shochu y cerveza (Irisawa & Okada, 2009). En los últimos años, la demanda de productos probióticos no lácteos por parte de los consumidores ha aumentado debido a los problemas de intolerancia a la lactosa y el contenido de colesterol asociado con el consumo de productos lácteos fermentados. (Luckow T, Delahunty C, 2004).

La mayoría de los probióticos que se transmiten a través de alimentos fermentados y complementos alimenticios pertenecen a *Bifidobacterium* y bacterias lácticas con bajo porcentaje de GC. Estas últimas incluyen los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Las especies que pertenecen a *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se utilizan ampliamente como probióticos (Felis y Dellaglio, 2007). Ambos géneros son habitantes comunes del intestino humano, pero las propiedades funcionales difieren notablemente entre especies y cepas (Strahinic *et al.*, 2007)

Es fundamental identificar estos microorganismos de gran interés para la salud humana, de modo que los consumidores cuenten con información precisa sobre lo que están consumiendo. La caracterización molecular representa un avance significativo para obtener datos más confiables sobre los microorganismos presentes en estos productos. Por ello, el objetivo de este estudio es analizar la eficiencia de diferentes métodos de extracción de ADN de productos fermentados, para que en posteriores

ensayos puedan ser utilizados para identificación molecular.

Materiales y métodos

Se utilizaron productos fermentados comúnmente conocidos como Kombucha proveídos por el Laboratorio de Biotecnología Industrial de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

Extracción de ácidos nucleicos de productos fermentados se utilizaron tres métodos diferentes y dos repeticiones por método

Método por Ebullición

Las muestras se colocaron en tubos de 1,5 mL, se colocaron en baño seco a 99 °C por 10 minutos con inversiones cada 3 minutos y puesto en vortex por unos segundos y se repitió el proceso cuatro veces. Posteriormente se realizó la incubación por 10 minutos a baño frío en hielo por 10 min, con inversiones cada 3 minutos, puesto en vortex por unos segundos y se repitió el proceso cuatro veces.

Posterior a los choques de temperatura, se centrifugaron las muestras a 14.500 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

Método de tiras reactivas

Las muestras se colocaron en tubos de 1,5 mL, se realizó la centrifugación a 8000 rpm por 10 min para la obtención del pellet. Las muestras se suspendieron con 100 µL de tampón de extracción. Los ácidos nucleicos se capturan con un disco Whatman No.1 de 3 mm de diámetro. Luego, el disco se transfirió a un tubo que contenía 100 µL tampón de lavado durante un minuto para eliminar los contaminantes presentes (Se repitió 3 veces). Posteriormente, las tiras se colocaron un tubo nuevo y se colocó 70 µL de agua ultra pura. (Zou *et al.*, 2017)

Método de extracción por Columna

Se utilizó un kit comercial GenElute (SIGMA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó la lisis y el lisado celular se transfirió a una columna en presencia de un tampón que permite que el ácido nucleico y las proteínas de unión a ácidos

nucleicos se absorban en la matriz, se centrifuga y descarta el sedimento y se adiciona el buffer de lavado y se repite el proceso dos veces. La columna ya seca se transfirió a un tubo limpio y se agregó el buffer de elusión para liberar el ácido nucleico de la matriz sólida en un recipiente colector.

Cuantificación de Ácidos Nucleicos y Purificación

Se evaluó la concentración del ADN bacteriano extraído en cada método mediante el espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, EEUU), a una longitud de onda de 260 nm. Del mismo modo se evaluó la calidad respecto a la pureza del ADN extraído mediante las lecturas a 230 nm y 280 nm.

Análisis estadístico

Para la comparación de métodos de extracción se

Tabla 1. La concentración total y pureza del ADN para cada método. Parámetros de pureza y cantidad de DNA obtenidos en distintos métodos de extracción: **A)** Método de ebullición. **B)** Método de tira reactiva. **C)** Método de extracción por columna. La muestra 1 (duplicado), 2 (duplicado) y 3 corresponden a una bebida fermentada a partir de té.

Método	Muestra	Concentración de ADN (ng/uL)	Pureza del ADN (A260/280)
A	1.1	520,1	0,92
	1.2	518,1	0,92
	2.1	547,8	0,92
	2.2	546,8	0,92
	3	508,2	0,93
B	1.1	23,91	1,35
	1.2	22,51	1,33
	2.1	24,44	1,22
	2.2	26,38	1,19
	3	84,92	1,02
C	1.1	69,48	1,76
	1.2	53,46	1,93
	2.1	61,16	1,9
	2.2	48,77	2,12
	3	57,91	1,72

tomaron como variables de interés: la concentración y la pureza de los 3 métodos empleados. Para la variable concentración se realizó el test de ANOVA por medio del software estadístico R Studio, primeramente se obtuvo el promedio de los valores de la concentración de ADN que fueron extraídos por duplicados y dichos valores fueron analizados por medio del software, además se realizó un gráfico de cajas para conocer cuál es la variabilidad y consistencia de cada técnica. En el caso de la variable pureza los valores obtenidos son comparados con el valor de pureza estándar se considera que el ADN es puro cuando el ratio A260/230 se sitúa en torno a 1,8 y 2,2, además por medio del software estadístico R Studio se realizó un gráfico de cajas para conocer cuál es la variabilidad y la consistencia de cada método de extracción en cuanto a la variable pureza.

Resultados

En la Tabla 1, se puede observar todos los resultados obtenidos por medio del espectrofotómetro de la extracción de ADN por los distintos métodos utilizados para cada muestra.

Parámetros de pureza y cantidad de DNA obtenidos en distintos métodos de extracción. A= Método de ebullición, B=Método de tira reactiva, C= Método de extracción por columna. La muestra 1 (duplicado), 2 (duplicado) y 3 corresponden a una bebida fermentada a partir de té.

La Fig. 1 muestra un gráfico de barras que ilustra la distribución de las diferentes concentraciones de ADN obtenidas por cada método

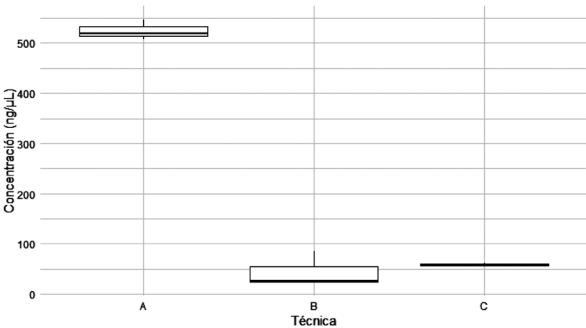


Figura 1. Concentración de ADN obtenido por cada método de extracción.

de extracción empleado (Método de Ebullición, Método de tira reactivas y . El eje X representa los diferentes métodos o técnicas de extracción, etiquetadas como A, B, y C (Técnica A: Método de ebullición, Técnica B: Método de tiras reactivas, Técnica C: Método de columna). El eje Y indica la concentración de ADN obtenida, medida en ng/ μ L, mientras que las barras indican la distribución de los valores de concentración para cada método además la extensión de las cajas o la longitud de las barras puede indicar la variabilidad y consistencia en las concentraciones obtenidas por cada método de extracción. La barra más alta indica una mayor concentración de ADN obtenido y la barra más estrecha indica una mayor consistencia. Estos resultados sugieren que el método de ebullición tiene mayor rendimiento y que el método de columna es el que menos variabilidad presenta en cuanto a sus resultados arrojados.

La Fig. 2 muestra un gráfico de barras que ilustra la distribución de los diferentes valores de pureza de ADN obtenidas por cada método de extracción empleado (Método de Ebullición, Método de tira reactivas y . El eje X representa los diferentes métodos o técnicas de extracción, etiquetadas como A, B, y C (Técnica A: Método de ebullición, Técnica B: Método de tiras reactivas, Técnica C: Método de columna). El eje Y indica el valor de pureza de ADN obtenido, mientras que las barras indican la distribución de los valores de pureza para cada método además la extensión de las cajas o la longitud de las barras puede indicar la variabilidad y consistencia de los valores de pureza obtenidos por cada método de extracción. Las barras están situadas en niveles muy parecidos pero se diferencian en la estrechez. Los resultados arrojados sugieren que los métodos de ebullición y de tira reactivas son más consistentes en cuanto a los valores de pureza arrojados, siendo el método de columna el que presenta mayor dispersión.

En la Tabla 2, se puede observar la prueba de ANOVA realizada para cada metodología de extracción de ADN.

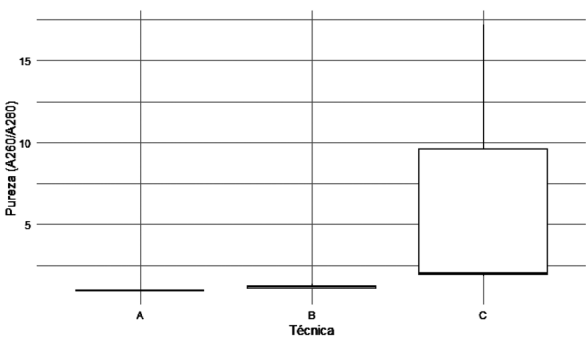


Figura 2. Pureza de ADN obtenida por cada metodología de extracción.

Df (Degrees of Freedom - Grados de Libertad):

- Técnica: El grado de libertad para la variable Técnica es 2. Esto indica que hay 3 técnicas diferentes (ya que los grados de libertad son el número de niveles de la variable menos 1).
- Residuals: Los grados de libertad para los residuos son 6. Esto representa la variabilidad dentro de los grupos que no se puede explicar por la variable Técnica.

Sum Sq (Sum of Squares - Suma de Cuadrados):

- Técnica: La suma de cuadrados para Técnica es 448827. Esto mide la variabilidad total en la concentración del ADN que puede explicarse por las diferencias entre las técnicas.
- Residuals: La suma de cuadrados de los residuos es 3286. Esto mide la variabilidad dentro de las técnicas que no puede explicarse por las diferencias entre las técnicas.

Mean Sq (Mean Square - Cuadrado Medio):

- Técnica: El cuadrado medio para Técnica es 224413, que se calcula como la suma de cuadrados dividida

Tabla 2. Cálculo del ANOVA de la variable concentración. **Códigos de Significancia:** 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '.' '0.1' '.' '1'. **Df** = Degrees of Freedom - Grados de Libertad, **Sum Sq** = Sum of Squares - Suma de Cuadrados, **Mean Sq** = Mean Square - Cuadrado Medio, **F value** = F Valor, **Pr(>F)** = Valor P.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Técnica	2	448827	224413	409.8	3.84e-07
Residuals	6	3286	548		

por los grados de libertad (448827/2)

- Residuals: El cuadrado medio de los residuos es 548, que se calcula como la suma de cuadrados dividida por los grados de libertad (3286 / 6).

F value (F Valor):

- El valor F es 409.8. Esto es una medida de la relación entre la variabilidad explicada por el modelo y la variabilidad no explicada. Un valor F alto indica que la variabilidad entre las técnicas es mucho mayor que la variabilidad dentro de las técnicas.

Pr(>F) (Valor P):

- El valor p asociado con el valor F es 3.84e-07. Esto es una medida de la probabilidad de observar un valor F tan extremo, o más extremo, si la hipótesis nula (de que no hay diferencias entre las técnicas) es cierta.
- Un valor p de 3.84e-07 es extremadamente pequeño, mucho menor que cualquier nivel de significancia comúnmente usado (como 0.05, 0.01, o 0.001). Esto indica que es muy improbable que las diferencias observadas entre las técnicas sean debidas al azar.

Signif. codes (Códigos de Significancia):

- Los asteriscos (***) junto al valor p indican que el resultado es altamente significativo (nivel de significancia

menor a 0.001).

La prueba ANOVA muestra que hay una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de ADN entre las diferentes técnicas utilizadas. La probabilidad de que estas diferencias sean debidas al azar es extremadamente baja ($p < 0.001$).

Discusión

La cantidad total y pureza del ADN para cada método están descritas en la Tabla 1. De los tres métodos analizados, el que exhibió mejores resultados en cuanto a cantidad de DNA fue el método de ebullición, obteniéndose una concentración de 547,8 ng/uL. Los datos obtenidos demuestran que este método es simple es de bajo costo y rápido, además el protocolo puede ser utilizado en laboratorios que carecen de suministros, equipos y tecnología.

Si bien el método de tiras reactivas resulta un método efectivo y rápido (84,92 ng/uL), la velocidad y simplicidad de este método lo hacen ideal para aplicaciones basadas en amplificación de ácidos nucleicos tanto dentro como fuera del laboratorio, incluidos entornos de recursos limitados, como sitios de campo remotos, países en desarrollo e instituciones de enseñanza (Ahmed & Dabool, 2017). Por otra parte, para el estudio presentado las condiciones de pureza del DNA no fueron las esperadas (valores entre 1,02 y 1,35), por lo que encontramos una diferencia de significancia entre la misma y las obtenidas con el método de ebullición (0,92 y 0,93).

Siguiendo con los parámetros de pureza se observó que el método con mejores resultados fue el de extracción por columna (valores entre 1,72 y 2,12), asimismo en cuanto la cantidad de ADN

extraído presenta valores que van desde la menor concentración 48,77 ng/uL hasta 69,48 ng/uL. Dichos valores concuerdan con la declaración del fabricante, puesto que para los lavados se utiliza un tampón cuya finalidad es la de eliminar las sales de unión y otros contaminantes como proteínas, fenoles, etc. Además debido a que es un método comercial asegura que en presencia de ciertas sales el ácido nucleico quede retenido por adsorción en columnas de sílice.

En la Figura 1, donde se analiza la variabilidad y consistencia de las técnicas de extracción de ADN en cuanto a la concentración obtenida, se aprecia que la Técnica C (Método de columna) es la que mayor precisión y consistencia presenta, mientras que la Técnica A (Método de Ebullición) obtuvo el mayor rendimiento; y la Técnica B (Método de tiras reactivas) es la más dispersa en cuanto a sus valores obtenidos de concentración de ADN. La variabilidad es un indicativo de la dispersión o el rango de los valores observados en una muestra o población. Una alta variabilidad implica que los valores están muy dispersos, mientras que una baja variabilidad indica que los valores están más agrupados cerca de la media (McClave & Sincich, 2017). En el contexto de la extracción de ADN, la variabilidad se refiere a las diferencias en la concentración de ADN obtenida de diferentes muestras utilizando la misma técnica. Una alta variabilidad en los resultados de la concentración de ADN sugiere que la técnica puede ser inconsistente o que está sujeta a factores que afectan la precisión de la medición (Kirkwood & Sterne, 2003).

En la Fig. 2, donde se analiza la variabilidad y consistencia de las técnicas de extracción de ADN en cuanto a la pureza obtenida, observamos que la Técnica C (Método de columna) es la que más cercana se encuentra a los parámetros estándar de pureza de ADN esperados que oscilan entre 1,8 y 2,2 pero a su vez es la que presenta mayor dispersión en cuanto a sus datos lo que la hace la más inconsistente comparado a las otras técnicas empleadas. La Técnica A (Método de ebullición) es la más consistente en sus valores arrojado pero

en contraste es la que menos se acerca a los estándares de pureza deseados de ADN, en cuanto a la Técnica B que da en una posición intermedia en cuanto a los parámetros de pureza y consistencia en comparación con las Técnicas A y C, la consistencia se refiere a la capacidad de un método o técnica para producir resultados similares bajo condiciones similares. Un método es considerado consistente si, cuando se repite el procedimiento en circunstancias similares, los resultados obtenidos son casi idénticos (Montgomery & Runger, 2010). En el contexto de la extracción de ADN, la consistencia se refiere a la capacidad de una técnica de extracción para producir concentraciones de ADN similares en diferentes ensayos o muestras. Una técnica consistente es aquella que produce resultados fiables y predecibles con poca variabilidad entre las muestras (Bland & Altman, 1996).

En la Tabla 2 se evidencia los cálculos del ANOVA para conocer si se encuentra diferencia significativa entre las técnicas analizadas teniendo como resultado lo siguiente: existe una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de ADN entre las diferentes técnicas utilizadas, siendo la Técnica A la que cuenta con mayor rendimiento. La probabilidad de que estas diferencias sean debidas al azar es extremadamente baja ($p < 0.001$), dado que el valor F es muy alto y el valor p es extremadamente bajo. ANOVA es una técnica estadística que se utiliza para comparar las medias de tres o más grupos para determinar si al menos uno de ellos difiere significativamente de los demás (Montgomery, 2019). En el contexto de la extracción de ADN, ANOVA se puede utilizar para comparar la efectividad de diferentes técnicas de extracción, evaluando si las diferencias en las concentraciones de ADN obtenidas entre las técnicas son estadísticamente significativas (Kutner *et al.*, 2004). En estudios de ADN, el p-valor puede indicar si las diferencias en la concentración de ADN entre diferentes técnicas son estadísticamente significativas (Motulsky, 2010). Un F-valor alto sugiere que el modelo explica una

proporción significativa de la variabilidad en los datos (Zar, 2010). En el contexto de la extracción de ADN, un F-valor alto indicaría que las diferencias entre las técnicas de extracción son significativas en términos de la concentración de ADN obtenida (Snedecor & Cochran, 1989).

Conclusión

Dependiendo de la finalidad, tal como la academia o la investigación existen métodos más favorables, sin embargo, se presentó una ventaja importante en cuanto al costo del método de ebullición, obteniéndose a su vez mayor concentración de ADN, sin embargo, este fue el método que presentó menor pureza, por lo que se recomienda una modificación al proceso, agregando lavados que permitan la eliminación de proteína residuales. El método de ebullición mejorado tiene muchas ventajas, como la dispensación sin el uso de productos químicos peligrosos como fenol y enzimas específicas. Por lo tanto, es rápido, fácil, económico y puede aplicarse para el aislamiento de alto rendimiento de ADN de calidad analítica de bacterias.

Se determinó que el método con los mejores resultados en relación cantidad/pureza fue el de extracción por columna, pero el mismo presenta la desventaja del costo y un procedimiento más meticuloso, necesitando mayor tiempo de procesamiento, por el contrario, su principal ventaja es ofrecer una mejor calidad de DNA.

En conclusión, al método de ebullición es la que destaca en cuanto al mejor rendimiento en la obtención de ADN no es acompañado con un buen índice de pureza lo que no lo convierte en un método recomendable y en cuanto a la método de columna también obtiene buenos valores de recuperación de ADN y pureza del mismo sin embargo la dispersión de los resultados la convierte en una técnica muy variable en su consistencia.

En cuanto a los análisis estadísticos, Dado que el valor F es muy alto y el valor p es extremadamente bajo, podemos concluir que la técnica de extracción de ADN tiene un efecto significativo sobre la concentración de ADN obtenida.

Agradecimientos

Agradecemos al Departamento de Biotecnología de la FACEN-UNA y el Laboratorio de Micología por el apoyo en para la realización del trabajo

Contribución de los autores

Ivana Preciosa Fernandez: Ideación del trabajo, Conceptualización, Diseño de metodologías, Redacción y Edición. Angelica Gonzalez: Realización de los ensayos laboratoriales, redacción. Romina Chavez: Análisis de datos y redacción. Sandra Alvarez: Recursos para la implementación de las técnicas y redacción.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

Literatura citada

- Ahmed, O.B. & Dablood, A.S. (2017). Quality improvement of the DNA extracted by boiling method in gram negative bacteria. *International Journal of Bioassays*, 6(4): 5347. <<https://doi.org/10.21746/ijbio.2017.04.004>>.
- Baena, J.A., Ramos, A.J., Gómez, C.J. & Gómez, D.E. (2013). Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1): 172-179.
- Betoret, N., Puente, L., Díaz, M.J., Fito, P. & Andrés, A. (2003). Development of probiotic enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering*, 56(3): 273-277.
- Bland, J.M. & Altman, D.G. (1996). Statistics Notes: Measurement Error and Correlation Coefficients. *BMJ*, 313(7048): 41-42.
- Felis, G.E. & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8: 44-61.
- Irisawa, T. & Okada, S. (2009). *Lactobacillus sucicola* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from oak tree (*Quercus* sp.) sap. *International Journal of Systematic and Evo-*

- lutionary Microbiology*, 59(11): 2662–2665.
- Kirkwood, B.R. & Sterne, J.A.C. (2003). *Essential Medical Statistics* (2nd ed.). Oxford: Blackwell Science. 512 pp.
- Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J. & Neter, J. (2004). *Applied Linear Statistical Models* (5th ed.). Boston: McGraw-Hill/Irwin. 1396 pp.
- Luckow, T. & Delahunty, C. (2004). Which juice is 'healthier'? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. *Food Quality and Preference*, 15(7–8): 751–759.
- McClave, J.T. & Sincich, T. (2017). *Statistics* (13th ed.). Boston: Pearson. 896 pp.
- Montgomery, D.C. (2019). *Design and Analysis of Experiments* (10th ed.). Hoboken: Wiley. 752 pp.
- Montgomery, D.C. & Runger, G.C. (2010). *Applied Statistics and Probability for Engineers* (5th ed.). Hoboken: Wiley. 784 pp.
- Motulsky, H.J. (2010). *Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking* (3rd ed.). New York: Oxford University Press. 352 pp.
- Orfao, A. & Red Nacional de Biobancos - ISCIII (Eds.). (2011). *Protocolo de Extracción de Ácidos Nucleicos*. Madrid: Red Nacional de Biobancos. 28 pp. [Consulted: 1.vii.2025]. <<https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>>.
- Radford-Smith, D.E. & Anthony, D.C. (2023). Prebiotic and probiotic modulation of the microbiota–gut–brain axis in depression. *Nutrients*, 15(8): 1880. <<https://doi.org/10.3390/nu15081880>>.
- Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O.C., Martínez, A., Hernández, S. & Pérez-Morales, R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*, 26(4): 10–20. <<https://doi.org/10.15174/au.2016.1078>>.
- Ruíz, G.D. & Rodarte, C.W. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 45: 30–40. <<https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-latinoamericana-de-microbiologia/articulo/metodos-para-el-estudio-de-comunidades-microbianas-en-alimentos-fermentados>>.
- Snedecor, G.W. & Cochran, W.G. (1989). *Statistical Methods* (8th ed.). Ames: Iowa State University Press. 503 pp.
- Strahinic, I., Busarcevic, M., Pavlica, D., Milasin, J., Golic, N. & Topisirovic, L. (2007). Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(2): 111–117. <<https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00331.x>>.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. & Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl.): 393S–398S.
- Zar, J.H. (2010). *Biostatistical Analysis* (5th ed.). Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall. 944 pp.
- Zou, Y., Mason, M.G., Wang, Y., Wee, E.J.H., Turni, C., Trau, M. & Botella, J.R. (2017). Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. *PLOS Biology*, 15(11): e2003916. <<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003916>>.