

DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO *IN VITRO* DE *Lactobacillus gasseri* SOBRE UNA CEPA DE *Staphylococcus epidermidis*

Henry Jurado Gámez¹
Catalina Fajardo Argoti²

RESUMEN

Debido a las propiedades probióticas características de las bacterias ácido lácticas, tales como generar compuestos derivados de su fermentación capaces de inhibir múltiples organismos patógenos, hasta crear un ambiente desfavorable para los mismos y finalmente ser usadas como alternativas al uso de medicamentos para tratar y prevenir diversas patologías, en el presente estudio, se buscó evaluar las características probióticas de *L. gasseri* sobre *S. epidermidis* en condiciones *in vitro*. Se determinó la susceptibilidad de las dos cepas a diferentes antibióticos; el efecto de inhibición de *L. gasseri* y su sobrenadante sobre *S. epidermidis*; crecimiento de la cepa láctica a diferentes pH, temperatura, 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; finalmente mediante HPLC-DAD para *L. gasseri* se determinó péptidos

y ácido láctico, y en el caso de aminoácidos en el sobrenadante se determinó para las dos cepas mediante HPLC-PDA. Se encontró resistencia de ambas cepas a los antibióticos gentamicina y dicloxacilina. La cepa láctica y el sobrenadante inhibieron el crecimiento de *S. epidermidis*. El crecimiento fue adecuado para las diferentes variables con valores entre $1,8 \times 10^9$ a $3,0 \times 10^{12}$ UFC/150 μ l. Se observó la fase exponencial a las 12 horas con un valor de 3×10^{11} UFC/150 μ l, con valores de 4,296, 1,26%, 2,032 mg/l y 0,65 mg/l para pH, ácido láctico, consumo de azúcar y consumo de proteína respectivamente. Por último, se identificaron en el sobrenadante de *L. gasseri* mediante HPLC-DAD el péptido VAL-TIR-VAL con un valor de 0,73 mg/ml, 11,70 g/l de ácido láctico. Los resultados demuestran que *Lactobacillus gasseri* posee características probióticas sobre *S. epidermidis* en condiciones *in vitro*.

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

¹ Ph.D en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia - Grupo de Investigación Fise-Probiotec. Pasto, Colombia. E-mail: henryjugam@gmail.com

² Zootecnista. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Programa de Zootecnia- Grupo de Investigación Fise-Probiotec, Pasto, Colombia. E-mail: ivicaf2246@gmail.com

DETERMINATION OF THE PROBIOTIC *IN VITRO* EFFECT OF *Lactobacillus gasseri* ON A *Staphylococcus epidermidis* STRAIN

ABSTRACT

Due to the characteristic probiotic properties of lactic acid bacteria such as the generation of compounds derived from fermentation, which can inhibit multiple pathogenic organisms to create an unfavorable environment for them and finally to be used as an alternative to the use of drugs to treat and prevent various diseases. The present study sought to assess probiotic characteristics of *L. gasseri* on *S. epidermidis* under *in vitro* conditions. The susceptibility of both strains to different antibiotics, the inhibitory effect of *L. gasseri* and supernatant on *S. epidermidis*, and the growth of the lactic strain at different pH, temperature, bile salts and bovine bile were determined. The fermentation kinetics was established, and the count of viable microorganisms in plaque, pH, sugar

consumption, consumption of protein and percentage of lactic acid was defined. Finally, peptides and lactic acid were determined using HPLC-DAD for *L. gasseri*, and in the case of amino acids in the supernatant, these were determined with HPLC-PDA for the two strains. The resistance of both strains to the antibiotics gentamicin and dicloxacillin was found. The lactic strain and the supernatant inhibited the growth of *S. epidermidis*. The growth was suitable for the different variables with values between 1.8×10^9 and 3.0×10^{12} CFU/150 μ l. The exponential phase was observed at 12 hours with a value of 3×10^{11} CFU/150 μ l, with values of 4.296, 1.26%, 2.032 mg/l and 0.65 mg/l for pH, lactic acid, sugar consumption and protein consumption, respectively. Finally, the peptide VAL-TIR-VAL with a value of 0.73 mg/ml, 11.7 g/l of lactic acid, and the amino acid tyrosine were identified in the supernatant of *L. gasseri* by HPLC-DAD. The results show that *Lactobacillus gasseri* have probiotic characteristics on *S. epidermidis* under *in vitro* conditions.

Key words: Lactic bacteria, inhibition, pathogenic strain, probiotic.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido-lácticas se ubican en la familia *Lactobacillaceae*, la cual se caracteriza porque sus miembros pueden ser bacilos largos o cortos, aunque también cocos que se dividen como los bacilos, solamente en un plano, produciendo cadenas o tétradas de forma ocasional y filamentos, falsamente llamados ramificados (1). Las bacterias ácido lácticas (BAL) son conocidas por exhibir múltiples efectos en el huésped, entre los cuales están: el mantenimiento de la homeostasis intestinal, la regulación del sistema inmune, reducción de los síntomas alérgicos, la prevención de las infecciones bacterianas y virales, y el alivio de los síntomas de enfermedades infecciosas (2). Las bacterias lácticas producen un sinnúmero de sustancias capaces de inhibir el crecimiento

de microorganismos patógenos, entre ellos ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como mecanismo de protección frente al oxígeno, mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasas. En este sentido, *L. gasseri* es un microorganismo Gram-positivo intestinal autóctono que constituye la mayor parte de las especies de *Lactobacillus* homofermentativas que ocupan el tracto gastrointestinal humano, con una sobresaliente producción de ácido láctico, péptidos antibacterianos, a saber, bacteriocinas (3) y es responsable de la inducción de producción de IgA en el intestino, un factor importante en la prevención de la invasión dañina de microorganismos y toxinas a través de las células epiteliales en el intestino delgado, el sitio inicial de la adhesión y la infección de patógenos en el intestino (4).

Por su parte, *Staphylococcus epidermidis* es un microorganismo oportunista que se encuentra frecuentemente en el medio ambiente, en la piel sana del pezón y mucosas, ocasionando solo en situaciones de debilidad del huésped, casos de patogenicidad. No produce toxinas, no produce coagulasa, no fermenta el manitol, y no forma el pigmento amarillo. A su vez es reconocido por causar infecciones nosocomiales. Desde el punto de vista pecuario, aunque por lo general las infecciones mamarias por *S. epidermidis* suelen ser leves o de tipo subclínico, se ha demostrado también que pueden causar procesos más graves y persistentes y provoca un aumento en el recuento de células somáticas y una disminución en la calidad y producción de la leche, debido al daño causado al tejido mamario (5, 6).

La presente investigación tuvo como objetivo el determinar, valorar e identificar los parámetros de la cinética de crecimiento de *Lactobacillus gasseri* y su efecto probiótico sobre *Staphylococcus epidermidis*.

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 (Colombia), ubicados en la ciudad de Pasto. Se utilizaron las cepas *Lactobacillus gasseri* ATCC® 19992 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228. La reconstitución de cada cepa se efectuó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la conservación de la cepa láctica se realizó un repique en medio sólido (agar MRS) y en medio líquido (caldo MRS) cada 5 y 8 días. Por su parte, para la cepa patógena se realizó un repique en medio líquido (caldo BHI) y en medio sólido (agar Mueller Hinton) cada 5 y 8 días. Se incubaron a 37°C por 24 horas, posteriormente se conservaron en refrigeración a 4°C. Bajo este lineamiento, la cepa láctica *L. gasseri* se cultivó teniendo en cuenta el siguiente procedimiento: se tomó en un Erlenmeyer 40 ml de caldo MRS y se depositó una cantidad

de la cepa, incubándose posterior a esto por 24 h a 37°C; una vez terminada la incubación, se tomaron 4 ml del incubado, y se depositaron en otros 40 ml de caldo MRS, finalmente se incubó en iguales condiciones. De acuerdo con la metodología propuesta por Crueger y Crueger (7) se realizó el ajuste del inóculo, el cual consiste en tomar 90 ml de caldo MRS y añadir 10 ml de inóculo teniendo en cuenta la regla. Terminada la incubación se realiza lectura de 1 ml mediante espectrofotometría (625 nm), una vez la población sea superior a la establecida, se adiciona caldo estéril según la propuesta de Guerrero ajustada por Jurado-Gámez et al. (8).

Se evaluó la susceptibilidad de *L. gasseri* y *S. epidermidis* a los siguientes antibióticos: penicilina (P 10 IU), ciprofloxacina (CIP 5 µg), gentamicina (CN 10 µg), ampicilina (AMP 10 µg), dicloxacilina (DCX 1 µg), y trimetropin sulfametoxazol (COT 25 µg) con el método de Kirby-Bauer (9). Para esta prueba se ajustaron las cepas a 0,5 en la escala de McFarland, posteriormente se sembró distribuyendo el contenido con ayuda de un hisopo estéril en cajas Petri con agar Mueller Hinton. Seguidamente, se tomaron los discos de antibióticos con una pinza estéril y se colocaron con una leve presión en el agar con el fin de lograr la adhesión de los mismos; finalmente se invirtieron las cajas Petri y se pasó a incubar a 37°C por 18 h. Una vez transcurrido este tiempo, se observó y midió el halo formado entre el borde del disco y el máximo de inhibición.

Se determinó el efecto de inhibición de *L. gasseri* sobre *S. epidermidis* mediante la metodología de Tagg y McGiven (10). Para esto se tomó una azada de *L. gasseri* ajustada a la escala de McFarland a 0,5 y se sembró en cajas Petri con agar MRS y azul de anilina, trabajándose en concentraciones de 75, 100 y 150 µl, a continuación se llevó a incubación a 37°C por 24 h; en este sentido, la cepa patógena se ajustó también a la escala de McFarland a 0,5, y se sembró en cajas Petri con agar Mueller Hinton. Por último, se pasó a tomar discos de agar MRS con la cepa láctica, y se depositaron

en las cajas incubadas con la cepa patógena, se llevó a incubación a 32°C por 12 horas. Una vez terminado el periodo de incubación, el tamaño del halo fue medido desde el borde del disco de agar hasta el extremo del halo producido por la inhibición de la cepa patógena, de tal manera que el halo fuera igual o superior a 2 mm (11). De igual manera, se determinó el efecto del sobrenadante de *L. gasseri* sobre el crecimiento de *S. epidermidis* bajo la metodología de Kirby Bauer modificada (9). Para tal efecto se obtuvo el sobrenadante de la cepa láctica *L. gasseri* ajustada a 4 (725 nm) en la escala de McFarland, dicho sobrenadante se depositó en tubos eppendorf con un contenido de 1,0 ml, para ser centrifugados a una temperatura de 4°C a 15.000 rpm durante 15 minutos, terminado el proceso de centrifugación se trabajó el sobrenadante de la siguiente manera: usando cilindros estériles de aproximadamente 6 mm de diámetro, en los cuales se depositaron concentraciones de 75, 100 y 150 µl, y mediante papel *pads*, sobre los cuales se depositaron las mismas concentraciones, en ambos casos se utilizó el sobrenadante sin filtrar y filtrado con membrana de 0,25 µm; los dos métodos de discos y cilindros fueron colocados con la cepa patógena y se incubaron a 37°C por 24 h.

Se evaluó el crecimiento de *L. gasseri* a concentraciones de 0,5, 2 y 3% de sales biliares bovinas, y 0,5, 2 y 3% de bilis bovina (12). Para ello se sembró la cepa láctica en caldo MRS por un periodo de 24 h, pasado este tiempo se inoculó nuevamente en caldo MRS con las concentraciones citadas de sales biliares y bilis bovina, posteriormente se sembró en agar MRS con azul de anilina y se incubó a 32°C por 48 h. Se determinó producción de gas por la metodología propuesta por Cai et al. (13) y la reacción de catalasa mediante la metodología de Dahl *et al.* (14). Se determinó el crecimiento de la cepa láctica a pH de 2,5, 3,0 y 6,5 durante 3 horas, con mediciones cada hora; la incubación se realizó en medio MRS comercial a 37°C por 48 horas, el ajuste del pH se realizó con ácido tartárico, con el fin de inhibir el efecto del ácido láctico. Se evaluó el crecimiento de *L. gasseri* a 38 y 45°C, según lo

establecido por Crueger y Crueger (7); 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 12:00 horas (fase exponencial). Enseguida se realizaron diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻¹² con agua peptonada, se sembraron en cajas de petri con azul de anilina y se inició en la dilución 10⁻⁶ 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 constante a 100 rpm. No se controló el pH por la resistencia de la cepa a bajos niveles. Se tomaron muestras y mediciones cada tres horas para determinar conteo de microorganismos viables en placa (UFC/mL), azúcar consumida, proteína consumida y ácido láctico.

Para determinar el conteo de microorganismos viables en placa se tomó 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada al 0,1% y se hicieron diluciones decimales; de las diluciones comprendidas entre 10⁻⁶ y 10⁻¹², se hizo la siembra en cajas de Petri con agar MRS y azul de anilina. Las cajas fueron incubadas a temperatura entre 37°C y fueron observadas entre las 24 y 48 horas, teniéndose en cuenta únicamente las cajas Petri con conteos entre 30 y 300 colonias, el número de colonias fue multiplicado por el inverso de la dilución y por 10 para obtener UFC/ 150 µL (15). Para determinar el pH se utilizó el potenciómetro digital (JENCO® VisionPlus). La determinación del consumo de azúcar se realizó por la metodología de Dubois et al. (16), la cual consistió en preparar diferentes concentraciones de glucosa para crear una curva patrón mediante los valores obtenidos de las muestras observadas a una densidad óptica de 625 nm. Los valores se graficaron contra la concentración en mg/l y finalmente se obtuvieron los valores de la línea

recta. El consumo de proteína fue determinado por la metodología de Lowry et al. (17), para esta determinación se realizó una curva de calibración mediante seroalbúmina bovina y se determinó la absorbancia en espectrofotómetro a 625 nm. Los valores obtenidos se graficaron contra la concentración para obtener la ecuación de la línea recta. La determinación de producción de ácido láctico se realizó por titulación de hidróxidos de sodio. La biomasa fue determinada por el método propuesto por Crueger y Crueger (7). Para ello se estableció la velocidad máxima de crecimiento mediante la siguiente ecuación:

$$v_{max} = \frac{dLnX}{dt}$$

Se tomó una muestra de sobrenadante de *L. gasseri* por HPLC-DAD (*high performance liquid chromatography* o cromatografía líquida de alta eficacia). Se determinó el contenido de péptidos y ácido láctico. La muestra para análisis se preparó de la siguiente forma: se cultivó la cepa en caldo MRS por 24 horas a temperatura entre 37°C, posteriormente se ajustó por espectrofotometría a una densidad óptica 1,00 en escala McFarland patrón 4, equivalente a una concentración de 1,2 x 10⁹ bacterias/ml. Luego, se transfirieron muestras en tubos eppendorf y se centrifugaron a 13.500 rpm durante 30 minutos a 4°C. Por último, el sobrenadante se filtró utilizando membranas PVDF de 0,2 µm; y para el caso de aminoácidos se determinó por HPLC-PDA; este último análisis también se realizó para *S. epidermidis*. Para esta determinación se cultivaron las cepas en caldo MRS y BHI respectivamente por 24 horas a temperatura entre 37°C, posteriormente se ajustó

por espectrofotometría a una densidad óptica 1,00 en escala McFarland patrón 4. Luego se transfirieron muestras en tubos eppendorf manteniéndolas a una temperatura de 4°C. Seguidamente se pasó por filtros de jeringa de PVDF, Pall de 0,25µm, 1,0 mL de muestra. Posteriormente se adicionó HCL 6N y se centrifugó por 15 minutos a 9000 rpm. La información fue recolectada y analizada en el programa Microsoft Excel 2013; sin embargo, las variables de cinética de fermentación, tales como UFC/150 µL sobre producción de ácido láctico y pH se evaluaron mediante un diseño de medidas repetidas en el tiempo con el paquete estadístico SPSS 19.

RESULTADOS

Los resultados de sensibilidad a los antibióticos se encuentran en la tabla 1 y figura 1(a). Se puede observar en los resultados que *L. gasseri* presentó resistencia a los antibióticos gentamicina y dicloxacilina y fue sensible a penicilina, ciprofloxacina, ampicilina y trimetropin sulfa-metoxasol. Por su parte, *Staphylococcus epidermidis* mostró resistencia a los antibióticos penicilina, gentamicina y dicloxacilina, y fue sensible a ciprofloxacina, ampicilina y trimetropin sulfa- metoxasol.

Los resultados observados en las pruebas de inhibición de *L. gasseri* y su sobrenadante, mostraron una eficaz acción sobre la cepa patógena *S. epidermidis*, en las concentraciones de 75, 100 y 150 µl, con halos de 8, 7 y 5 mm (Figura 1 (d)) y con halos de 5, 6 y 7 mm para su sobrenadante (Tabla 2, Figura 1 (b-c)).

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

Antibióticos	Halo (<i>L. gasseri</i>)	Nivel de Sensibilidad	Halo (<i>S. epidermidis</i>)	Nivel de Sensibilidad
p (10 iu)	12	S ^{ab}	-	R ^a
cip (5 µg)	23	S ^c	18	S ^{ac}
cn (10 µg)	-	R ^c	-	R ^{ac}
dcx (1 µg)	-	R ^a	-	R ^a
amp (10 µg)	20	S ^a	21	S ^a
cot (25 µg)	14	S ^{bc}	30	S ^{bcd}

p: penicilina; cip: ciprofloxacina; cn: gentamicina; dcx: dicloxacilina; amp: ampicilina; cot: trimetropin-sulfametaxasol; S: sensible; R: resistente; a: Manual para antibiograma LABORCLIM; b: Centro de control de productos para diagnósticos Ltda. CECON; c: Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana; d: Jurado et al. (2014).

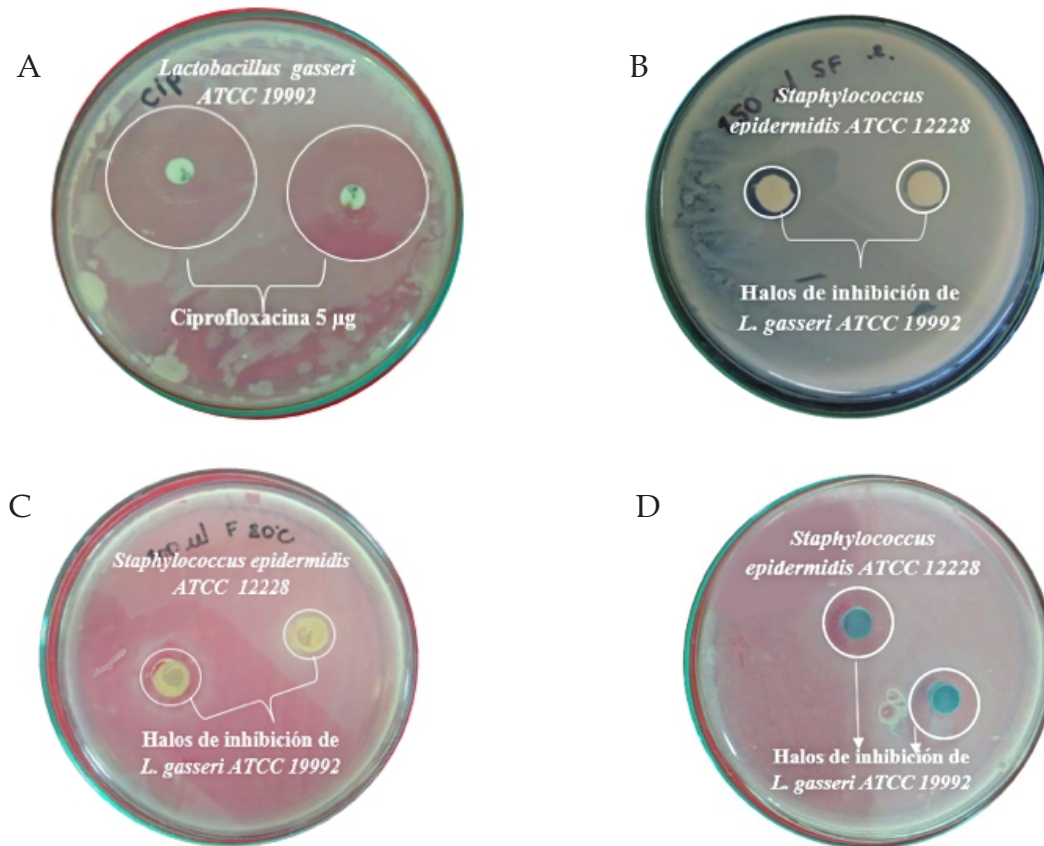


Figura 1. A. Halos de inhibición de antibiótico; B. Efecto del sobrenadante método discos modificado de *L. gasseri* sobre *S. epidermidis*; C. Efecto del sobrenadante método difusión en cilindro plástico de *L. gasseri* sobre *S. epidermidis*. D. Discos de agar impregnados de *Lactobacillus gasseri*.

Tabla 2. Halos de inhibición del sobrenadante de *Lactobacillus gasseri* frente a *Staphylococcus epidermidis*.

Método	Condición	Concentración y medida del halo		
		75 µl	100 µl	150 µl
Discos Método modificado	Fil* (6)	2 mm	6 mm	5 mm
	Fil (6 - 80°C)	2 mm	7 mm	6 mm
	Sin fil* (6)	7 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

En cuanto a la viabilidad y crecimiento de la cepa láctica, bajo condiciones como sales biliares y bilis bovina, se observaron crecimientos de $2,8 \times 10^6$, $1,2 \times 10^8$ y $1,7 \times 10^{12}$ UFC/150 μ L a concentraciones de 0,5, 2 y 3% de sales biliares; y $5,2 \times 10^8$, $2,5 \times 10^6$ y $1,9 \times 10^{12}$ UFC/150 μ L a concentraciones de 0,5, 2 y 3% de bilis bovina. En el caso de la prueba de catalasa y producción de gas, las dos fueron negativas.

Se evaluó la viabilidad de *L.gasseri* en diferentes temperaturas, la cual mostró crecimientos adecuados con valores mínimos de $2,8 \times 10^7$ y máximos de $3,0 \times 10^{12}$ UFC/150 μ L a temperaturas de 38 y 45°C.

Se determinó el crecimiento de la cepa láctica, en diferentes concentraciones de pH, en donde se encontraron crecimientos de $3,0 \times 10^{12}$ UFC/150 μ L para todos los pH de 2,5, 3,0 y 6,5. 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 5 y 6, mostrando un pH de 4,296 y 4,112 respectivamente (Tabla 3).

Los resultados de la cinética de fermentación, el pH, ácido láctico, el consumo de azúcar y proteína medidos durante el tiempo de fermentación se observan en la Figura 2 y en la tabla 4. El crecimiento de *L. gasseri* en medio MRS por 24 horas, se encontró la fase exponencial al tiempo 5 (12:00 horas), con valores de $3,0 \times 10^{11}$ UFC/150 μ . Con un consumo de azúcares por parte de *L. gasseri* de 2,032 mg/l, el consumo de proteínas de 0,65 mg/l en la fase exponencial. En la determinación de porcentaje de ácido láctico para *L. gasseri*, se presentaron valores iniciales y finales de 0,48- 1,71 (Tabla 5), en la tabla se observa el efecto de las UFC/150 μ L sobre el porcentaje de ácido láctico del medio de cultivo MRS, donde *L. gasseri* presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) en todos los tiempos destacándose mayor porcentaje de ácido láctico (1,71) al tiempo 9.

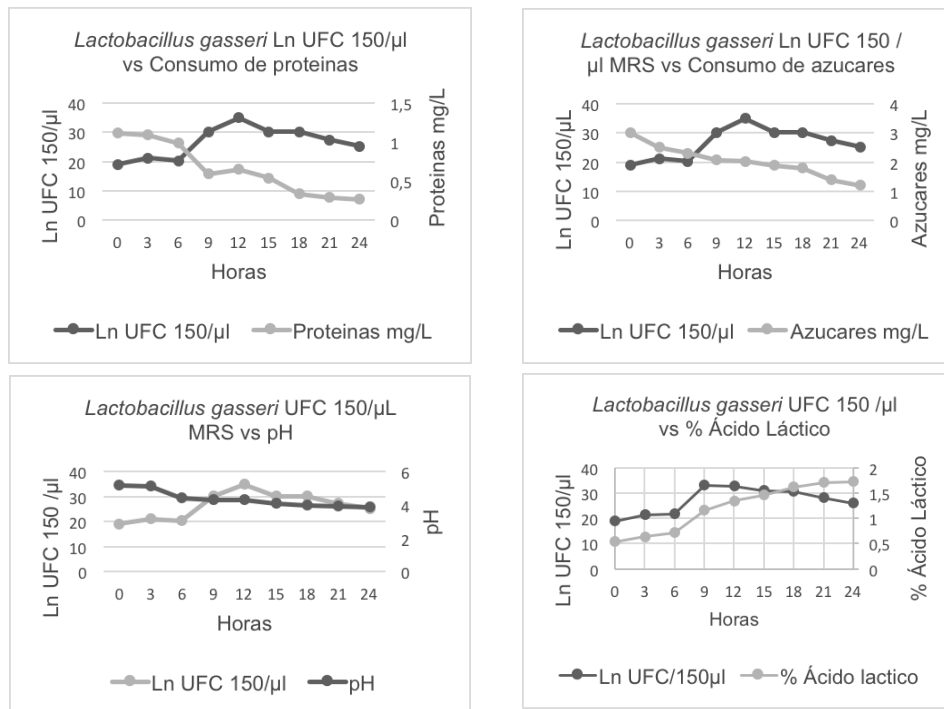


Figura 2. Crecimiento (UFC/150 μ L) de *Lactobacillus gasseri* en medio MRS

Tabla 3. Efecto de las unidades formadoras de colonia (UFC/150 μ L) sobre el pH del medio de cultivo *Lactobacillus gasseri*.

<i>Lactobacillus gasseri</i>									
TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MRS	5,21b	5,13b	4,42b	4.32b	4,296a	4,112a	3,989b	3,911b	3,89b

Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

Tabla 4. 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 ($\mu \text{ h}^{-1}$)	0,4618
Fin fase logarítmica (horas)	12:00
Tiempo de duplicación celular (minutos)	27,12
Incremento celular fin fase logarítmica	3,0E+11
Incremento celular total	2,5E+10
% azúcares consumidos fin fase logarítmica (g/L)	30,6
% azúcares consumidos totales (g/L)	55,83
% proteína consumida fin fase logarítmica (g/L)	74,32
% proteína consumida total (g/L)	83,12
R ² fin fase logarítmica	0,835

Tabla 5. Efecto de las unidades formadoras de colonia (UFC/150 μ L) sobre el porcentaje de ácido láctico del medio de cultivo *Lactobacillus gasseri*.

<i>Lactobacillus gasseri</i>									
TIEMPO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MRS	0,48h	0,612g	0,68f	1,07e	1,26d	1,36c	1,626c	1,702b	1,71a

Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

El análisis del sobrenadante de *L. gasseri* por HPLC mostró una cadena de péptidos VAL-TIR-VAL en el tiempo 11,98 con una concentración de 0,73 mg/ml de muestra (tabla 6 y figura 3). En cuanto a los resultados de la identificación de aminoácidos del sobrenadante de la cepa láctica y la cepa patógena, en las tablas 7 y 8 y figuras 4 y 5, se puede observar que para *L. gasseri* el

aminoácido que predominó porcentualmente fue Tirosina, 32,3%, y para *S. epidermidis* fue Arginina, 5,7%; siendo en *L. gasseri* el segundo aminoácido predominante Serina, con una cantidad relativa porcentual de 8,4%; por su parte, *S. epidermidis* presentó un segundo aminoácido correspondiente a Glicina, cuya cantidad relativa porcentual fue de 3,6%.

Tabla 6. Identificación de péptidos muestras de *L.gasseri*.

	IDENTIFICACIÓN	CONCENTRACIÓN mg/mL
1	VAL-TIR-VAL	0,73
2	VAL-TIR-VAL	0,73

Tabla 7. Identificación de aminoácidos de *L. gasseri*.

Nº	Aminoácidos	Tiempo de retención	Porcentaje cantidad relativa %
1	Tirosina	8.293	32,3
2	Serina	6.917	8,4

Tabla 8. Identificación de aminoácidos de *S. epidermidis*.

Nº	Aminoácidos	Tiempo de retención	Porcentaje cantidad relativa %
1	Arginina	7.521	5,7
2	Glicina	7.029	3,6

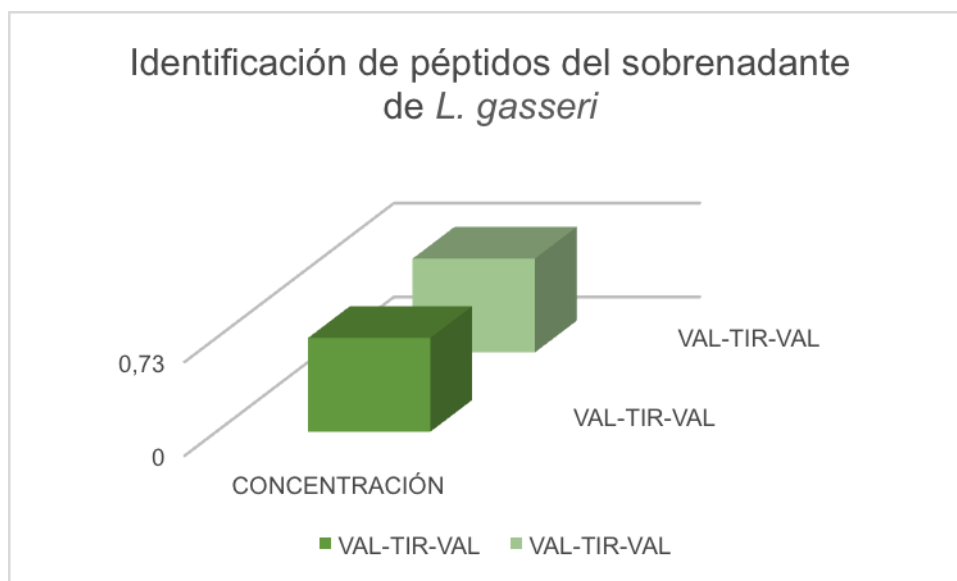


Figura 3. Identificación de péptidos del sobrenadante de *L. gasseri*.

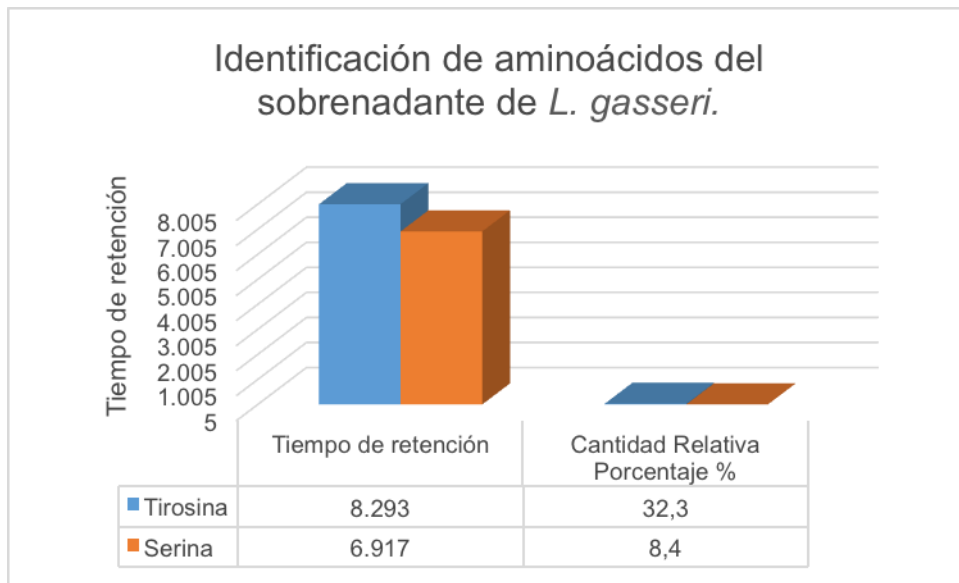


Figura 4. Identificación de aminoácidos del sobrenadante de *L. gasseri*.

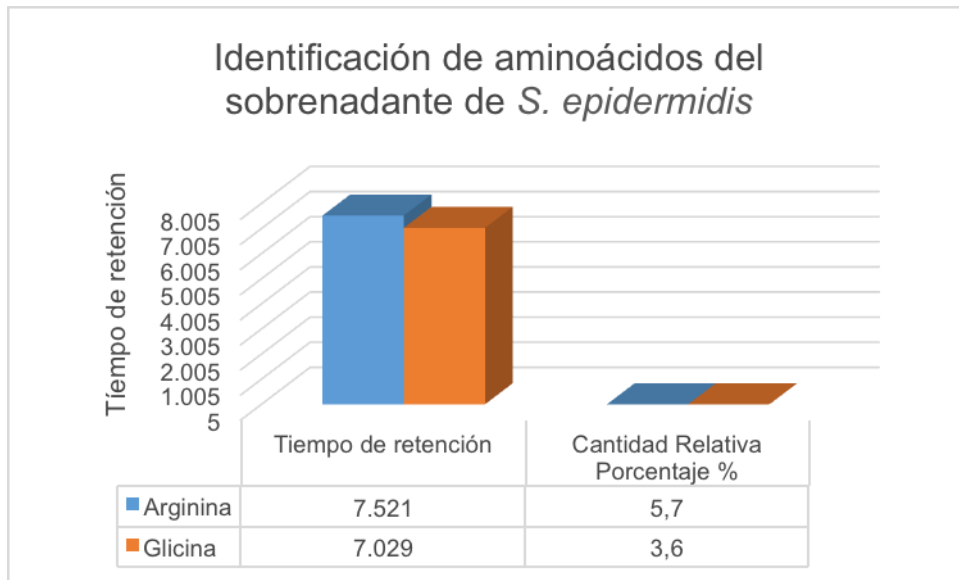


Figura 5. Identificación de aminoácidos del sobrenadante de *S. epidermidis*.

DISCUSIÓN

Para determinar la capacidad de las BAL, es importante que estén sujetas a diversas condiciones, presentes de manera natural en el animal, en este sentido, evaluando su viabilidad en diferentes ambientes presentes en el tracto gastrointestinal de los mismos. Para el caso de la prueba de antibióticos, Teuber et al. (18) manifiesta que, tanto las metodologías como los perfiles de susceptibilidad/resistencia a antibióticos están muy establecidas para la mayoría de los microorganismos patógenos, el mismo autor continúa afirmando que menor atención, sin embargo, se ha dedicado a otros grupos bacterianos, entre los que se pueden contar las bacterias lácticas. En este sentido, un parámetro importante a tener en cuenta son los criterios de resistencia de la cepa trabajada, debido a que la resistencia a antibióticos representa un peligro potencial cuando se encuentra en los microorganismos comensales o beneficiosos, ya que estos pudieran convertirse en reservorios desde dónde los determinantes podrían transferirse a los microorganismos oportunistas y a los patógenos (19). En general, según lo reportan Hambleton et al. (20), los *Lactobacillus* son sensibles a penicilina G, ampicilina, cefalosporinas y clindamicina. Dicho resultado muestra coincidencia con lo arrojado por la cepa láctica en estudio en cuanto sensibilidad a ampicilina y penicilina; por su parte, Zhou et al. (21), respecto al grupo de antimicrobianos inhibidores de la síntesis proteica, afirma que los *Lactobacillus* suelen ser más resistentes a los aminoglicósidos (kanamicina, gentamicina, neomicina y estreptomina), que en contraste con la cepa láctica *L. gasseri*, muestra perfiles de resistencia coincidentes al antibiótico gentamicina. En cuanto a los perfiles de la cepa patógena *S. epidermidis*, al respecto Benavides-Plascencia et al. (22), encontraron en su estudio perfiles de resistencia y sensibilidad de diferentes cepas patógenas, entre ellas del género *Staphylococcus*, el cual presentó coincidencia en cuanto a perfiles de sensibilidad con algunos antibióticos

trabajados, como ampicilina y trimetropin-sulfametoxazol. Por otra parte, Jurado-Gómez et al. (8) encontraron perfiles de resistencia a la Dicloxacilina, similar al resultado reportado por la cepa patógena. Según Maranan et al. (23), el fenómeno biológico de la resistencia depende de la aparición y conservación de los genes de resistencia, como elementos génicos cromosómicos y extra cromosómicos.

En las pruebas de inhibición, dicha acción observada, puede estar relacionada a la capacidad de la cepa láctica de producir sustancias antimicrobianas, tales como ácidos orgánicos como el láctico y acético, diacetilo, reuterina y sustancias importantes de naturaleza proteica como las bacteriocinas (24). Lo anterior hace posible crear un medio ideal para su colonización y establecimiento intestinal, y de esta manera cumplir con su acción inhibitoria. (25). Un punto importante a mencionar, según Feria et al. (26), es que la producción de bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida. En lo que respecta a la cepa *L. gasseri* en estudio, mostró halos de inhibición significativos en las concentraciones de 100 y 150 μ l, tanto en la cepa láctica como en su sobrenadante evaluado mediante los métodos de discos método modificado y difusión en cilindro plástico respectivamente; dichos resultados son coincidentes con los obtenidos por Jurado-Gómez et al. (27), donde la cepa láctica mostró efectividad en el control de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. agalactiae*; en este sentido las BAL son conocidas por producir, durante su crecimiento, sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Esta característica se utiliza para la destrucción de bacterias indeseables o patógenas en la fabricación de los alimentos. La mayor parte de estos compuestos no están caracterizados ni en cuanto a su naturaleza bioquímica ni en cuanto a su mecanismo de acción. Con frecuencia incluso, los productos activos no son más que metabolitos excretados por la bacteria como el ácido láctico

o derivados del metabolismo del oxígeno como el H_2O_2 (28). Lo anterior permite inferir que la bacteria es un buen competidor contra las bacterias patógenas susceptibles, presentándose como una alternativa para el manejo de mastitis ocasionada por estos microorganismos.

En las pruebas de viabilidad y crecimiento en sales biliares y bilis, *L. gasseri* mostró resistencia y crecimiento en todas las concentraciones propuestas; en efecto, lo anterior puede atribuirse a la capacidad de las BAL de soportar las diferentes condiciones que se presentan a lo largo del tracto gastrointestinal, y que en cierta manera, hacen posible su adaptación y respuesta favorable para el huésped; así, Urbanska et al. (29) encontró en su estudio resistencia por parte de las BAL a una concentración de 0,3% de sales biliares, resultado pertinente al presente estudio. Por su parte Ávila et al. (30) revelaron buenos crecimientos de cepas de *Lactobacillus* aislados del tracto intestinal de animales de granja en presencia de sales biliares al 0,15%; así mismo, Del Piano et al. (31) señalan que los probióticos deben ser capaces de sobrevivir el pasaje a través del estómago y el intestino delgado y estar presentes en suficiente cantidad para impactar el micro medio ambiente del colon, de modo que ellos deben tolerar las condiciones ácidas y ricas en proteasas del estómago y sobrevivir y crecer en presencia de ácido y sales biliares.

La prueba de catalasa de la cepa fue negativa, característica general del género *Lactobacillus*, y concuerda con De Roissart y Luquet (32), quienes describen que las cepas lácticas carecen de la enzima. Según Prescott et al. (33), la enzima catalasa degrada el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y para poder hacerlo requiere de un grupo porfirínico (citócromo), mismo que las BAL no pueden sintetizar; por tal motivo, las BAL no poseen catalasa y esto permite identificarlas como catalasa negativas, lo cual confirma la negatividad del resultado. Los resultados de la producción de gas para *L. gasseri* fueron negativos, constituyendo una importante característica probiótica de las

bacterias lácticas utilizadas en la alimentación animal y que pueden evitar que el animal presente enfermedades como el meteorismo o timpanismo, del mismo modo cuando se utilizan cultivos iniciadores para producir embutidos crudo-curados, los cultivos no deben alterar las propiedades organolépticas del producto, como lo menciona Klingberg et al. (34), ni generar gases o producir ácido acético, como lo hacen las BAL heterofermentativas, porque ocasionan alteraciones organolépticas.

La temperatura es un factor tan importante en el crecimiento microbiano que incluso se ha tomado como parámetro de clasificación de microorganismos. En este sentido, se evaluó la viabilidad de *L. gasseri* en diferentes temperaturas, en las cuales logró completar su crecimiento. Al respecto, Mora y García (35) mencionan que los *Lactobacillus* pueden desarrollarse con límites de temperatura que oscilan entre 2 y 53°C, siendo su rango óptimo de crecimiento entre 30 a 40°C; lo anterior constituye una característica de gran importancia en la bacteria láctica trabajada, ya que permite que esta crezca a diferentes niveles de temperatura, lo que es un significativo beneficio en la aplicación de alimentos, así como también en el establecimiento de la misma en el huésped.

Con respecto a la viabilidad a diferentes concentraciones de pH (2,5, 3,0 y 6,5), a pesar de que fue viable la cepa láctica en todas las concentraciones propuestas, un resultado interesante fue el crecimiento de *L. gasseri* en la concentración de 2,5, debido a que la mayoría de microorganismos tienen una limitada capacidad de desarrollo en pH debajo de 3,0, aun así la cepa láctica en estudio demostró viabilidad a esta concentración. En relación, Jin et al. (36) afirman que los *Lactobacillus* son en general mucho más resistentes a la acidez que las bifidobacterias, teniendo los primeros un crecimiento moderado a pH 3,0 y relativamente bueno a pH 4,0. Igualmente, Ronka et al. (37) sostienen que los *Lactobacillus* son considerados intrínsecamente

resistentes al ácido. Aunque existen diferencias entre las especies y cepas de microorganismos, generalmente presentan una mayor sensibilidad a los valores de pH por debajo de 3,0. Por su parte, Corcoran et al. (38) señalan que la tolerancia a un medio ácido es reconocida como una de las propiedades deseables utilizados para seleccionar potencialmente cepas probióticas. Esta resistencia a pH bajos por parte de *L. gasseri*, no es solamente significativa por su aplicabilidad, sino que también representa un papel importante en el control de agentes patógenos, ya que favorece la inhibición de los mismos a lo largo del tracto intestinal, favoreciendo los sitios de adhesión de los microorganismos lácticos.

El valor obtenido durante la fase exponencial muestra que la cepa láctica posee características adecuadas de crecimiento en el medio MRS, además, el nivel de crecimiento es bueno para una posible producción de inóculos con miras a la obtención de probióticos, de acuerdo con ensayos reportados por Pérez-Luyo (39). Los resultados obtenidos a las 12 horas indican que la cepa alcanza niveles de crecimiento adecuados para colonizar la mucosa intestinal. En cuanto al consumo de azúcares por parte de *L. gasseri*, obtuvo un valor de 2,032 mg/l, lo cual permite inferir que la bacteria presentó un correcto aprovechamiento de los hidratos de carbono aportados por el medio MRS. Referente a lo anterior, Dellaglio et al. (40) señalan que algunos *Lactobacillus* permiten el empleo de una gran cantidad de fuentes de carbono, propiedad que resulta de un buen número de genes involucrados en el transporte y utilización del azúcar, este hecho va de la mano a lo encontrado en parámetro pH. Los valores encontrados indican que hay variación sin una tendencia evidente; así pues, se cree que puede existir una relación entre la fermentación de azúcares y el pH, debido a que durante la fermentación los ácidos orgánicos resultantes se acumulan y se produce un gradual descenso del pH. El bajo pH (menor a 4,5-5,0) combinado con la alta concentración de ácidos

orgánicos, principalmente ácido láctico, inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y de la mayoría de los microorganismos que alteran el producto. De esta forma, además de lograr que el producto sea seguro desde el punto de vista microbiológico, se extiende su tiempo de vida útil. Se determinó el consumo de proteínas cuyo valor fue de 0,65 mg/l en la fase exponencial, este consumo no muestra la tendencia como la que marca el consumo de azúcar, que es definida. Esta característica puede explicarse por la acción simultánea de la actividad proteolítica de la BAL y el consumo de proteínas. Jurado-Gámez et al. (41), encontraron un valor de proteína de 0,13 mg/L en medio MRS durante la fase exponencial para *Lactobacillus gasseri*, este valor difiere al reportado por *L. gasseri* en el presente, con un valor de 0,65 mg/L, característica importante en la observación del consumo de proteínas de la BAL.

En la determinación de porcentaje de ácido láctico, siguiendo los resultados por parte de Mishra y Lambert (42), la determinación de producción de ácidos orgánicos mostró que la cepa láctica es homofermentativa, dado que se encontró un porcentaje superior al 80% de ácido láctico en la muestra analizada. Este es un importante factor a tener en cuenta, debido a que el ácido láctico es el ácido con mayor poder de inhibición reportado en la literatura. Por su parte, González et al. (43) y Foo et al. (44) agregan que, debido al gran número de bacterias lácticas, sólo son de interés los géneros altamente productores de ácido láctico. Para la producción industrial de ácido láctico son de mayor importancia las bacterias lácticas homofermentativas, aquellas que sólo producen ácido láctico. Lo anterior resulta fundamental desde el contexto biotecnológico, ya que la cepa láctica en estudio mostró un comportamiento asociado a una importante producción del mismo, reportando un valor de 11,70g/L.

Con respecto los péptidos y aminoácidos encontrados de la cepa láctica, pueden estar relacionados a sustancias antimicrobianas. En

este sentido, Leblanc et al. (45) señala que la capacidad proteolítica de las BAL juega un papel muy importante durante la fermentación de la leche, principalmente en el fraccionamiento de proteínas a péptidos y aminoácidos libres; algunos de estos péptidos presentan actividad biológica por lo que son considerados péptidos bioactivos. Siguiendo el concepto de péptidos bioactivos, es importante introducir la posible relación de los aminoácidos encontrados en el presente estudio, con la bacteriocina que produce la bacteria láctica, *L. gasseri*, conocida como gassericin A, así como también en casos aislados gassericin T y K7 (46). Por consiguiente, autores como Trabi y Craik (47); Rivas y Andreu (48); Maqueda et al. (49) y Montalbán-López et al. (50), han reportado que la composición aminoacídica de las diferentes bacteriocinas producidas, en especial por una bacteria ácido láctica, en este caso *L. gasseri*, pueden estar relacionadas al comportamiento antibacteriano de la misma; tal como lo reportan y afirman que esta bacteriocina es circular, constituida por ciclos continuos de uniones peptídicas, y por tanto, es una modificación que estabiliza su conformación nativa e incrementa la resistencia a la proteólisis. Así mismo, Sivonen et al. (51) señalan que la mayor parte de las proteínas circulares producidas por microorganismos

son moléculas con actividad antimicrobiana (bacteriocinas, cianobactinas), caracterizadas por abundancia de aminoácidos hidrófobos y sin carga. Finalmente, es posible concluir que por lo mencionado, un punto importante es el contraste realizado de la cantidad relativa porcentual de la cepa láctica *Lactobacillus gasseri* y la cepa patógena *Staphylococcus epidermidis*, ya que mediante la composición aminoacídica del sobrenadante de la cepa láctica, es posible predecir el modo de acción de la misma sobre *Staphylococcus epidermidis*.

Se concluye que *L. gasseri* puede clasificarse como una bacteria con potencial probiótico, debido a la capacidad de inhibición sobre *Staphylococcus epidermidis* en condiciones *in vitro*, a su vez demostró viabilidad y un adecuado crecimiento en condiciones similares a las propuestas del tracto gastrointestinal en el presente estudio, lo anterior hace posible su evaluación en condiciones *in vivo*. Por otra parte, la identificación de los diferentes aminoácidos del sobrenadante en la cepa láctica *L. gasseri* hace posible determinar el modo de acción de los mismos, pues se asocian a actividad antimicrobiana, principalmente mediante péptidos bioactivos.

REFERENCIAS

1. Bergey R. Manual of determinative bacteriology. 7 Edition; 1957. p. 1094.
2. Selle K, Klaenhammer TR. Genomic and Phenotypic Evidence for Probiotic Influences of *Lactobacillus Gasseri* on Human Health. *FEMS Microbiology Reviews* 2013; 37(6) 915-935.
3. Treven P, Turkova K, Trmcic A, Obermajer T, Rogelj I, Matijasic BB. Detection and quantification of probiotic strain *Lactobacillus gasseri* K7 in faecal samples by targeting bacteriocin genes. *Folia Microbiol.* 2013 (Praha); 58:623-630.
4. Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, Tsuda M, Hachimura S et al. 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* 2009; 73: 372-377 (traducido por los autores).
5. Taponen S, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*. 2009.
6. Sawant AA, Gillespie BE, Oliver SP. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. 2008.
7. Crueger W, Crueger A. (1993). Biotecnología: manual de microbiología industrial. 3 ed. España: Ed. Acribia. 220 p.
8. Jurado-Gómez H, Calpa-Yama F, Chaspuengal-Tulcán A.. Determinación *in vitro* de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot.* 2014; 61: 241-257.
9. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493.
10. Tagg J, McGiven A. Assay system for Bacteriocins. *Appl. Environ. Microb.* 1971; 21: 943.
11. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria *FEMS Microbiology Reviews* 1993; 12(1-3): 39-85.
12. Cai Y, Benno Y, Nakase T, Oh T. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. *J Gen Appl Microbiol.* 1998; 44: 311-316.
13. Cai Y, Suyanandana P, Saman P, Benno Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J Gen Appl Microbiol.* 1999; 45: 177-184.
14. 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.
15. Lanara, laboratório de referência animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Ii- Métodos físico e químicos. Mel. Ministério da Agricultura. Brasília. 1981. 2 (25): 1-15.
16. Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* 1956; 28:350-356.
17. Lowry O, Rosebroug N, Far A, Randall Rj. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biological. Chemistry.* 1951; 193: 265-75.
18. Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999; 76 115-137.
19. Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* 2004; 12 412-416.10.1016/j.tim.2004.07.004
20. Hambleton P, Turnbull PCB. Anthrax vaccine development: a continuing story. *Adv. Biotechnol. Processes.* 1990; 13:105-122.

21. Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal, PK, Gill HS. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 2005; 98(2), 211-217.
22. Benavides-Plascencia L, Aldama-Ojeda LA, Vázquez JH. Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Pública de México* 2005; 47(3), 219-226.
23. Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance. *Infectious Disease Clinics of North America* 1997; 11(4), 813-849.
24. Rolfe DR. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 2000; 130:396.
25. De Vuyst L. Growth kinetics and production of probiotic lactic acid bacteria strains: limitations and breakthroughs. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* 1998; 63/4b:1511.
26. Feria Cáceres PF. Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín - Colombia, 2007. p 84,
27. Jurado-Gámez H, Guzmán-Insuasty M, Jarrín-Jarrín V. 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.* 2015; 62: 40-56.
28. Leveau JY, Bouix M. Microbiología industrial: Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 2000. pp. 167-187, 206, 227-242.
29. Urbanska A, Bhathena J, Prakash S. Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: Preparation and *in vitro* analysis of alginate-chitosan microcapsules. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2007; 85(9):884-893.
30. Ávila J, Ávila M, Tovar B, Brizuela M, Perazzo Y, Hernández H. Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica* 2010; 20(2), 161-170.
31. Del Piano M, Morelli L, Strozzi G, Allesina S, Barba M, Deidda F et al. Probiotics: From research to consumer. *Digest. Liver Dis.* 2006; 38(2): 248-255.
32. De Roissart H, Luquet FM. Bacteries lactiques Aspects Fondamentaux et Technologiques. 2 Ed. France: Loriga. 1994.
33. Prescott LM, Harley JP, Klein, DA. Microbiología. 4a ed., Ed. McGraw-Hill Interamericana. Zaragoza, España. 1999. pp. 515-518.
34. Klingberg TD.; Axelsson, L.; Naterstad, K.; Elsser, D. y Budde, B.B. (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105, no. 3, p. 419-431,
35. Mora N, García A. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. [Tesis Licenciado Química en Alimentos]. [Hidalgo, México] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2007.
36. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett Appl Microbiol.* 1998; 27:183-185.
37. Ronka E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva. A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* 2003; 83:63-7
38. Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J. Appl. Microbiol.* 2004; 96:1024-1039
39. Pérez-Luyo A. Probióticos: ¿Una alternativa en la prevención de la caries dental? *Rev Estomatol Herediana*. [Internet]. [Citado 2013 abril 10]; 2008. 18 (1): 65-68. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/viewFile/1856/1865>.

40. Dellaglio F, Felis GE, Torriani S, Sørensen K, Johansen E. Genomic characterisation of starter cultures. *Probiotic Dairy Products* 2005; 16-38.
41. Jurado-Gómez HA, Romero-Benavides DA, Morillo-Garcés JA. Inhibición de *Lactobacillus gasseri* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* en condiciones *in vitro*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia* 2016; 63(2), 95-112.
42. Mishra C, Lambert J. Production of antimicrobial substances by probiotics. *Asian Pacific J Clin Nutr*. 1996.
43. González A, Vaccari G, Dosi E, Trilli A, Rossi M, Matteuzzi D. Enhanced production of L(+) – lactic acid in chemostat by *Lactobacillus casei* DSM 20011 using ion – exchange resins and cross – flow filtration in a fully automated pilot plant controlled via. *Biotechnology and Bioengineering* 2000; 67(2): 147 – 156.
44. Foo EL, Griffin HG, Mollby R, Hedén CG. (Editors). *The Lactic Acid Bacteria*. Horizon Scientific Press. United Kingdom, 1993. pp. 89 – 91.
45. Leblanc JG, Matar C, Valdez JC, Leblanc J, Perdigon G. Immunomodulatory effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science* 2002; 85:2733-2742
46. Kawai Y, et al. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C- terminal ends. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998; 62:2438-2440.
47. Trabi M, Craik Dj. Circular proteins-no end in sight. *Trends Biochem*. 2002. *Sci*. 27: 132-138.
48. Rivas L, Andreu D. Péptidos antimicrobianos eucarióticos: una nueva alternativa en clínica. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin*. 2003; 21: 358-365.
49. Maqueda M, Sánchez-Hidalgo M, Fernández M, Montalbán-López M, Valdivia E, Martínez-Bueno M. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32:2-22.
50. Montalbán-López M, Sánchez-Hidalgo M, Cebrián R, Maqueda M. Discovering the bacterial circular proteins: bacteriocins, cyanobactins, and pilins. *J Biol Chem*. 2012; 287:27007- 27013
51. Sivonen K, Leikoski N, Fewer DP, Jokela J. Cyanobactins–ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2010; 86:1213–1225.