

**Evaluación *in vitro* de *Lactobacillus gasseri* con características probióticas sobre
*Staphylococcus aureus***

**In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* with probiotic characteristics on *Staphylococcus
aureus***

H. Jurado-Gómez^{1*}, I. Fajardo-Argoti¹, A. Rodríguez-Caicedo¹

Artículo recibido: 18 de julio de 2016 / Aprobado: 24 de octubre de 2016

Resumen

Introducción. *L. gasseri* es una bacteria láctica del tracto digestivo, que tiene características probióticas importantes para el control de organismos patógenos, y *S. aureus* es una cepa patógena importante en la industria alimentaria, debido a los problemas sanitarios que produce en varios países. **Objetivo.** Se buscó evaluar las características probióticas de *L. gasseri* sobre *S. aureus* en condiciones *in vitro*. **Materiales y métodos.** Se evaluó la susceptibilidad de ambas cepas a diferentes antibióticos; el efecto de inhibición de *L. gasseri* y su sobrenadante sobre *S. aureus*; crecimiento de la cepa láctica a diferentes pH, temperaturas, sales biliares y bilis bovina; también se estableció la cinética de fermentación y en ella se determinó conteo de microorganismos viables en placa, pH, consumo de azúcar, consumo de proteína y porcentaje de ácido láctico; y mediante HPLC-DAD se determinó péptidos y ácido láctico, y en el caso de aminoácidos en el sobrenadante se determinó mediante HPLC-PDA. **Resultados.** Se encontró resistencia de ambas cepas a los antibióticos penicilina, dicloxacilina, cifoxitin y cefalexin. La cepa láctica y el sobrenadante inhibieron el crecimiento de *S. aureus*. El crecimiento fue adecuado para las diferentes variables con valores entre 1.5×10^8 a 3.0×10^{14} UFC/150 μ l. Se

¹ Grupo de investigación FISE-PROBIOTEC, Programa de Zootecnia, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño. Pasto (Colombia).

*Autor para correspondencia: henryjugam@gmail.com.

observó la fase exponencial a las 9 horas con valores de 33.33 Ln UFC/150 µl. Finalmente se identificaron mediante HPLC-DAD el péptido VAL-TIR-VAL, 11.70 g/l de ácido láctico, y el aminoácido tirosina. **Conclusión.** Los resultados demuestran que *Lactobacillus gasseri* tiene características probióticas sobre *S. aureus* en condiciones *in vitro*.

Palabras claves: bacteria láctica, inhibición, cepa patógena, probiótico.

Abstract

Introduction. *Lactobacillus gasseri* is a lactic bacteria in the digestive tract, which has important probiotic features for control of pathogens, while *S. aureus* is a pathogenic strain important in the food industry due to health problems resulting in various countries. **Objective.** We sought to assess the probiotic *L. gasseri* features on *S. aureus in vitro* conditions. **Materials and methods.** susceptibility of both strains to various antibiotics was evaluated; The inhibition effect of *L. gasseri* and on *S.aureus* supernatant; growth of lactic strain at different pHs, temperatures, bile salts and bile bovine; fermentation kinetics was also established therein and counting viable microorganism in plaque, pH, sugar intake, protein intake and percentage of lactic acid was determined; peptides, lactic acid and amino acids in the supernatant was determined for HPLC-DAD y HPLC-PDA. **Results.** Both strains resistance to the antibiotics penicillin, dicloxacillin, cephalixin and cifoxitin. Lactic strain and the supernatant inhibited the growth of *S. aureus*. Growth was adequate for the different variables with values between 1.5×10^8 to 3.0×10^{14} CFU/150 µl. The exponential phase at 9 hours with values of 33.33 Ln CFU/150 µl was observed. Finally he identified by HPLC-DAD VAL-VAL-TIR peptide, 11.70 g/l of lactic acid and amino acid tyrosine. **Conclusion.** The results show that *Lactobacillus gasseri* have probiotic characteristics on *S. aureus in vitro* conditions.

Keywords: lactic bacteria, inhibition, pathogenic, probiotic strain.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) previenen problemas digestivos en el organismo huésped, ya que inhiben, y de esta manera controlan, el crecimiento de microorganismos patógenos; los cuales generalmente son bacterias Gram Negativas (Belkacem-Hanfi *et al.* 2014). Las BAL han adquirido diversos mecanismos para mejorar la competitividad con otras bacterias (López *et al.*, 2008), de esta manera, *L. gasseri* es una BAL homofermentadora, la cual se cree, es autóctona del tracto gastrointestinal y por consiguiente muestra múltiples funciones probióticas (Selle y Klaenhammer 2013).

Por otra parte, *Staphylococcus aureus* es un microorganismo anaerobio facultativo. Algunas características de los estafilococos explican su patogenicidad, que puede asumir varias formas. Crecen relativamente bien en condiciones de presión osmótica elevada y humedad reducida, lo que explica en parte que puedan desarrollarse y sobrevivir en las secreciones nasales y en la piel, y en alimentos poco húmedos. Es probable que el pigmento amarillo que posee le confiera cierta protección ante los efectos antimicrobianos de la luz solar. *S. aureus* produce varias toxinas que contribuyen a su patogenicidad aumentando su capacidad de invadir el cuerpo o dañar los tejidos. Entre estas encontramos el síndrome del shock tóxico, una infección grave caracterizada por fiebre elevada y vómitos que en ocasiones puede provocar la muerte; de igual manera, produce una enterotoxina que al ser ingerida genera náuseas y vómitos, y es una de las causas más comunes de intoxicación alimentaria (Gerard *et al.* 2007) (Nawrotek y Borkowski. 2005). El objetivo de este estudio fue determinar el efecto *in vitro* de *L. gasseri* sobre *S. aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en los laboratorios de microbiología del grupo de investigación Fise-Probiotec y en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño. Se utilizó *Lactobacillus gasseri* ATCC® 19992 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 13245. La reconstitución de cada cepa se efectuó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y su conservación se realizó mediante repique en medio sólido y líquido cada 5 y 8 días.

La obtención del inóculo se realizó de acuerdo a lo descrito por Jurado-Gómez *et al.* (2015). Se evaluó la susceptibilidad de *L. gasseri* y *S. aureus* a penicilina, cefalotina, ciprofloxacina, gentamicina, dicloxacilina, ampicilina, cefalexime, cefatoxina, cefoxitin y trimetropin sulfa con el método de Kirby-Bauer modificado (Bauer *et al.* 1966; Jurado-Gómez *et al.* 2015).

Se determinó la inhibición de *L. gasseri* sobre *S. aureus* mediante la metodología de Tagg y McGiven (1971) ajustada y descrita por Jurado-Gómez *et al.* (2014). Sin embargo, las concentraciones de la bacteria láctica para la presente investigación fueron de 50, 100 y 150 µl. De igual manera, se determinó el efecto del sobrenadante de *L. gasseri* sobre el crecimiento de *S. aureus* bajo la misma metodología (Estrada *et al.* 2005; Jurado-Gómez *et al.* 2014).

Se evaluó el crecimiento de *L. gasseri* a concentraciones de 0.5, 1 y 3% de sales biliares bovinas, y 0.5, 1 y 3% de bilis bovina (Cai *et al.* 1998,1999; Jurado-Gómez *et al.* 2014). Se determinó producción de gas por la metodología de Dahl *et al.* (1989), y la reacción de catalasa mediante la metodología de Cai *et al.* (1998). Se determinó el crecimiento de la cepa láctica a pH de 2.5, 3.5

Revista FMVZ-UN
vol. 63 nro. 3 septiembre - diciembre 2016

y 6 durante 3 horas, con mediciones cada hora; la incubación se realizó en medio MRS comercial a 37°C y 48 horas, el ajuste del pH se realizó con ácido tartárico. Se evaluó el crecimiento de *L. gasseri* a 38 y 45°C; para ello, primero se determinó el tiempo necesario para obtener la fase exponencial de crecimiento en la cepa láctica; con esta información se realizó una nueva inoculación, la cual se ajustó a 0.125 en escala de McFarland y se incubó hasta las 9:00 horas (fase exponencial). Enseguida se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-12} con agua peptonada y se sembraron en cajas de petri con azul de anilina y se inició en la dilución 10^{-8} hasta 10^{-12} a 37°C por 48 horas, para finalmente determinar el recuento de UFC/mL.

Los parámetros cinéticos de *L. gasseri* se evaluaron en medio MRS comercial. Se tomó un Erlenmeyer con 540 ml de medio y se adicionó 60 ml de inóculo de *L. gasseri*, el preparado se incubó a 37°C por 24 horas con agitación constantes a 100 rpm. No se controló el pH por la resistencia de la cepa a bajos niveles. Se tomaron muestras y mediciones cada 3 horas para determinar conteo de microorganismos viables en placa (UFC/mL), Azúcar consumida, proteína consumida y ácido láctico.

Para determinar el conteo de microorganismo viables en placa se usó la metodología de Lanara (1981) descrita por Jurado-Gómez *et al.* (2014). Para determinar el pH se utilizó potenciómetro digital (JENCO® VisionPlus). La determinación del consumo de azúcar se realizó por la metodología de Dubois *et al.* (1956). El consumo de proteína fue determinado por la metodología de Lowry *et al.* (1951) modificada por Jurado-Gómez *et al.* (2014). La determinación de producción de ácido láctico se realizó por titulación de hidróxidos

de sodio (Jurado-Gómez *et al.* 2015). La biomasa fue determinada por el método propuesto por Crueger y Crueger (1993).

Se tomó una muestra de sobrenadante de *L. gasseri* y por HPLC-DAD se determinó el contenido de péptidos y ácido láctico, y para el caso de aminoácidos se determinó por HPLC-PDA; este último análisis también se realizó para *S. aureus*.

La información fue recolectada y analizada en el programa Microsoft Excel (2007); Sin embargo, las variables de cinética de fermentación se evaluaron mediante un diseño de medidas repetidas en el tiempo con el paquete estadístico SPSS 19. A lo referente al efecto de las UFC/150 μ L sobre las diferentes determinaciones realizadas en la cinética de fermentación, el % de ácido láctico del medio de cultivo, *L. gasseri* presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en todos los tiempos destacándose mayor porcentaje de ácido láctico (1,74) al tiempo 9; En cuanto al efecto de las UFC/150 μ L sobre el pH del medio de cultivo, *L. gasseri* presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) a los tiempos 1 y 2, mostrando un pH de 5,3325 y 5,2225 respectivamente.

RESULTADOS

Los resultados de sensibilidad a los antibióticos se observa en la tabla 1 y figura 1.

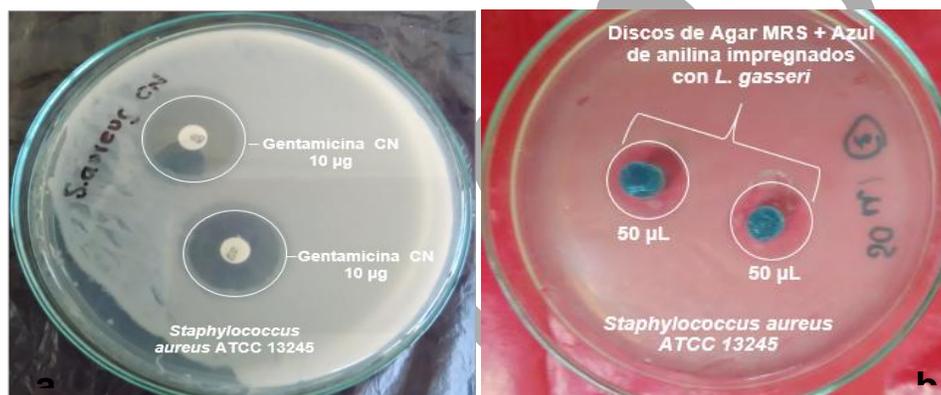
Tabla 1. Susceptibilidad de *L. gasseri* y *S. aureus* a antibióticos.

Antibióticos	Halo (<i>L. gasseri</i>)	Sensibilidad	Halo (<i>S. aureus</i>)	Sensibilidad
P (10 IU)	10	S ^{ab}	0	R ^a
KF (30 μ g)	20	S ^b	22	S ^{abde}
CIP (5 μ g)	35	S ^c	23	S ^{ac}
CN (10 μ g)	-	R ^c	25	S ^{ac}
DCX (1 μ g)	-	R ^a	-	R ^a

CTX (30 µg)	25	S ^b	-	R ^b
AMP (10 µg)	17	S ^a	-	R ^a
FOX (10 µg)	-	R ^{ac}	-	R ^{ac}
COT (25 µg)	-	R ^{bc}	30	S ^{bcd}
CL (5 µg)	-	R ^b	-	R ^b

P: penicilina; KF: cefalotina; CIP: Ciprofloxacina; CN: gentamicina; DCX: dicloxacilina; CTX: cefatoxime; AMP: ampicilina; FOX: cifoxitin; COT: trimetoprim-sulfametaxasol; CL: cefalexin; S: sensible; R: resistente; a: Manual para antibiograma LABORCLIM; b: Centro de controle productos para diagnósticos Ltda. CECON; c: Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana; d: Jurado *et al.* 2015(a); e: Jurado *et al.* 2015(b).

Figura 1. Halos de inhibición de antibiótico y Discos de agar impregnados con *L. gasseri* sobre *S. aureus*.



Los resultados *in vitro* de la cepa láctica sobre la bacteria patógena mostró halos de 10, 12 y 5 mm para concentraciones de 50, 100 y 150 µl. Los resultados de inhibición del sobrenadante de sobre *Staphylococcus aureus* se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Halos de inhibición del sobrenadante de *L. gasseri* sobre *S. aureus*.

Método	Condición	Concentración y medida del halo		
		50 µl	100 µl	150 µl
Discos	Fil* (6)	2 mm	6 mm	8 mm
Método modificado	Fil (6 – 80°C)	2 mm	8 mm	6 mm
	Sin fil* (6)	8 mm	2 mm	6 mm
	Sin fil (6 – 80°C)	2 mm	2 mm	2 mm
Difusión en cilindro plástico	Fil (6)	2 mm	2 mm	2 mm
	Fil (6 – 80°C)	1 mm	1 mm	1 mm
	Sin fil (6)	1 mm	2 mm	3 mm

Sin fil (6 – 80°C)	1 mm	1 mm	1 mm
---------------------------	------	------	------

*Fil: Filtrado; Sin Fil: Sin filtrar.

Se observaron crecimientos de 2.4×10^8 , 1.3×10^{10} y 1.5×10^{10} UFC/150 μ L a concentraciones de 0.5, 1 y 3% de sales biliares; y 6.6×10^9 , 2.0×10^8 y 2.0×10^{11} UFC/150 μ L a concentraciones de 0.5, 1 y 3% de bilis bovina. Los resultados para producción de gas y reacción de catalasa fueron negativos. De igual manera, se encontraron crecimientos de 3×10^{11} UFC/150 μ L para todos los pH (2,5, 3,5 y 6) y valores mínimos de 2.4×10^8 y máximos de 3.0×10^{14} UFC/150 μ L a temperaturas de 38 y 45°C.

Los resultados para la cinética de fermentación de *L. gasseri* se pueden observar en la figura 1. Se encontró la fase exponencial al tiempo 4 (9:00 horas), con valores de 4.27, 1.16%, 2.15 mg/l y 0.73 mg/l para pH, ácido láctico, consumo de azúcar y consumo de proteína respectivamente. De igual manera, la información general de la cinética de fermentación se pueden observarse en la tabla 3.

Figura 2. Crecimiento (UFC/150 μ L) de *Lactobacillus gasseri* en medio MRS.

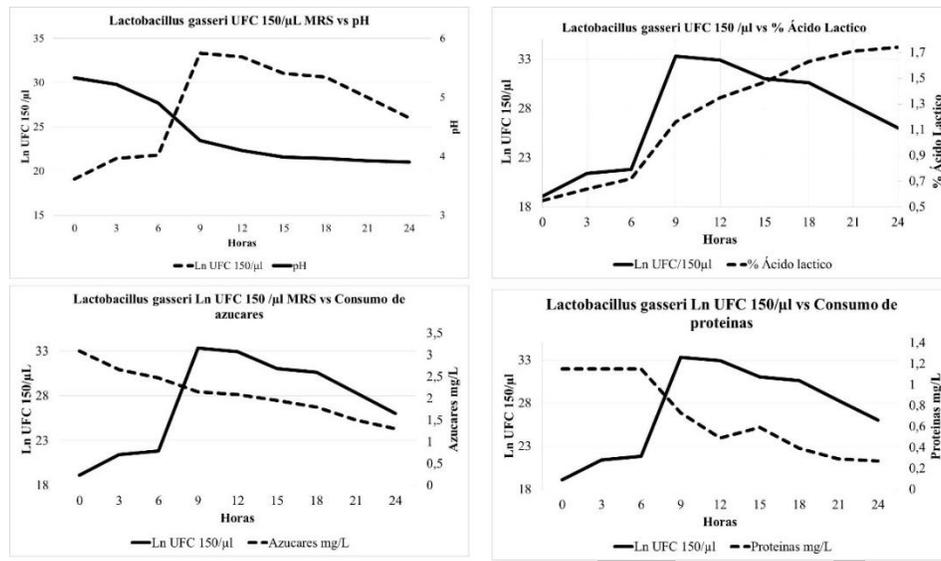
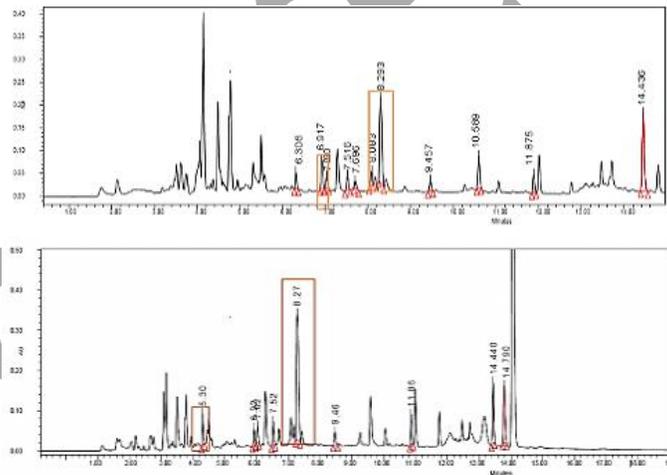


Figura 3. CROMATOGRAMAS DE AMINOACIDOS DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA LACTICA *Lactobacillus gasseri* y LA CEPA PATOGENA *Staphylococcus aureus*.



De acuerdo a la figura 3, se puede observar que el aminoácido que predomina porcentualmente en las muestras y que las relaciona, fue Tirosina con 32,3% para *L. gasseri* y 41,0% para *S. aureus*, siendo en *L. gasseri* el segundo aminoácido predominante Serina, con una cantidad relativa porcentual de 8,4%, por su parte *S.aureus* presentó un segundo aminoácido correspondiente a Arginina, cuya cantidad relativa porcentual fue de 5,2%.

Tabla 3. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de *Lactobacillus gasseri* en el medio MRS.

CEPA BACTERIANA	MEDIO
<i>Lactobacillus gasseri</i>	MRS
Fase de latencia	0
Velocidad específica de crecimiento (μ h ⁻¹)	0,483
Fin fase logarítmica (horas)	9:00
Tiempo de duplicación celular (minutos)	28,96
Incremento celular fin fase logarítmica	3,0E+11
Incremento celular total	2,0E+10
% azúcares consumidos fin fase logarítmica (g/L)	32,36
% azúcares consumidos totales (g/L)	57,93
% proteína consumida fin fase logarítmica (g/L)	76,52
% proteína consumida total (g/L)	85,22
R ² fin fase logarítmica	0,7578

Los resultados para HPLC-DAD de *L. gasseri* encontraron el péptido VAL-TIR-VAL con una concentración de 0.70 mg/ml, 11.70 g/l de ácido láctico y el aminoácido tirosina, y en *S. aureus* el aminoácido tirosina.

DISCUSIÓN.

Los resultados frente a los antibióticos muestran la importancia del manejo adecuado de estos en el control de los microorganismos patógenos. Al respecto Charteris *et al.* (1998) y Coppola *et al.* (2005) indican que estas bacterias parecen ser resistentes a la mayoría de los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos, tales como enoxacina, pefloxacina, norfloxacino, ácido nalidíxico, trimetoprim y metronidazol, coincidiendo con los resultados encontrados en este trabajo. En este sentido, la susceptibilidad reportada muestra que *L. gasseri*, es una cepa potencialmente segura. Para el caso de *S. aureus*, Cavelleri *et al.* (2009) reporta resultados similares en cuanto a la susceptibilidad a la Gentamicina a pesar de que este antibiótico no es reportado en forma rutinaria, porque los aminoglucósidos no se consideran agentes de primera línea contra

Revista FMVZ-UN
vol. 63 nro. 3 septiembre - diciembre 2016

estafilococos; Así como también del antibiótico Trimethoprim-sulfametoxazol. Lo anterior demuestra que el manejo de las cepas patógenas es vital para no crear resistencia a los antibióticos utilizados (Torres *et al.* 2012); Sin embargo, se debe tener en cuenta que algunas resistencias no son transmisibles, y que para su determinación se debe realizar otro tipo de pruebas que no fueron realizadas en esta investigación (Alos, 2015).

Los resultados de inhibición muestran un efecto alto de la BAL. Lo que indica que existe una importante producción de sustancias inhibitorias, entre las que se encuentran la producción de ácidos orgánicos, peróxidos de hidrogeno, bacteriocinas, entre otras. Esto permite la creación de un ambiente poco favorable para el crecimiento de la bacteria patógena, beneficiando la colonización de la cepa láctica (Fernández *et al.* 2013).

El crecimiento bajo las diferentes condiciones de sales biliares, bilis bovina, pH y temperatura demuestran que la cepa está en condiciones para resistir a muchos de los ambientes presentes en el tracto digestivo de animales; lo que es importante para considerar esta cepa como probiótica. Esto permite garantizar la colonización de diferentes regiones del tracto gastrointestinal y de esta manera expresar sus capacidades de inhibición contra otros microorganismo (Yanagibashi *et al.* 2009, Harata *et al.* 2009).

Los valores de la cinética de fermentación corroboran algunos de los aspectos encontrados en la inhibición de la cepa, ya que las condiciones de crecimiento en el medio MRS fueron adecuadas, el uso de los nutrientes le permitió este crecimiento y al parecer generó compuestos necesarios

para la inhibición de la bacteria patógena, como bacteriocinas, reducción del pH y producción de ácidos orgánicos (Orozco y Solarte 2003).

Los resultados del HPLC-DAD muestran una adecuada concentración de ácido láctico (Walder *et al.* 2007); en este sentido, el péptido encontrado es posible esté relacionado con las bacteriocinas de *L. gasseri*, tentativamente ligada a la gassericin A, en este mismo contexto los aminoácidos encontrados siguen el mismo fundamento, tales como serina y tirosina predominantemente.

Se concluye que los ensayos de inhibición *in vitro*, demostraron que *L. gasseri* pueden inhibir a *S. aureus*, por acción de las bacterias y de su sobrenadante. Además, resiste a diferentes condiciones gastrointestinales *in vitro* por lo que puede ser propuesta para su evaluación *in vivo*, debido a la capacidad de resistir múltiples condiciones fisiológicas del tracto gastro intestinal, así como también en la capacidad de crecer en ambientes difíciles, de esta manera partiendo que *S.aureus* en uno de los principales causales de la mastitis subclínica que afecta a las producciones, es fundamental el resultado significativo de inhibición que tuvo sobre este patógeno, finalmente este hecho representa un factor importante sobre el control de microorganismos patógenos responsables de toxiinfecciones alimentarias, por lo que la aplicación de las BAL es un punto importante en la industria alimentaria.

Bibliografía

Bauer, A. W., Kirby, W. M, Sherris, J. C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45, 493.

Revista FMVZ-UN
vol. 63 nro. 3 septiembre - diciembre 2016

- Belkacem-Hanfi, N., Fhoula, I., Semmar, N., Guesmi, A., Perraud-Gaime, I., Ouzari, H., Boudabous, A. y Roussos, S. (2014). Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxina isolated from stored wheat. *Biological Control*, 76, 52-59.
- Cai Y, Benno Y, Nakase T, Oh T. 1998. Specific probiotic characterization of Weissellahellenica DS-12 isolated from flounder intestine. *J Gen Appl Microbiol*. 44: 311-316.
- Cai Y, Suyanandana P, Saman P, Benno Y. 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J Gen Appl Microbiol*. 45: 177-184
- Cavelieri SJ. 2009. Gram-Positive Organisms, Staphylococci. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. Washington, DC. American Society for Microbiology. 690 p.
- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins K. 1988 Antibiotic Susceptibility of Potential Probiotic *Lactobacillus* Species. *J. Food Protect*. 61: 1636-1643.
- Coppola R, Succi M, Tremonte P. et al. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*. 85: 193-204.
- Crueger W, Crueger A. 1993. *Biotechnology: Manual de Microbiología Industrial*. 3 ed. España: Ed. Acribia. 220 p.
- Dahl T, Midden W, Hartman P. 1989. Comparison of Killing of Gram-negative and Gram-positive Bacteria by Pure Singlet Oxygen. *J Bacteriol*. 171: 2188-2194.
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem*. 28: 350-356.
- Estrada A, Gutiérrez L, Montoya O. 2005. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*. 58: 2601-2609.

Revista FMVZ-UN
vol. 63 nro. 3 septiembre - diciembre 2016

- Gerard J, Tortora T, Berdell R, Funke L. 2007. Introducción a la Microbiología, Ed. Médica Panamericana. 1200 p.
- Harata G, He F, Kawase M, Hosono A, Takahashi K, *et al.* 2009. Differentiated implication of *Lactobacillus* GG and *L. gasseri* TMC0356 to immune responses of murine Peyer's patch. *Microbiol Immunol.* 53: 475–480.
- Jurado-Gómez H, Calpa-Yama F, Chaspuengal-Tulcán A. 2014. Determinación *in vitro* de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot.* 61: 241-257.
- Jurado-Gómez H, Gúzman-Insuasty M, Jarrín-Jarrín V. 2015. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus lactis* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 62: 40-56.(a)
- Jurado-Gómez H, Martínez-Benavides J, Paz C. Caracterización del proceso de fermentación y del efecto de inhibición de *Lactobacillus lactis* en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *Rev Med Vet.* 2015 ;(30):15-29.(b)
- Lanara, laboratorio de referencia animal. 1981. Métodos analíticos oficiales para control de productos de origen animal e seus ingredients. Ii- Métodos físico e químicos. Mel. Ministério da Agricultura. Brasilia. 2 (25): 1-15.
- López J, Ochoa A, Santoyo G, Anaya J, Medina E, Martínez M, Loeza P. 2008. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 39: 49-57.
- Lowry O, Rosebroug N, Far A, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biological. Chemistry.* 193: 265-75.

Revista FMVZ-UN
vol. 63 nro. 3 septiembre - diciembre 2016

- Nawrotek P, Borkowski J. The characteristics of staphylococcal enterotoxins produced by strains isolated from mastitic cows, including epidemiological aspects. *Przegląd epidemiologiczny*. 2005;59(4):891.
- Orozco-Murillo MP, Solarte JA. 2003. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. [Tesis Doctoral]. [Manizales, Colombia] Universidad Nacional de Colombia.
- Selle K, Klaenhammer TR. 2013. Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. *FEMS microbiology reviews*. 37: 915-935.
- Tagg J, Mcgiven A. 1971. Assay system for Bacteriocins. *Appl. Environ. Microb.* 21: 943.
- Torres C. 2012. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Academia de Farmacia "Reino de Aragón", Cometa, S.A. Ctra. Castellón, Km. 3,400 – 50013
- Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, Tsuda M, Hachimura S, et al. 2009. Bacteroides induce higher IgA production than Lactobacillus by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in B cells in murine Peyer's patches. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73: 372–377.