



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE CEPAS BACTERIANAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POSIBLE POTENCIAL PROBIÓTICO

AUTORA:

Benavides Haro Ana Belén

DIRECTORA:

Dra. Gabriela N. Tenea, Ph.D

COMITÉ LECTOR:

Dra. Lucía Yépez, MSc.
Ing. Sania Ortega, MSc.
Ing. Rosario Espín, MSc.

**Ibarra – Ecuador
2016**

Lugar de investigación:

Laboratorio de Análisis Físico Químico, Microbiológico y de Biología Molecular de la Escuela de Ingeniería Agroindustrial que pertenece a la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte, ubicada en la ciudad de Ibarra, Av. 17 de Julio 5-21. Sector “El Olivo”.

HOJA DE VIDA DE LA INVESTIGADORA



APELLIDOS: Benavides Haro

NOMBRES: Ana Belén

C. CIUDADANÍA: 100350421-2

TELÉFONO CELULAR: 0967148839

TELÉFONO FIJO: 062932745

CORREO ELECTRÓNICO: belenlinda20@hotmail.com

DIRECCIÓN: Imbabura - Ibarra - San Antonio - Barrio Tanguarín - Imbabura y Gabriel Yépez 2-132.

FORMATO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

BENAVIDES HARO, ANA BELÉN. Determinación de la capacidad antimicrobiana y susceptibilidad a los antibióticos de cepas bacterianas ácido lácticas con posible potencial probiótico/ TRABAJO DE GRADO. Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Agroindustrial. Ibarra 28 de junio de 2016.

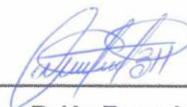
DIRECTORA: Tenea, Gabriela N.

En este estudio se evaluaron las propiedades *in vitro* como la actividad antagónica frente a dos patógenos de origen alimenticio y la susceptibilidad a dos antibióticos de algunas bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de nichos nativos del Ecuador. Con lo que se determinó cuál de las cepas en estudio poseen elevada actividad antimicrobiana a los patógenos *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* y se analizó el perfil de susceptibilidad a dos antibióticos de amplio espectro (ampicilina y gentamicina), para que en futuros estudios puedan agregarse a los alimentos, permitiendo proporcionar beneficios a las personas que consuman y por ende con avances en el campo agroindustrial.

Ibarra 28 de junio de 2016



Dra. Gabriela N. Tenea, Ph.D
Directora de Tesis



Ana Belén Benavides
Autora

ARTÍCULO CIENTÍFICO

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE CEPAS BACTERIANAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POSIBLE POTENCIAL PROBIÓTICO

AUTOR:

Ana Belén Benavides Haro

DIRECTORA:

Dra. Gabriela N. Tenea, Ph.D

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Físico Químico, Microbiológico y de Biología Molecular de la Universidad Técnica del Norte. En este estudio, se evaluaron las propiedades *in vitro* como la actividad antagónica frente a dos patógenos de origen alimentario y la susceptibilidad a antibióticos de algunas bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de nichos nativos del Ecuador. Los objetivos de la investigación fueron:

a) Evaluación de la capacidad antimicrobiana de cinco cepas de BAL frente a dos bacterias patógenas, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* aisladas de productos alimenticios; y b) Evaluación de la susceptibilidad a ampicilina (AM 10) y gentamicina (GM 10). El ensayo de pruebas de difusión en el agar mostró que el sobrenadante de las cepas de interés a pH 3,0 y pH 4,0 presenta elevada actividad antimicrobiana (zonas de inhibición $> 10,67 \pm 1,32$ mm) frente a los dos patógenos. El sobrenadante libre de células de la cepa UTN Fa 41 a pH 3,0 mostró alta actividad antagonista frente a *E. coli* (zona de

inhibición con un diámetro de $19 \pm 2,16$ mm), mientras que a pH 4,0 la cepa UTN Fa 38 presentó elevada actividad antimicrobiana (zona de inhibición de $15,67 \pm 1,25$ mm), después de 48 horas de incubación. Las cepas UTN Fa 40 y UTN Fa 41 mostraron mayor actividad inhibidora frente a *Salmonella sp.*, con un promedio del diámetro de inhibición de $18 (\pm 2,16)$ mm a pH 3,0 y $17 (\pm 3,56)$ mm a pH 4,0 respectivamente. Las cepas en estudio presentaron diferentes perfiles de susceptibilidad a los antibióticos, todas las bacterias ácido lácticas, incluso el probiótico comercial fueron sensibles a ampicilina (10 μ g) y resistentes a Gentamicina (10 μ g) a una concentración de 10^8 UFC/ml.

ABSTRACT

This research took place in the Laboratory of Chemical-Physical, Microbiology and Molecular Biology Analysis at the "Técnica del Norte" University. In this study, *in vitro* properties, such as the antagonistic activity against two foodborne pathogens and antibiotic susceptibility, of some lactic acid bacteria isolated from native niches of

Ecuador have been evaluated. The objectives of this research were: a) evaluation of the antimicrobial capacity of five strains of lactic acid bacteria against two pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* isolated from food products; and b) Susceptibility assessment to the antibiotics ampicillin (AM 10) and gentamycin (GM 10). The well agar diffusion assay showed that the supernatant of the interest strains to pH 3,0 and pH 4,0 has elevated antimicrobial activity (inhibition area $> 10,67 \pm 1,32$ mm) against both pathogens. The all - free supernatant of UTNFa 41 strain at the pH 3,0, showed high antagonistic activity against the pathogen *E. coli* forming an inhibition area of $19 (\pm 2,16)$ mm, while at pH 4,0, the strain UTNFa 38 formed an inhibition of $15,67 (\pm 1,25)$ mm, after 48 hours of incubation. The strains, UTNFa 40 and UTNFa 41, showed high inhibitory activity against *Salmonella sp.*, with an inhibition zone of 18 mm (± 2.16) mm at pH 3,0 and $3.56 (\pm 17)$ mm to pH 4,0. The strains of interest including the commercial strain showed different antibiotic susceptibility profiles. All strains were sensitive to ampicilina ($10 \mu\text{g}$) and resistant to gentamicina ($10 \mu\text{g}$) at a bacterial inoculum of 10^8 UFC/ml.

PALABRAS CLAVES

Inhibición, patógenos de origen alimenticio, bacterias ácido lácticas, susceptibilidad antimicrobiana.

KEYWORDS

Inhibition, foodborne pathogens, lactic acid bacteria, antimicrobial susceptibility.

INTRODUCCIÓN

Habiendo sido aisladas, seleccionadas y caracterizadas fenotípicamente, cepas de bacterias ácido lácticas a partir de frutos silvestres de la Estación La Favorita, actualmente se requiere continuar la investigación con el análisis de las características funcionales que posean las mismas. Con la finalidad de complementar el estudio investigativo sobre el perfil funcional de las nuevas cepas, que una vez evaluadas mediante la presencia de la actividad antimicrobiana y tolerancia a antibióticos en futuros estudios puedan agregarse a los alimentos, permitiendo proporcionar beneficios a las personas que consuman y por ende con avances en el campo agroindustrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las actividades de la presente investigación estuvieron planteadas dentro del Proyecto Prometeo con el título: *Bioprospección y mejoramiento de cepas de bacterias, hongos y levaduras de zonas no explotadas para el desarrollo de nuevos probióticos a ser aplicadas en la producción de alimentos*, que se desarrolló en la Carrera de Ingeniería Agroindustrial. El material biológico y de laboratorio se describen en la siguiente tabla.

| MATERIAL BIOLÓGICO | MATERIALES DE LABORATORIO |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ✓ Cepas de bacterias ácido lácticas (BAL). ✓ Control: Probiótico comercial (<i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i>. AXCAN PHARMA S.A Houdan - Francia) ✓ Cepas indicador: <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella sp.</i> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Discos comerciales con antibióticos: <ul style="list-style-type: none"> ◆ Ampicilina 10 µg (AM 10) y ◆ Gentamicina 10 µg (GM 10), proveedor Difco. |

En la investigación se plantearon dos procesos experimentales: 1) Evaluación de la actividad antimicrobiana; 2) Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos, de cepas de bacterias ácido lácticas.

Actividad antimicrobiana

Previamente se aislaron y seleccionaron cinco cepas de bacterias ácido lácticas, fueron caracterizadas fenotípicamente mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos para determinar el posible potencial probiótico. Las bacterias indicadoras (*E. coli* y *Salmonella sp.*) se aislaron de diferentes productos alimenticios del mercado local (Ibarra).

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar (D.C.A), con tres repeticiones y arreglo factorial A x B x C, más un testigo comercial y análisis estadísticos con valores de desviación.

El análisis de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) modificado, donde se realizó un cultivo tipo césped, de las bacterias patógenas, se incubó por 2 horas y posteriormente se realizaron orificios de 7 mm de diámetro, los cuales fueron inoculados con el sobrenadante de las bacterias en estudio, mismo que se obtuvieron previamente de centrifugar el cultivo bacteriano de interés a 5000 revoluciones durante 20 minutos y se ajustó a, pH 3,0 y pH 4,0 con una solución de ácido clorhídrico (HCl 1M) . Se incubó a 37°C en diferentes tiempos de incubación (18, 24, 36 y 48 horas) al finalizar cada periodo de incubación se midieron las zonas de inhibición. Los resultados se determinaron según el diámetro de las zonas de inhibición, se consideró actividad inhibitoria si las zonas de inhibición eran mayores a 5 mm, de lo contrario la actividad antagonista sería nula.

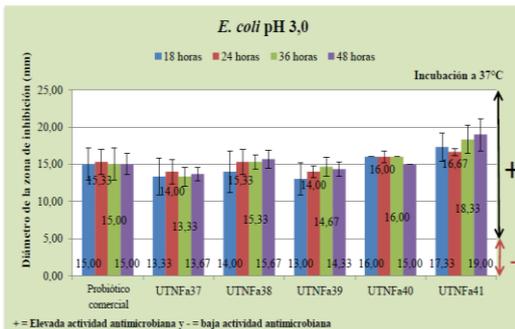
Susceptibilidad a los antibióticos

Se aplicó análisis estadísticos con valores de desviación (tres repeticiones cada tratamiento). La evaluación de la susceptibilidad a dos antibióticos de las cepas de interés se realizó mediante el método de difusión de disco, en medio MRS se sembró tipo césped inóculos con concentraciones de 10⁶ UFC/ml y 10⁸ UFC/ml de cada cepa de interés incluido el probiótico comercial, posteriormente se colocó discos impregnados con antibióticos (ampicilina y gentamicina) a una concentración de 10 µg. Se incubó a 37°C realizando la medición de los halos de

inhibición después de las 12, 24, 36 y 48 horas. Los resultados se interpretaron según la tabla establecida por las Normas EFSA (2012) y se clasificaron como Resistente, Intermedio sensible y Sensible.

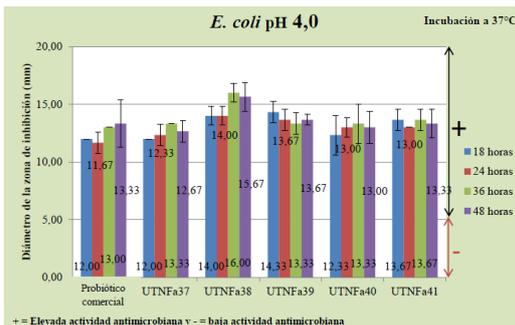
RESULTADOS Y DISCUSIONES

Actividad antimicrobiana



Probiótico comercial: *Lactobacillus LB**

Figura 1. Actividad antimicrobiana de las BAL y el probiótico comercial a pH 3,0, en diferentes tiempos de incubación frente a *E. coli*.



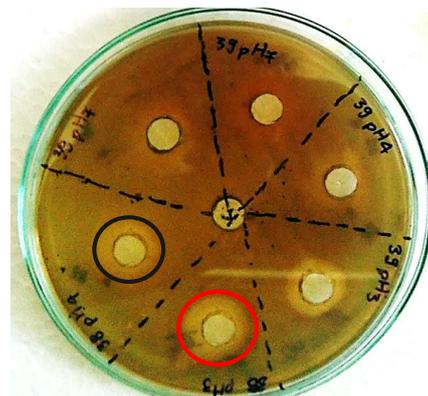
Probiótico comercial: *Lactobacillus LB**

Figura 2. Actividad antimicrobiana de las BAL y el probiótico comercial a pH 4,0, en diferentes tiempos de incubación frente a *E. coli*.

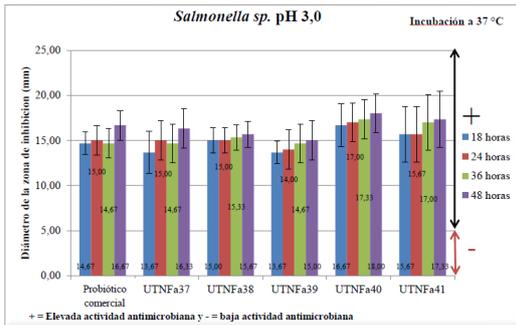
Las cepas en estudio presentan zonas de inhibición entre 13 y 19 mm a pH ácidos (3,0 y 4,0) frente a *E. coli*, como se muestra en las Figuras 1 y 2, lo que indica una elevada actividad antimicrobiana. La cepa UTNFA 41 registra el valor más alto de inhibición frente a *E. coli* ($19 \pm 2,16$ mm) a pH 3,0 a las 48 horas de incubación, presentando mayor actividad antagonista incluso mayor al probiótico comercial (*Lactobacillus LB**) cuya zona de inhibición fue de $15,33 (\pm 1,70)$ mm.

A pH 4,0 en cambio, la cepa con mayor actividad antagonista fue UTNFA 38 con una zona de inhibición de $16 (\pm 1,41)$ mm, después de 36 horas de incubación.

Estos resultados concuerdan con la investigación de (Vanegas, Gonzáles, Arévalo, & Villanueva, 2012) en la que, las cepas probióticas demuestran mayor actividad antagonista frente a *E. coli* a pH 3,0.

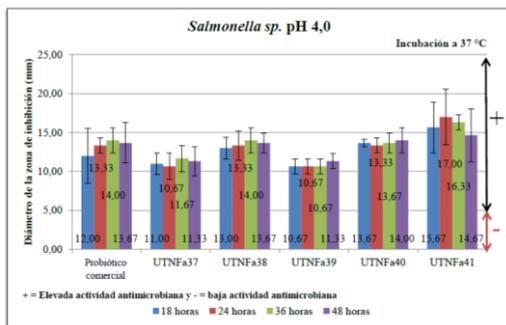


Fotografía 1. Vista de la mayor zona de inhibición que formó la cepa UTNFA 38 a pH 3,0 y pH 4,0 frente a *E. coli*.



Probiótico comercial: *Lactobacillus LB**

Figura 3. Actividad antimicrobiana de las BAL y el probiótico comercial a pH 3,0, en diferentes tiempos de incubación frente a *Salmonella sp.*

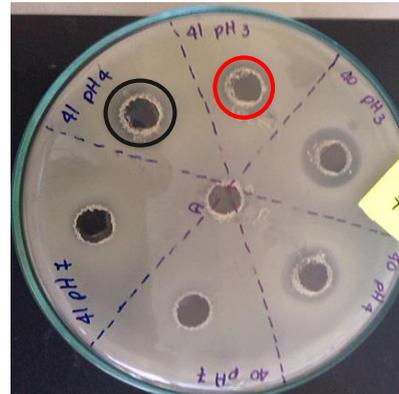


Probiótico comercial: *Lactobacillus LB**

Figura 4. Actividad antimicrobiana de las BAL y el probiótico comercial a pH 4,0, en diferentes tiempos de incubación frente a *Salmonella sp.*

Frente a *Salmonella sp.* a pH ácido (3,0 y 4,0) las cepas en estudio presentaron zonas de inhibición entre 10,67 y 18 mm, como se muestra en las figuras 3 y 4, siendo la cepa con mayor actividad antagonista a pH 3,0 UTNFA 40 cuyo valor de inhibición (18 ± 2,16 mm) fue mayor al del control comercial a las 48 horas de incubación. A pH 4,0 el sobrenadante de UTNFA 41 ha registrado una zona de inhibición de 17 (± 3,56) mm a

las 24 horas de incubación, mostrando su alta actividad microbiana



Fotografía 2. Vista de la mayor zona de inhibición que formó la cepa UTNFA 41 a pH 3,0 y pH 4,0 frente a *Salmonella sp.*

Según Vélez (2014), la capacidad antagonista es debido a que, los probióticos producen diferentes metabolitos que alteran funciones celulares, inhibiendo el crecimiento de patógenos. Rodríguez, Jiménez, Navarro, & Villarejo (2011) en su investigación demostraron que, las bacterias ácido lácticas poseen actividad antimicrobiana por la producción de bacteriocinas así como: nicinas y acidofilinas, entre otras. Mencionan que ciertas cepas de *Lactobacillus* poseen capacidad antimicrobiana frente a distintos patógenos.

En investigación realizada por Vanegas, et al. (2012) se reporta 49 cepas de *Lactobacillus sp.* aisladas de leche materna, de lo cual solo cinco presentaron actividad antagonista frente a *Salmonella Enteritides*, cuyas zonas de inhibición fueron de 0,5 mm a pH ácidos, mientras que, en el presente estudio todas las cepas han presentado

zonas de inhibición mayores a 10 mm a pH 3,0 y pH 4,0.

Susceptibilidad a los antibióticos

Frente al antibiótico ampicilina 10 µg, las cinco cepas en estudio y el control comercial presentaron sensibilidad a concentraciones tanto de 10⁶ UFC/ml, como de 10⁸ UFC/ml, presentado halos de inhibición entre 20,67 mm y 36 mm, como se muestra en las Tablas 2 y 3.

En el 2010 una investigación realizada por Cueto, Acuña, & Valenzuela demuestra que todas las bacterias ácido lácticas evaluadas fueron sensibles a ampicilina. La sensibilidad a antibióticos es un tema controvertido, ya que los probióticos no deberían presentar esta resistencia para no convertirse en vehículos de transferencia de genes de resistencia. Sin embargo, este es un tema que no está totalmente definido. (European Food Safety Authority, 2012) (Vanegas, *et. al.* 2012).

Tabla 1. Método de difusión del disco, Normas EFSA para los antibióticos ampicilina y gentamicina

| Antimicrobiano | Resistente Halo (mm) | Sensibilidad media Halo (mm) | Sensible Halo (mm) |
|----------------|----------------------|------------------------------|--------------------|
| Ampicilina | ≤ 12 | 13-15 | ≥ 16 |
| Gentamicina | ≤ 12 | 12 < φ < 13 | ≥ 13 |

Fuente: EFSA, 2012

Tabla 2. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10⁶ UFC/ml y antibióticos, ampicilina y gentamicina.

| 48 horas | (10 ⁶ UFC/ml) | | | (10 ⁶ UFC/ml) | | |
|----------------------|--------------------------|------------|-------------------------|--------------------------|------------|---------------------------|
| | AM 10 | | | GM 10 | | |
| Cepa | X media (mm) | Resultados | Normas EFSA | X media (mm) | Resultados | Normas EFSA |
| Probiótico Comercial | 26,67 | S | Sensible Halo (mm) ≥ 16 | 7,67 | R | Resistente Halo (mm) ≤ 12 |
| UTNFa37 | 22,67 | S | | 17,00 | S | Sensible Halo (mm) ≥ 13 |
| UTNFa38 | 21,67 | S | | 9,33 | R | Resistente Halo (mm) ≤ 12 |
| UTNFa39 | 34,67 | S | | 12,00 | R | |
| UTNFa40 | 26,00 | S | | 9,00 | R | |
| UTNFa41 | 23,33 | S | | 9,67 | R | |

Disco de antibiótico = 6 mm;
R: Resistente, S: Sensible

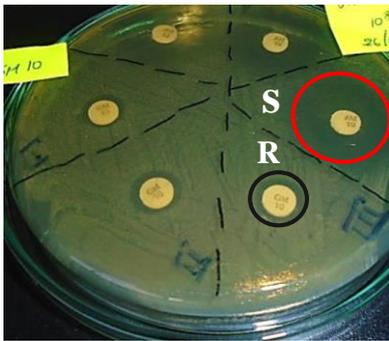
Tabla 3. Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm) después de 48 horas, un inóculo de 10⁸ UFC/ml y antibióticos, ampicilina y gentamicina.

| 48 horas | (10 ⁸ UFC/ml) | | | (10 ⁸ UFC/ml) | | |
|----------------------|--------------------------|------------|------------------------------------|--------------------------|------------|---------------------------|
| | AM 10 | | | GM 10 | | |
| Cepa | X media (mm) | Resultados | Normas EFSA | X media (mm) | Resultados | Normas EFSA |
| Probiótico Comercial | 15,00 | SM | Sensibilidad media Halo (mm) 13-15 | 10,00 | R | Resistente Halo (mm) ≤ 12 |
| UTNFa37 | 22,67 | S | Sensible Halo (mm) ≥ 16 | 11,67 | R | |
| UTNFa38 | 25,00 | S | | 9,00 | R | |
| UTNFa39 | 30,00 | S | | 12,00 | R | |
| UTNFa40 | 21,00 | S | | 10,00 | R | |
| UTNFa41 | 25,00 | S | | 10,67 | R | |

Disco de antibiótico = 6 mm
R: Resistente; S: sensibilidad; y SM: Sensibilidad media

Frente a gentamicina 10 µg, por el contrario, el control comercial y las cepas en estudio a una concentración de 10⁶ UFC/ml, se mostraron resistentes, presentando halos de inhibición hasta de 12 mm, a excepción de UTNFa 37 la cual se mostró sensible formando un halo de 17 mm; y UTNFa 39 que presentó sensibilidad media a las 36 horas de incubación, con un halo de 12,33 mm. Sin embargo, al elevar la concentración a 10⁸ UFC/ml, todas las cepas presentaron resistencia a dicho antibiótico, como se detalla en las Tablas 2 y 3.

Investigaciones experimentales anteriores mencionan que entre las bacterias probióticas existe una resistencia intrínseca a los antibióticos. (FAO/OMS, 2001) (Cueto, *et. al.*, 2010).



R: Resistente, S: Sensible

Fotografía 3. Vista del halo de inhibición formado por ampicilina y gentamicina en presencia del probiótico comercial (10^8 UFC/ml)



R: Resistente, S: Sensible

Fotografía 4. Vista del halo de inhibición formado por ampicilina y gentamicina en presencia de la cepa UTN Fa 37 (10^8 UFC/ml)

En las Fotografías 3 y 4, se presenta la vista fenotípica con la formación del halo transparente que indican que las cepas son sensibles al antibiótico ampicilina y

resistentes a la gentamicina al formar un halo menor.

CONCLUSIONES

- ◆ El perfil antimicrobiano de bacterias ácido lácticas aisladas de nichos ecológicos de la selva nativa del Ecuador ha demostrado que cinco cepas de interés han presentado elevada actividad antimicrobiana frente a dos patógenos de origen alimenticio.
- ◆ Las cepas de interés poseen capacidad antimicrobiana lo que confirma la hipótesis establecida.
- ◆ El ensayo de pruebas de difusión en el agar mostró que, el sobrenadante libre de células a pH 3,0 y pH 4,0 de las cinco cepas de interés (UTN Fa 37, UTN Fa 38, UTN Fa 39, UTN Fa 40 y UTN Fa 41), presentaron elevada actividad antimicrobiana frente a los dos patógenos indicadores.
- ◆ Entre las cepas en estudio, el sobrenadante libre de células de la cepa UTN Fa 41 a pH 3,0 presentó la mayor actividad antagonista frente al patógeno *E. coli* (zona de inhibición de 19 mm, mientras que a pH 4,0, el sobrenadante de la cepa UTN Fa 38 ha presentado la mayor actividad antimicrobiana (zona de inhibición de 18 mm).
- ◆ Frente a *Salmonella sp.* se evidencia que el sobrenadante libre de células a pH 3,0 de la UTN Fa 40 ha mostrado elevada actividad antimicrobiana (diámetro de la zona de inhibición de 18 mm), mientras

que al pH 4,0 el sobrenadante de la cepa UTNFa 41 (diámetro de la zona de inhibición de 17 mm) mostró una actividad durante los cuatro tiempos de incubación.

- ◆ Los análisis estadísticos de varianza con los valores de desviación estándar se comprueban con el resultado obtenido, ya que las cinco cepas en estudio presentaron actividad antagonista elevada frente a los dos patógenos indicadores.
- ◆ Según las comparaciones realizadas con la tabla de valores de las Normas EFSA, en el perfil de susceptibilidad a ampicilina (10 µg) de las cepas en estudio, se concluye que las diferentes concentraciones de inóculos (10^6 UFC/ml y 10^8 UFC/ml) no influyeron en el resultado final, ya que las cinco BAL de interés presentaron sensibilidad a dicho antibiótico en los cuatro periodos de incubación.
- ◆ El antibiograma de las cinco cepas de interés a gentamicina (10 µg), ha demostrado que la cepa UTNFa 37 fue resistente a un inóculo bacteriano de 10^8 UFC/ml a una concentración de 10^6 UFC/ml, presentó sensibilidad a dicho antibiótico.

RECOMENDACIONES

- ◆ Realizar una investigación más detallada, en la que se evalué los análisis con otras bacterias patógenas y diferentes antibióticos.

- ◆ Se recomienda utilizar una cepa pura de *Lactobacillus* u otra cepa conocida, para ser utilizada en la preparación de probióticos como un control testigo, en todos los experimentos.
- ◆ Se debe utilizar diferentes concentraciones de antibióticos, para conocer exactamente la concentración mínima y máxima de tolerancia.
- ◆ Mantener la inocuidad durante toda la práctica; para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados en las placas de estudio.
- ◆ En la parte experimental de la capacidad antimicrobiana, al utilizar los sobrenadantes de las cepas de interés, se recomienda realizar una incubación de 18 horas o más; ya que esto permite que el sobrenadante sea absorbido por el medio de cultivo y con ello evitar que se disperse al realizar las mediciones.
- ◆ Al realizar el control de medida de las zonas y halos de inhibición, se debe medir cuidadosamente por la parte posterior de la placa, en un cuarto con claridad y luz brillante; o bien a contraluz y utilizando un fondo oscuro adecuado.

BIBLIOGRAFÍA

- Cueto, M., Acuña, Y., & Valenzuela, J. (2010). *Evaluación In vitro del Potencial Probiótico de Bacterias*

Ácido Lácticas aisladas de Suero Costeño. Obtenido de Scientia Agropecuaria: <http://matematicas.udea.edu.co/~ac tubiol/actualidadesbiologicas/raba2010v32n93art1.pdf>

European Food Safety Authority. (2012). *Guidance on the assessment of bacterial*. Obtenido de Characterization of Commercial Probiotics: Antibiotic Resistance, Acid and Bile Resistance, and: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=>

FAO/OMS. (1-4 de Octubre de 2001). *Informe de la Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico*. Obtenido de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>

Maldonado, F., & Prieto, J. (2008). *Midiendo la Infección: Análisis de Secuencias*. Madrid: Díaz de Santos, S.A.

Rodríguez, J. S., Jiménez, S. S., Navarro, R. M., & Villarejo, M. J. (2011). *Patógenos Emergentes en la Línea de Sacrificio de Porcino*. Madrid: Díaz de Santos.

Vanegas, M., Gonzáles, L., Arévalo, S., & Villanueva, C. (31 de Agosto de 2012). *Evaluación del potencial probiótico de cepas Lactobacillus colombianas aisladas de leche materna*. Recuperado el 31 de Agosto de 2010, de Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos: <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=EVALUACI%C3%93N+DEL+POTENCIAL+PROBIOTICO+DE+CEPAS+LACTOBACILLUS+COLOMBIANAS+AISLADAS+DE+LECHE+MATERNA.&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi>

_m4H7ybvJAhVETSYKHd_RAFQQ FggaMAA&url=http%3A%2F%2Fali mentoshoy.acta

Vélez, J. (2014). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas extraídas del calostro de cerdas de granjas del Aburrá sur*. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/45835/1/32255433.2014.pdf>