

Molecular identification and evaluation of the probiotic ability of lactic acid bacteria from sow colostrum[¶]

Identificación molecular y evaluación de la capacidad probiótica de bacterias ácido lácticas aisladas del calostro de cerdas

Identificação molecular e avaliação da capacidade probiótica de bactérias ácido lácticas isoladas do colostro de porcas

Juliana Vélez Zea¹, MSc; Luz Adriana Gutiérrez^{2*}, MSc, cPhD; Olga Montoya Campuzano³, MSc.

*Autor para correspondencia: Luz Adriana Gutiérrez Grupo GIPDTA Caldas, Antioquia. E-mail: lugutierrez@lasallistadocentes.edu.co

¹ Ing. Biol, Máster en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia;

² Docente Corporación Universitaria Lasallista – Facultad Ciencias Administrativas y Agropecuarias Grupo GIPDTA Caldas, Antioquia.

³ Docente Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín – Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

(Recibido: 8 de abril, 2015; aceptado: 3 de julio, 2015)

Abstract

Probiotics have become relevant in animal health, especially because of their ability to replace antibiotic growth promoters. This study assessed the probiotic ability of lactic acid bacteria (LAB) isolated from sow colostrum obtained from pig farms in the southwest of Antioquia, Colombia. Bacteria were identified by molecular methods. Colostrum (1 ml) was collected from 20 sows postpartum. Colostrum (0.1 ml) was plated on Man Rogosa and Sharpe agar (MRS) (Merck), and incubated anaerobically at 37 °C for 48h. Probiotic capacity was determined measuring growth at pH 3,0 and growth on 0.3% w/v ox bile salts. Hemolytic activity, antimicrobial activity against *Salmonella typhimurium*, and sensitivity to antibiotics commonly used in veterinary were also determined. Molecular identification was made by gen16S Ribosomal analysis method. Of all the strains tested, only BAL 1 and BAL3 showed probiotic ability to grow and withstand an acidic pH (3,0) and 0.3% w/v of ox bile. They had γ -hemolytic activity, were catalase-negative, and inhibited growth of *Salmonella typhimurium* with halos larger than 11 mm. They were sensitive to amoxicillin, penicillin, chloramphenicol and erythromycin, and were identified as *Pediococcus pentosaceus*. The existence of *Pediococcus pentosaceus* in sow colostrum and its probiotic ability was demonstrated.

[¶]Para citar este artículo: Vélez Zea J, Gutiérrez LA, Montoya Campuzano O. Identificación molecular y evaluación de la capacidad probiótica de bacterias ácido lácticas aisladas del calostro de cerdas. Rev CES Med Zootec. 2015; Vol 10 (2): 141-149.

Keywords:

Antimicrobial activity, colostrum, Pediococcus pentosaceus, swine.

Resumen

Los probióticos han cobrado importancia en la salud animal, especialmente por la capacidad de reemplazar los antibióticos promotores de crecimiento. En este trabajo se evaluó la capacidad probiótica de algunas bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de leche calostro de cerdas en granjas del Valle de Aburrá (zona sur); las cuales fueron identificadas por métodos moleculares. Materiales y métodos: Se recolectó 1mL de calostro de 20. Se inocularon 0.1 mL de cada una de las muestras para su aislamiento sobre el agar Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck), incubándolas a 37 °C durante 48h en anaerobiosis. Se determinó la capacidad probiótica realizando las siguientes pruebas: tolerancia a un pH ácido de 3,0, crecimiento en bilis de buey 0,3%P/v, actividad hemolítica, actividad antimicrobiana frente a *Salmonella tiphymurium*, y sensibilidad a los antibióticos de uso común en veterinaria; y su identificación molecular se realizó por el método análisis del gen16S Ribosomal. De todas las cepas evaluadas solo dos mostraron tener capacidad probiótica al crecer y resistir a un pH ácido de 3,0 y 0,3% P/v de bilis de buey, con actividad γ -hemolítica, catalasa negativa, que inhibieron el crecimiento de *Salmonella tiphymurium* con halos mayores a 11mm sensibles a Amoxicilina, Penicilina, Cloranfenicol y Eritromicina, e identificadas como *Pediococcus pentosaceus*. Se demostró la existencia de *Pediococcus pentosaceus* con características probióticas en el calostro de cerdas.

Palabras clave:

Actividad antimicrobiana, Pediococcus pentosaceus, porcinos.

Resumo

Os probióticos tem aumentado sua importância na saúde animal, especialmente pela sua capacidade de ser utilizados ao invés dos antibióticos promotores de crescimento. Neste trabalho, avaliou-se a capacidade probiótica de algumas bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de leite de colostro de fêmeas suínas, as amostras foram obtidas de granjas localizadas em Sudeste antioqueño: as bactérias identificaram-se por métodos moleculares. *Materiais e métodos:* Coletou-se 1ml de colostro em 20 fêmeas suínas recém paridas, das cidades previamente descritas, cultivou-se em superfície 0,1 ml da amostra em ágar Man Rogosa e Sharpe (MRS) (Merck), e foram incubadas a 37 °C/48h em anaerobiose. Determinou-se a capacidade probiótica avaliando o crescimento dos isolados a pH de 3,0 e a sais biliares de boi 0.3%P/v, além, foi determinada a atividade hemolítica, atividade antimicrobiana frente a *Salmonella tiphymurium* e sensibilidade aos antibióticos de uso comum em veterinária. A identificação molecular realizou-se pelo método de análise do gene 16S Ribosomal. *Resultados:* de todas as cepas avaliadas só dois, BAL 1 e BAL3 mostraram ter capacidade probiótica ao crescer e resistir a um pH ácido de 3,0 e 0,3% P/v de bilis de boi, com atividade γ -hemolítica, catalase negativa, que inibiram o crescimento de *Salmonella tiphymurium* com anéis maiores a 11mm, sensíveis a Amoxicilina, Penicilina, Cloranfenicol e Eritromicina, e identificadas como *Pediococcus pentosaceus*. *Conclusão:* demonstrou-se a existência de *Pediococcus pentosaceus* com características probióticas no colostro de fêmeas suínas.

Palavras chave:

Atividade antimicrobiana, colostro, Pediococcus pentosaceus, suínos.

Introducción

En los animales de granja, entre ellos los cerdos, es necesario garantizar su bienestar y sus condiciones higiénico-sanitarias. Para lograrlo, se debe prevenir y controlar las enfermedades causadas en su mayoría por microorganismos patógenos; de hecho, los sistemas de producción intensiva son uno de los factores que favorecen el crecimiento y la proliferación de ellos. El estrés ocasionado por destete precoz, y espacios reducidos entre otros, disminuyen la respuesta inmunológica haciéndolos más vulnerables a las infecciones⁹.

Los antibióticos han sido el mecanismo utilizado para el control del crecimiento de microorganismos; sin embargo su uso indiscriminado ha generado cepas antibiótico multirresistente.²

Una estrategia para contrarrestar el uso indiscriminado de antibióticos y las consecuencias que producen en animales, es el empleo de los probióticos. Los probióticos son microorganismos que consumidos en cantidades suficientes generan efectos benéficos en el hospedero. Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido caracterizadas como probióticas, y se consideran alimentos (GRAS), Generally Recognized As Safe ya que estimulan el sistema inmune, establecen la microbiota intestinal competente, reducen los síntomas de diarrea, y producen sustancias con propiedades bacteriolíticas o bacteriostáticas²².

De la especificidad del probiótico, depende el aumento de beneficios sobre el hospedero, por tanto, el aislamiento de cepas nativas probióticas específicas de cada especie, favorece su establecimiento en el intestino y las interacciones con la microbiota residente¹².

Los sustratos en los cuales se han aislado bacterias probióticas son variados, excretas de neonatos alimentados con leche materna, alimentos fermentados, intestinos de animales y derivados lácteos entre otros; sin embargo, existen muy pocos reportes de la existencia de estos microorganismo en calostro.

Por las propiedades que presentan el calostro en cualquier neonato de cualquier mamífero esta investigación tuvo como objetivo aislar, caracterizar e identificar molecularmente cepas nativas de calostro de cerdas con actividad probiótica.

Metodología

Consideraciones éticas

Este proyecto no implicó daños al medio ambiente y a la salud animal a corto, mediano o largo plazo. No requirió comité de Ética por que los animales no fueron manipulados para la toma de muestras. Corporación Universitaria Lasallista (radicado 00323 del 15 de septiembre de 2011).

Aislamiento y obtención de los cultivos de bacterias ácido lácticas

Se recolectó 1mL de calostro, proveniente de 20 cerdas, de granjas del valle de Aburrá (zona Sur) Antioqueño (Colombia). Se inoculó 0,1 mL de cada una de las muestras en agar Man Rogosa y Sharpe (MRS) (Merck); se incubaron a 37 °C/48 horas, en anaerobiosis; pasado este tiempo se identificaron morfológicamente por coloración de Gram. Adicionalmente se determinó actividad catalasa y tipo de hemólisis.

Pruebas in vitro para la selección de cepas con carácter probiótico

Para determinar el carácter probiótico de los microorganismos aislados se realizaron las pruebas de acuerdo⁹.

Viabilidad y estabilidad a pH ácido y a 0,3% p/v de sales biliares

Se evaluó la tolerancia a $\text{pH} \leq 3,0$ en 9 mL de caldo MRS con HCL, inoculando el medio con los aislados a una concentración de 0,5 escala de MacFarland, equivalente a $(1,5 \times 10^8 \text{ UFC/mL})$. Para determinar el conteo inicio y final de células se realizó una evaluación de crecimiento en agar MRS en el tiempo 0 y a las 4 horas de incubación a 37 °C /48h / en anaerobiosis.

Para determinar la resistencia a sales biliares, se prepararon tubos de ensayo con 9 mL de caldo MRS enriquecidos con 0,3% p/v de bilis de buey y se inocularon con 1 mL del cultivo bacteriano a una concentración de 0,5 del patrón de MacFarland; posteriormente se incubaron a 37 °C durante 4 horas. La viabilidad de los microorganismos se evaluó con el mismo protocolo anterior.

Resistencia a la actividad enzimática

Se tomó un inóculo de 0,5 de la escala de MacFarland, se sometió durante 4 horas a una concentración de 0,5 mg mL⁻¹ de la enzima tripsina, y se determinó la viabilidad del microorganismo por recuento en placa en agar MRS⁷.

Prueba susceptibilidad a antibióticos

Se probó la susceptibilidad de las bacterias BAL a los agentes antimicrobianos por el método de difusión en disco de Kirby Bauer, de acuerdo con los criterios del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), con algunas modificaciones. Se inoculó en agar MRS con 0,1 mL del microorganismo de estudio. Se utilizaron discos con los siguientes antibióticos: (AM) ampicilina, 10 µg; (P) penicilina G, 10 µg; (AX) amoxicilina, 25µg; (TE) tetraciclina, 30 µg; (E) eritromicina, 15µg; (C) cloranfenicol, 30µg; (K) kanamicina, 30 µg; (S) streptomycin, 10 µg. (Becton Dickinson). Se incubaron a 37 °C por 48 h en anaerobiosis. El diámetro de inhibición se midió en mm.

Evaluación de propiedades antimicrobianas de las cepas aisladas frente a Salmonella typhimurium

Se determinó por el método de difusión en pozos de Montville¹⁴ con algunas modificaciones. Los aislados con mejor desempeño en las pruebas probióticas se les realizó identificación molecular, para la elucidación de sus contribuciones a la microbiota intestinal y sus propiedades benéficas¹¹.

Identificación molecular

Para la identificación molecular se utilizó la técnica de PCR, amplificando el gen 16S ribosomal²⁵, Para la extracción del ADN se usó el kit de tejido DNeasy de QIAGEN (siguiendo el protocolo para las bacterias Gram-positivas de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y los primers universales dentro del dominio de las bacterias ácido lácticas. Los cebadores universales utilizados fueron: Forward GCG GAT GGG TGA GTA ACA C, reverse ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT.

La amplificación de la PCR se realizó en termociclador (Multicene optimax PCR), usando Taq polimerasa (Invitrogen) de la siguiente manera, desnaturalización de DNA a 95 °C por dos minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 94 °C a 30 segundos, anillamiento a 52 °C, elongación 72 °C por 45 segundos con una elongación final para la Taq polimerasa de 5 minutos a 72 °C. Los productos se conservaron a 4 °C.

Para evidenciar la obtención de fragmentos amplificados del DNA de cada uno de las cepas, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% p/v en Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) se empleó una solución madre de TBE (89 mM Tris, 89 mM Ácido Bórico, 2.0 mM EDTA a pH 8; y para revelar los geles se usó una gota por cada 50 mL de la solución EZVISION (AMRESCO) y TBE 1x como solución tampón, preparado a partir de la solución madre TBE10x aplicando 90V por 5 minutos seguido por 70V por 40 minutos, los geles se visualizaron en un transiluminador (super-bright), por exposición a la luz ultravioleta.

La cuantificación del ADN genómico y de los productos de PCR obtenidos, se realizó comparándolo con un patrón de pesos moleculares de 1Kb Plus DNA Ladder.

Secuenciación y análisis de secuencias

Los fragmentos de DNA del gen 16S de las cepas que amplificaron, se enviaron a secuenciar al servicio de Secuenciación y Análisis Molecular Instituto de Genética SSiGMol de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (<http://www.ssigmol.unal.edu.co>). Las secuencias consenso se obtuvieron con el programa Bioedit y se identificaron en la página web del GenBank mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Resultados

Se aislaron cuatro colonias con las siguientes características morfológicas, borde entero, forma circular, una ligera elevación, convexas y cremosas. Sobre la base de la morfología del microorganismo, se observaron bacilos Gram positivos, pleomórficos con forma alargada o cocobacilar. Estos datos concuerdan con las características de bacterias ácido lácticas descritas por el manual de Bergeys.¹

Todas las cepas seleccionadas fueron catalasas negativas, al no producir burbuja al contacto con el agua oxigenada; y γ -hemolíticas, ya que no se observó ningún halo transparente alrededor de la línea de inoculación en el agar sangre. Cada una de las cepas de estudio se denominó como BAL1, BAL2, BAL3 y BAL4.

Las cuatro cepas presentaron viabilidad entre 15 a 20 X 10⁷ UFC/mL a pH de 3 y a 0.3 % p/v de bilis de buey, los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados viabilidad de las BAL a condiciones de pH ácido y a condiciones de 0,3% Sales Biliares.

BAL	pH 3 107UFC/mL	0,3% Sales Biliares 107UFC/mL
BAL1	18,5	17,8
BAL2	16,2	15,1
BAL3	20,1	19,2
BAL4	15,3	14,5

Las cepas demostraron viabilidad después de la permanencia de 4 horas en caldo MRS con Tripsina, encontrando recuentos de 15-20 x 10⁷ UFC/mL. Estas pruebas demuestran que estos microorganismos son capaces de resistir el paso por el sistema gastrointestinal y permanecer en cantidades viables; además, presentaron sensibilidad a los antibióticos Amoxicilina, Penicilina, Cloranfenicol y Eritromicina; estos resultados se muestran en la figura 1.



Figura 1. Resultados de las pruebas de susceptibilidad de las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas a antibióticos recomendados por la agencia Europea de Seguridad Alimentaria. AM: Ampicilina. C: Cloranfenicol K: Kanamicina. AX: Amoxicilina. P: Penicilina. S: Streptomycin. E: Eritromicina. TE: Tetraciclina. S sensible. R. Resistente.

Al determinar la actividad bactericida contra *Salmonella typhimurium*, se encontró que sólo los extractos de BAL1 y BAL3 obtuvieron halos de inhibición entre 18 mm y 6 mm sobre *Salmonella* (Figura 2).

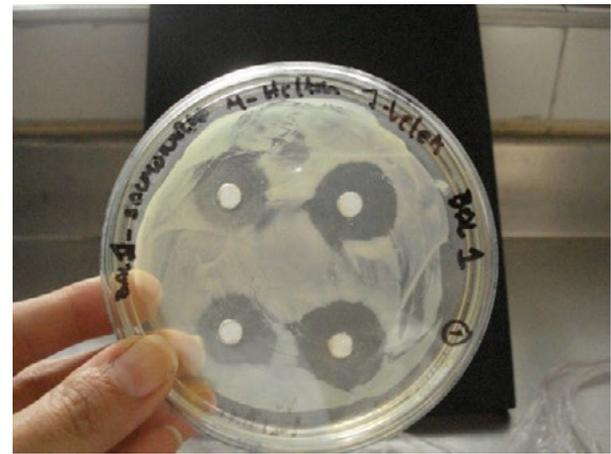


Figura 2. Fotografía de los halos de inhibición representados por zonas claras que indican nulo o crecimiento imperceptible de *Salmonella typhimurium*, producidos por los extractos de BAL1 (ubicados a la derecha de la fotografía) y BAL3 (izquierda).

En la identificación molecular de las muestras se encontró que estas contenían amplímeros de DNA de 1.5 kb correspondientes al tamaño del gen 16S ribosomal, con lo cual se comprobó la eficiencia de los primers y la calidad de las muestras para la fase de secuenciación; estos resultados se observan en la figura 3.

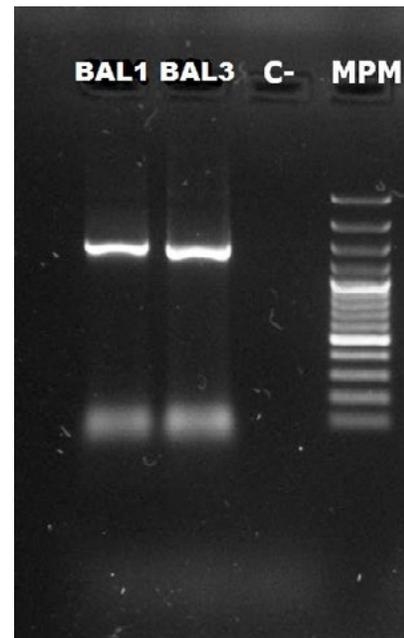


Figura 3. Visualización bandas de las cepas amplificadas BAL1 y BAL3, C -control negativo y MPM el patrón de 1000 pb.

Con las secuencias consenso se identificaron por BLASn, ambas bacterias como *Pediococcus pentosaceus*, con porcentajes de identidad obtenidos de un 100% para BAL1 y del 99% para BAL3 del 99% respecto a este género.

Para la realización del árbol filogenético se utilizaron secuencias de diferentes géneros *Lactobacillus* y

Pediococcus que junto a las secuencias obtenidas de BAL1 y BAL3 alinearon en Bioedit, este alineamiento sirvió de base para la realización del árbol filogenético en el programa MEGA usando el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustó, en este caso el de Kimura con distribución Gamma en Neighbor-Joining con un valor de bootstrap de 1000. Figura 4.

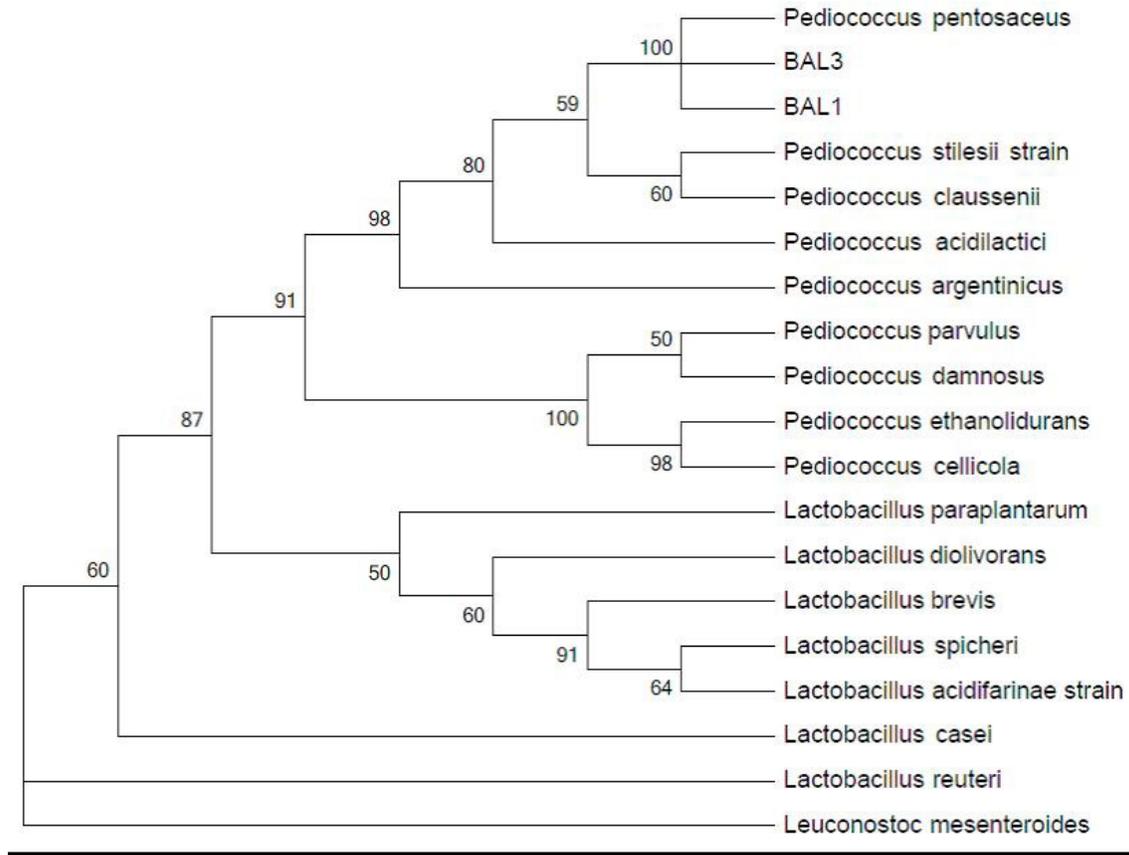


Figura 4. Árbol filogenético de las bacterias Acido lácticas aisladas por Bioedt, con distribución Gamma en Neighbor-Joining con un valor de bootstrap de 1000.

Discusión

Se obtuvieron cuatro colonias con las características de bacterias ácido lácticas descritas por el manual de Bergeys. La prueba de catalasa de las dos cepas fueron negativas, característica general del género *Lactobacillus*, y concuerda con Roissart y Luquet²⁰, quienes describieron que las cepas lácticas carecen de la enzima; además son γ -hemolíticas, propiedad especial de las bacterias BAL por no ser patógenas al no tener las hemolisinas que destruyen los glóbulos rojos¹⁸. Los resultados obtenidos de la viabilidad de las cuatro cepas a pH ácido indican que cuatro horas después del consumo de alimento, las bacterias lácticas del inóculo mantienen una viabilidad

alta, por tanto su acción probiótica será eficaz contra los microorganismos patógenos presentes en el intestino del animal.¹⁹

Respecto a la viabilidad a las concentraciones de sales biliares, se ha reportado, que la concentración crítica para determinar la resistencia de cepas a sales biliares era de 0,3%⁸ y que los probióticos tienen una tolerancia alta para crecer en presencia de altas concentraciones de bilis, incluso a concentraciones mayores a las que pueden encontrar en el intestino (0,15%)³.

Condiciones que cumplieron las cuatro cepas probadas

Para que un probiótico sea viable a las condiciones gastrointestinales, se debe comprobar la sensibilidad de estos a la actividad de enzimas, en este caso fue evaluada con Tripsina, esta enzima tiene un efecto proteolítico directo sobre la pared de muchas bacterias gram positivas, hidrolizando los enlaces peptídicos de los aminoácidos que conforma la pared⁷.

Todas las cepas en este estudio fueron sensibles a los antibióticos, Amoxicilina, Penicilina, Cloranfenicol y Eritromicina. Estudios realizados por Flóres *et al.*, 2005⁹, hacen mención que *Lactobacillus* spp, son generalmente susceptibles a estos antibióticos. El 100% de las cepas fueron resistentes a Kanamicina, esto concuerda con los resultados obtenidos por Verdenelli *et al.*, 2009²³.

En las recomendaciones hechas por la EFSA y las publicaciones de Martínez *et al.*, 2007¹³, los perfiles de sensibilidad antibiótica que más se ajustan a las características de los *Lactobacillus* son los correspondientes al de las cepas BAL1 y BAL3 quienes mostraron la mayor susceptibilidad a todos los antibióticos B-lactámicos (Amoxicilina y Ampicilina) así, como al aminoglucósido (Cloranfenicol).

El nivel de resistencia más alta se observó con Ampicilina, Estreptomina y Kanamicina. Estas resistencias se han atribuido como un aspecto intrínseco y no transmisible²¹.

Los resultados de actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium* concuerdan con las investigaciones hechas por Casey *et al.*, 2004⁴ los cuales aislaron BAL del tracto gastrointestinal de origen porcino observando una inhibición significativa del crecimiento de *Salmonella typhimurium* G; asimismo, Muñoz-Quezada *et al.*, en el 2011¹⁵, demostraron que los sobrenadantes de *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus rhamnosus*, aislados de heces de niños alimentados con leche materna inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella sp* y *Shigella*; sp, asimismo, Yin *et al.*, 2014²⁴, obtuvieron que los aislados de *Lactobacillus* adicionados al concentrado bajaron la temperatura rectal, disminuyeron la diarrea y los conteos intestinales de *Salmonella* comparados con el grupo control ($p \leq 0,01$).

De acuerdo a la identificación molecular las cepas BAL1 y BAL3 correspondieron a *Pediococcus pentosaceus*. Osmanagaoglu, en 2001¹⁶ también aisló e identificó *Pediococcus pentosaceus* con efectos probióticos en leche materna.

Estos microorganismos son cocobacilos, gram positivos, no móviles, no formadores de esporas, crecen en condiciones de pH entre 4,5 y 8,0 y son homofermentadores, tienen función estérter en vegetales y carnes además son conservantes naturales de alimentos¹⁷. Estas bacterias son consideradas probióticas y se han usado en las formulaciones de piensos por variada actividad metabólica. Chaucheyras-Durand y Durand, 2010⁷.

Esta investigación corrobora los estudios hechos por Franz *et al.*, 2011¹¹, en el cual analizaron 70 muestras de calostro humano y encontraron la existencia una “microbiota rica en bacterias ácido lácticas”; Para explicar la existencia de estos microorganismos Leónides *et al.*, 2013¹³; postuló la teoría de que “las células dendríticas (DCs) podrían penetrar en el epitelio del intestino y transportar bacterias no patógenas directamente a su lumen”.

Conclusiones

Se encontró que el calostro de cerdas contiene bacterias ácido lácticas que cumplen todas las exigencias basadas en las “*Guidelines for the evaluation of probiotics in food*” por lo que se pueden considerar como probióticas de aplicación biotecnológica, cuyos extractos fueron efectivos para la inhibición del crecimiento de *Salmonella typhimurium in vitro* con promedios de halos de inhibición mayores a 11 mm.

Estos resultados evidencian que el calostro no es un sustrato estéril, lo que aporta las bases para una mayor investigación en el campo del uso de estos probióticos en la alimentación de cerdos como una alternativa potencial con un alto nivel de especificidad, especie-específica tanto en tratamientos preventivos como coayudantes para las alteraciones ocasionadas por *Salmonella typhimurium*.

Sin embargo, se hace necesario la realización de ensayos posteriores que permitan identificar la naturaleza del mecanismo antimicrobiano usado (origen bacteriolítico o por la producción de ácidos orgánicos, entre otros).

Agradecimientos

A la Corporación Universitaria Lasallista por su financiación y a la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín por su colaboración.

Referencias

1. Bergey J, Hendriks D, Holt J. Bergey's manual of determinative bacteriology. Sneathy Stanley, J. T. (Eds.). Ed. The Williams and Wilkins Co. Philadelphia. 2000. 787 p
2. Bhandari SK, Opapeju FO, Krause, *et al.* Dietary protein level and probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88 challenge: Performance and gut microbial population. *Livestock Science*. 2010.133(1), 185-188.
3. Jurado-Gámez 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(3): 241-257
4. Casey P, Gardiner G, Casey G, Bradshaw B *et al.*, A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. 2007. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1858-1863.
5. Chaucheyras-Durand F, Durand, H. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial microbes*, 2010. 1(1), 3-9.
6. Dinan T, Cryan J. Regulation of the stress response by the gut microbiota: implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology*. 2012. 37(9), 1369-1378.
7. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, *et al.*, *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American journal of clinical nutrition*. 2001. 73(2), 386s-392s.
8. Erkkilä S, Petäjä E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science*. 2000.55 (3), 297-300.
9. Flores A, Bautista M, Egúsqüiza R, De La Torre M. Desarrollo de bioprocesos para la reducción de los niveles de dbó y dqo de efluentes de la industria alimentaria. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. 2014. 11(1), 3-10.
10. Franz C, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol*. 2011. 151, 125–140.10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014.
11. Klose V, Bayer K, Bruckbeck R, Schatzmayr G, Loibner A. *In vitro* antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. 2010. *Veterinary microbiology*, 144(3), 515-521.
12. Leónides-Fernández Á, Rodríguez G. Bacterias lácticas de la leche humana. *Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos*, Universidad Complutense de Madrid. (2013). Disponible en: <http://redbal.iata.csic.es/documentos/sabiasque/leche%20materna%20red%20BAL.pdf>. [Consulta: 15 de Septiembre 2013].
13. Martínez-Barragán I, González-Martínez B, Campos-Góngora E, Barba R, Jiménez-Salas Z. Identificación molecular de probióticos aislados de alimentos y suplementos: comparación con métodos bioquímicos. 2008. *Salus*, 9(4).
14. Montville, T., Chung, H., Chikindas, M. y Chen, Y. NisinA depletes intracellular ATP and acts in bactericidal manner against *Mycobacterium smegmatis**. *Letters in applied microbiology*. 1999. 28(3), 189-193.
15. Muñoz-Quezada, S. Aislamiento. Identificación y caracterización de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium Breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, obtenidos a partir de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna. Tesis Doctoral: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada. Granada. 2011.249p.
16. Osmanagaoglu O, Kiran F, Nes IF. A probiotic bacterium, *Pediococcus pentosaceus* OZF, isolated from human breast milk produces pediocin AcH/PA-1. *African Journal of Biotechnology*. 2013. 10(11), 2070-2079.
17. Olvera-García M, Serrano E, Quirasco M. Detección de Proteínas con Actividad Antibacteriana Producidas por Bacterias Ácido Lácticas. *BioTecnología*. 2015, Vol. 19 (1).

18. Piatek J, Gibas M, Olejnick A, Krauss H, Wierzbicki K *et al.* The ability and intestinal epithelial cell adhesion of probiotic strain combination *in vitro* study. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2012. 19(1):99-102.
19. Vinderola G, Céspedes M, Mateolli D, Cárdenas P, Lescano M, Aimaretti N, Reinheimer J. Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during cold storage. *International Journal of Dairy Technology* (2011) 64, 269-275.
20. Roissart H, Luquet F. Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Uriage, Lorica, France, 1994, vol. 1, p. 605. ISBN 2 9507477 0 1.
21. Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Poeta P, Zarazaga M. *et al.* Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International journal of food microbiology*. 2006. 111(3), 234-240.
22. Song D, Ibrahim S, Hayek S. Recent application of probiotics in food and agricultural science. *Probiotics, InTech*, (2012).Manhattan, 1-34.
23. Verdenelli M, Silvi S, Cecchini C *et al.* Sopravvivenza di due ceppi batterici probiotici *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 and *Lactobacillus paracasei* IMC 502 nel tratto gastro-intestinale umano e loro effetto sulla microflora intestinale. “Sostanze Naturali: dalla ricerca di base all’applicazione clinica”. 1° Convegno Nazionale, Istituto Superiore della Sanità, Roma, Italy. 2009.
24. Yin F, Farzan A, Wang Q, Yu H, *et al.* Reduction of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Infection in Experimentally Challenged Weaned Pigs Fed a *Lactobacillus*-Fermented Feed. *Foodborne pathogens and disease*. 2014. 11(8): 628-634.
25. Zapata Erazo G. Diseño y optimización de un sistema de amplio espectro basado en la amplificación de un fragmento del Gen ADN Ribosomal 16s mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para su aplicación como método de diagnóstico e identificación molecular en infecciones bacterianas locales. Tesis pregrado. Ingeniería Biotecnología. Sangolqui.103 p. 2011.