

# ***Viabilidad probiótica y capacidad de inhibición de *L. gasseri* microencapsulada en *L. monocytogenes* y *S. aureus*\****

## ***Probiotic viability and inhibitory capacity of microencapsulated *L. gasseri* on *L. monocytogenes* and *S. aureus****

FAJARDO-ARGOTI, IVONNE-CATALINA<sup>1</sup>; JURADO-GÁMEZ, HENRY-ARMANDO<sup>2\*</sup>; PARRA-SUESCÚN, JAIME-EDUARDO<sup>3</sup>

\* Proyecto de investigación de origen: "Microencapsulación de *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus plantarum* bajo condiciones gastrointestinales simuladas y su efecto sobre patógenos asociados a toxiinfecciones alimentarias (TIAs)". Financiación: Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS, Universidad de Nariño. Finalización: enero de 2021.

- 1 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS. MS.c. Ciencias Agrarias. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1993-6573>
- 2 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS. Ph.D. Ingeniera de alimentos. Pasto, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-2118-7997>
- 3 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. Ph.D. Ciencias animales. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-4772-1326>

**Correspondencia:** [henryjugam@gmail.com](mailto:henryjugam@gmail.com)

### **Cómo citar este artículo**

FAJARDO-ARGOTI, IVONNE-CATALINA; JURADO-GÁMEZ, HENRY-ARMANDO; PARRA-SUESCÚN, JAIME-EDUARDO. Viabilidad probiótica y capacidad de inhibición de *L. gasseri* microencapsulada en *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 20, n. 2, 2022, p. 87-101. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v20.n2.2022.2042>

### **Historial del artículo**

**Recibido para evaluación:** 19 de octubre 2021

**Aprobado para publicación:** 23 de diciembre 2021

## RESUMEN

*Lactobacillus gasseri* es reconocido como un importante microorganismo comensal, capaz de inhibir múltiples patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas y por su influencia sobre los mecanismos del sistema inmune a nivel intestinal. *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, por su parte, son microorganismos zoonóticos potencialmente dañinos que afectan la salud animal y humana, y a su vez, son contaminantes de la cadena alimentaria. En este contexto, se evaluó el efecto de *L. gasseri* microencapsulada sobre *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Se determinó el crecimiento bacteriano de la cepa láctica en dos medios de cultivo (MRS-PRO), se llevó a microencapsular en una matriz de inulina-maltodextrina al 15 %. Se evaluó la viabilidad en el tiempo y a condiciones gastrointestinales *in vitro* a los 8, 15, 20, 30 y 45 días con valores máximos de  $3,3 \times 10^9$  UFC/mL. Luego se identificó la morfología de la cápsula por microscopía electrónica de barrido (SEM) con tamaños de cápsula entre 2,69 y 12,26  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se estableció la concentración mínima inhibitoria (CMI) para inhibir a los patógenos. Se observaron óptimas viabilidades de la cepa láctica en las diferentes condiciones evaluadas, la matriz encapsulante mostró efectividad en la protección de la cepa, dos de los métodos propuestos, demostraron mayor capacidad de inhibición frente a las cepas patógenas. *L. gasseri* es una cepa aceptable y segura para su aplicación en beneficio de la salud animal y humana.

## ABSTRACT

*Lactobacillus gasseri* is recognized as an important commensal microorganism, capable of inhibiting multiple pathogens through the production of antimicrobial substances and by its influence on the mechanisms of the immune system at the intestinal level. *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, on the other hand, are potentially harmful zoonotic microorganisms that affect animal and human health and, in turn, are contaminants of the food chain. In this context, the effect of microencapsulated *L. gasseri* on *L. monocytogenes* and *S. aureus* was evaluated. Bacterial growth of the lactic strain was determined in two culture media (MRS-PRO), microencapsulated in a 15 % inulin-maltodextrin matrix. Viability was evaluated over time and at *in vitro* gastrointestinal conditions at 8, 15, 20, 20, 30 and 45 days with maximum values of  $3,3 \times 10^9$  CFU/mL. Then, capsule morphology was identified by scanning electron microscopy (SEM) with capsule sizes between 2,69 and 12,26  $\mu\text{m}$ . Finally, the minimum inhibitory concentration (MIC) was established to inhibit the pathogens. Optimal viabilities of the lactic strain were observed in the different conditions evaluated, the encapsulating matrix showed effectiveness in the protection of the strain, two of the proposed methods showed greater inhibition capacity against the pathogenic strains. *L. gasseri* is an acceptable and safe strain for its application for the benefit of animal and human health.

## PALABRAS CLAVE:

Matriz encapsulante; Termoprotector; Viabilidad; Inhibición; Probiótico, Prebiótico; Salud animal y humana, Inocuidad; Toxiinfección alimentaria; Resistencia a antimicrobianos.

## KEYWORDS:

Encapsulating matrix; Thermoprotectant; Viability; Inhibition; Probiotic; Probiotic, Prebiotic; Animal and human health; Food safety; Foodborne toxicity; Antimicrobial resistance.

## INTRODUCCIÓN

El intestino humano y animal puede considerarse como un fermentador que produce ecosistemas complejos de bacterias aeróbicas y anaeróbicas. El método más común de producción comercial de probióticos es la fermentación. Las formas más comunes de probióticos se encuentran de forma natural en los productos lácteos fermentados, además, los alimentos fermentados como el kimchi kombucha, masa madre, encurtidos y chucrut se han utilizado durante mucho tiempo como fuente de probióticos para los humanos. Curiosamente, la mayoría de las cepas probióticas pertenecen al género *Bifidobacterium*, sin embargo, el *Lactobacillus* también contribuye ampliamente a la creciente lista de probióticos conocidos. La microbiota intestinal en los seres humanos está predominada por las Bifidobacterias lo que la convierte en uno de los géneros más utilizados en los probióticos comerciales (Hathi *et al.*, 2021). Sabio *et al.* (2021) afirman que la Organización Mundial De La Salud (OMS) menciona que el aumento de las bacterias resistentes a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud mundial, por lo tanto, se necesitan urgentemente nuevos enfoques sin antibióticos para el tratamiento y la prevención de las infecciones bacterianas. Los antibióticos han sido los aditivos más utilizados para mejorar la conversión alimenticia, la tasa de crecimiento y la salud en animales, mejorando tanto la productividad como la rentabilidad en la producciones comerciales tradicionales (Lourenço *et al.*, 2019). Sin embargo, las cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos que se originan en animales se han convertido en un problema cada vez más importante a lo largo de los años, especialmente en lo que respecta a la transmisión a través del suministro de alimentos o el contacto directo con los animales. Otras posibles amenazas para la seguridad alimentaria asociadas al tratamiento con antibióticos en los animales destinados a la alimentación son un aumento de las reacciones alérgicas y del tratamiento con antibióticos. Las alternativas a los antibióticos se han introducido progresivamente en los sistemas productivos (Ricke *et al.*, 2020). Los antibióticos han sido sustituidos por productos que han demostrado ser viables en esquemas alternativos de producción avícola y que incluyen producción ecológica, como enzimas, ácidos orgánicos e inorgánicos, probióticos, prebióticos, simbióticos, hierbas y aceites esenciales (Shi *et al.*, 2019). Cuando se utilizan los probióticos en los sistemas productivos, se espera que tengan efectos favorables similares a los antibióticos utilizados en los sistemas convencionales de producción. En este orden de ideas, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la micro encapsulación en la viabilidad probiótica de *L. gasseri* bajo condiciones gastrointestinales simuladas y su capacidad de inhibición en *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

## MÉTODO

### Localización

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio del Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS y laboratorios especializados—sección de cromatografía, de la Universidad de Nariño, Torobajo, ubicados en el Municipio de Pasto, Departamento de Nariño, localizado a 2.527 m.s.n.m, con una temperatura entre 7 y 16 °C. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo al Manual de Bioseguridad en el laboratorio-3ra Edición (WHO, 2005). Esta investigación fue avalada por El Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED-115-19, diciembre 09 de 2019), usando las cepas comerciales *Lactobacillus gasseri* ATCC® 19992, *Listeria monocytogenes* ATCC® 9112 y *Staphylococcus aureus* ATCC® 1708.

### Cinética de fermentación

Se propuso el medio de cultivo comercial MRS (D-glucosa 20 g/L; extracto de carne 8 g/L; extracto de levadura 4 g/L) y el medio de cultivo no comercial PRO basado en la metodología de Jurado-Gómez *et al.* (2016) (10 g/L azúcar blanco, 15 g/L leche de soya, 150 g/L leche en polvo, 15 g/L de inulina). Las variables evaluadas durante la cinética fueron las siguientes: conteo de microorganismos viables en placa (UFC/mL), determinación de pH,

determinación de producción de proteínas totales (Lowry *et al.*, 1951), determinación de consumo de azúcares totales (Dubois *et al.*, 1965), determinación de producción de ácido láctico (Morales-Erazo *et al.*, 2019) y evaluación de producción de biomasa (Crueger y Crueger, 1993; Rodríguez *et al.*, 2003; Madigan *et al.*, 2009). Las mediciones se realizaron cada 2:50 h durante un periodo de 24 h. Adicionalmente, se tomó una muestra de sobrenadante de *L. gasseri*, por HPLC-DAD, se determinó el contenido de péptidos, ácido láctico y aminoácidos, este último también para las cepas patógenas; para lo anterior, se ajustó, por espectrofotometría, a una densidad óptica 0,125, en escala McFarland patrón 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  bacterias/mL). Luego, se transfirieron muestras en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 18.000 r.p.m, durante 30 min, a 4 °C. Por último, el sobrenadante se filtró, utilizando membranas PVDF de 0,2  $\mu\text{m}$  y se llevó a lectura.

### **Microencapsulación de *L. gasseri* por la técnica de secado por aspersión**

Después del anterior proceso, se llevó a cabo la microencapsulación, para esto se realizó el ajuste del inóculo, en donde a *L. gasseri*, se llevó a incubación a 37 °C por 24 h, a una proporción según Crueger y Crueger (1993) del 10 % v/v, es decir en 90 mL de caldo MRS estéril se añadieron 10 mL del inóculo bacteriano. Para el conteo se tomó 1 mL y se llevó a lectura directa en espectrofotómetro a 625 nm. El patrón en la escala de McFarland a la cual se ajustó la población bacteriana fue de 4 equivalente a  $1,2 \times 10^9$  UFC/mL. Posteriormente, de acuerdo con Rodríguez *et al.* (2012), se preparó para el microorganismo una suspensión que consistió en la adición del 15 % p/v en relación 1:1 p/p de los agentes microencapsulantes inulina y maltodextrina y se inoculó con  $10^9$  UFC/g del microorganismo. Para esto se utilizó el equipo de secado por aspersión Secador Spray Bilon 6000s®, con una temperatura de entrada de 170 °C y una temperatura de salida de 66 °C, con ciclo completo de 2 h y 30 min, para un flujo de alimentación de 400 mL del total de inóculo. De igual manera, se determinaron las siguientes propiedades físicas del microencapsulado: actividad de agua, humedad relativa, solubilidad, humectabilidad, higroscopicidad y eficiencia de microencapsulación, siendo A la concentración bacteriana antes de la microencapsulación y B es la concentración de la bacteria después de microencapsular encontrada en el sobrenadante), siguiendo las metodologías propuestas por Gonzales *et al.* (2015) y Rodríguez-Barona *et al.* (2016). Además, se determinó el tamaño y la morfología de las microcápsulas utilizando un microscopio electrónico de barrido FEG (Field Emission Gun)-QUANTA 650 FEG. Dicho análisis fue realizado en el laboratorio del Centro de Microscopía y Microanálisis (Bogotá, Colombia). El material microencapsulado se almacenó a temperatura ambiente del laboratorio de investigación de  $20 \pm 2$  °C durante 45 días.

### **Viabilidad bajo condiciones gastrointestinales simuladas**

Después de realizada la microencapsulación, se determinó el crecimiento de *L. gasseri* microencapsulado en condiciones gastrointestinales simuladas, a un pH de 3,0 (Fase gástrica) y una fase intestinal con concentraciones de sales biliares bovinas de 0,3 y 1 % y bilis bovina de 0,3 y 0,5 %, y a niveles de pH de 5,0 y 7,0. La incubación se realizó en condiciones de aerobiosis en medio MRS comercial a 37 °C durante 48 h y el ajuste del pH se realizó con ácido tartárico (Freudig *et al.*, 1999). Adicionalmente, se evaluó la resistencia a lisozima sometiendo la cepa láctica a diferentes preparaciones: (i) 0,6  $\mu\text{L}$  de cultivo y 0,60  $\mu\text{g}$  de lisozima, (ii) 0,6  $\mu\text{L}$  de cultivo y 120  $\mu\text{g}$  de lisozima, (iii) 0,6  $\mu\text{L}$  de cultivo y 180  $\mu\text{g}$  de lisozima (Rodríguez-González, 2009), se llevó a incubación durante 24 h a 37 °C.

### **Ensayos de inhibición: Concentración mínima inhibitoria**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de *L. gasseri* de acuerdo con la metodología de Tagg y McGiven (1971), se propusieron los siguientes métodos: (i) método discos de agar donde se evaluaron concentraciones de 90, 120 y 150  $\mu\text{L}$  (ii) método discos modificado (PADS) con concentraciones de 80, 90 y 100  $\mu\text{L}$  (iii) método difusión en pozos y difusión en pozos doble capa modificado con concentraciones de 90, 120 y 150  $\mu\text{L}$ . Sumado a esto, se verificó la producción de exopolisacáridos (EPS) de acuerdo con lo descrito por Elinalva *et al.* (2012), donde se utilizaron discos de papel de filtro estéril (5 mm) impregnados con 5  $\mu\text{L}$  de cultivo láctico

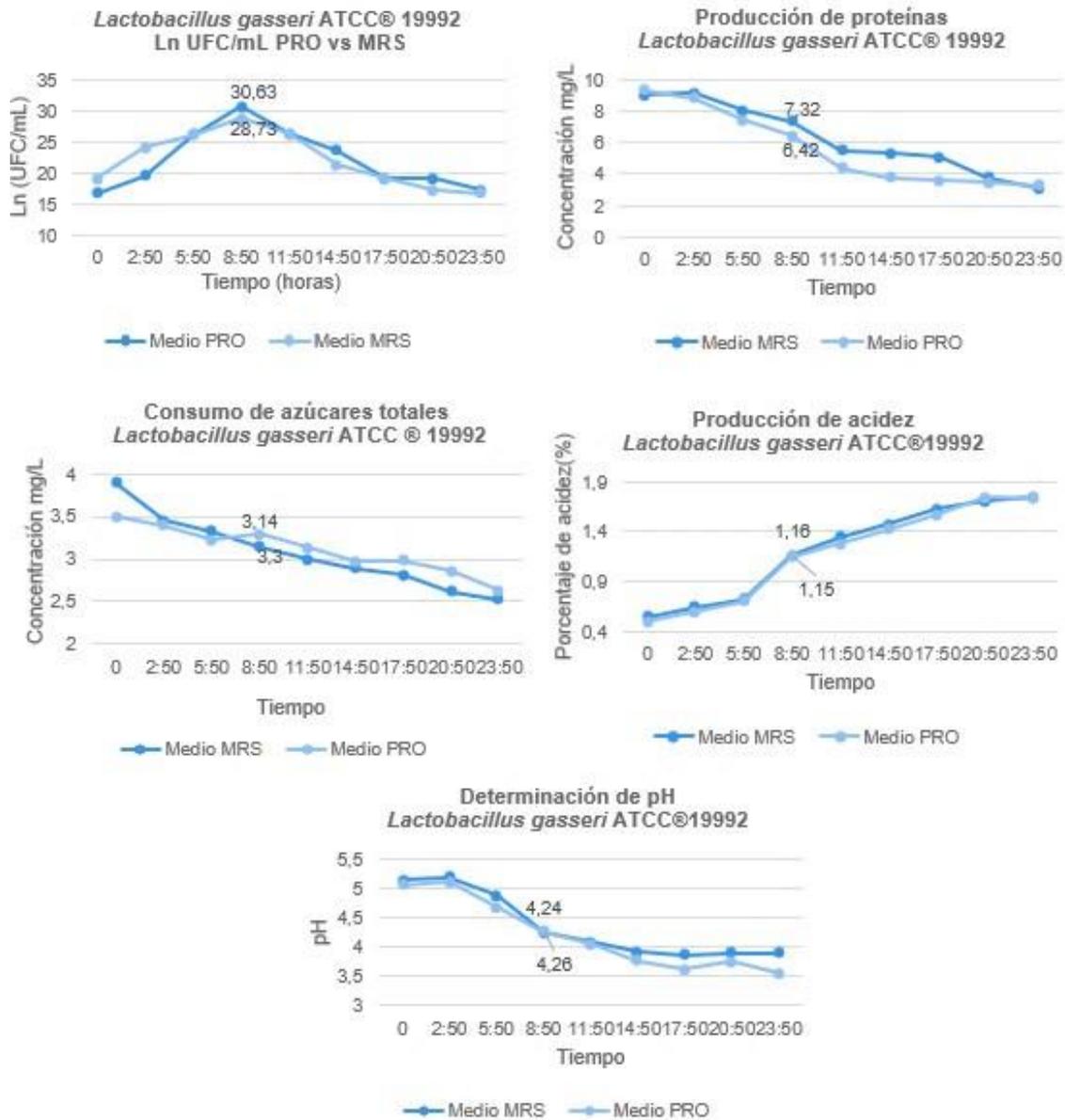
en placas petri con agar MRS para observar la producción de EPS (Guimarães *et al.*, 1999). El ensayo se realizó bajo las siguientes condiciones: nivel de pH ( $6,0 \pm 0,2$ ), diferentes temperaturas ( $28 \pm 2$  °C,  $35 \pm 2$  °C y  $42 \pm 2$  °C) y tiempos de incubación (24 h, 48 h y 7 días). Finalmente, se evaluó la susceptibilidad de la cepa láctica y las cepas patógenas frente a los antibióticos ampicilina (AMP) 10 µg, penicilina (P) 10 IU, vancomicina (VAN) 30 µg, cefalotina (KF) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, gentamicina (CN) 10 µg, dicloxacilina (DCX) 1 µg, cefatoxime (CTX) 30 µg, metilicina (5 µg), florfenicol (FFC) 3 µg (Bauer *et al.*, 1966).

## Diseño estadístico

Para evaluar las variables de la cinética de fermentación se utilizó un diseño de medidas repetidas en el tiempo, en donde se usó como factor fijo los medios de cultivo (MRS y PRO) y las medidas en el tiempo como factor aleatorio. Para ello, primero se determinó la mejor estructura de covarianza mediante los criterios de akaike y bayesiano. La viabilidad se evaluó mediante un diseño completamente aleatorizado, donde se propuso como tratamientos la cepa sin microencapsular y microencapsulada a los días 8, 15, 20, 30 y 45 días. Se utilizó un total de 5 réplicas por cada tratamiento, por su parte en la caracterización física del material microencapsulado se evaluó de manera descriptiva haciendo uso del diagrama de líneas con barra de error (95 %) en los puntos de las medias. El crecimiento en condiciones gastrointestinales se analizaron bilis y sales biliares en los dos pH propuestos de tal manera que, se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2x2, donde el primer factor fue la concentración de bilis (0,3 y 0,5 %) y sales biliares (0,1 y 0,3 %) mientras que el segundo factor fue el pH (5,0 y 7,0), se utilizó un total de 4 tratamientos y 6 réplicas por tratamiento. Finalmente, para lisozima se hizo uso de estadística descriptiva, donde se realizó un diagrama de barras con error estándar donde se visualizó la media y su error. Para determinar las diferencias entre capacidad de inhibición de las cepas lácticas y su sobrenadante se utilizó un diseño completamente al azar con 5 réplicas, donde se tomaron 60 mediciones de inhibición para cada cepa láctica y para cada cepa patógena. Todos los análisis de inferencias estadísticas se realizaron con un nivel de significancia del 95 %. Los datos se recopilaron y organizaron en Microsoft Excel y para su análisis se procesó la información en el paquete estadístico R. Versión 14.0. (2019). Las diferencias de medias de los diferentes tratamientos se determinaron mediante la prueba paramétrica de Tukey.

## RESULTADOS

Los resultados registrados para *L. gasseri* en la cinética de fermentación se encuentran en la figura 1, y permiten concluir que la fase exponencial en los medios MRS y PRO se alcanzó en el tiempo 4 (8:50 horas). El análisis de medidas repetidas mostró que no existen diferencias significativas entre los medios ( $p > 0,05$ ), mientras que el tiempo (horas) mostró diferencias ( $p < 0,05$ ). En este sentido, la interacción no fue significativa entre el tiempo y los medios ( $p > 0,05$ ). En la determinación de pH se pudo observar un valor en la fase exponencial de los medios MRS y PRO de 4,24 y 4,26 respectivamente, el análisis de varianza demostró que existen diferencias entre medios, de igual manera se encontró que existen diferencias entre horas. La producción de proteína en los medios MRS y PRO presentó valores en la fase logarítmica de 7,32 mg/L y 6,42 mg/L respectivamente. El consumo de azúcar en los medios MRS y PRO presentó valores en la fase logarítmica de 3,14 mg/L y 3,3 mg/L respectivamente. En la determinación de porcentaje de producción de ácido láctico, se presentaron valores iniciales y finales de 0,55–1,74 en el medio MRS y de 0,50–1,73 en el medio PRO. Para la velocidad específica de crecimiento  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ) se encontraron valores de 0,850 y 0,780 y un tiempo de duplicación celular de 48,91 y 53,31 (min) en los medios MRS y PRO.

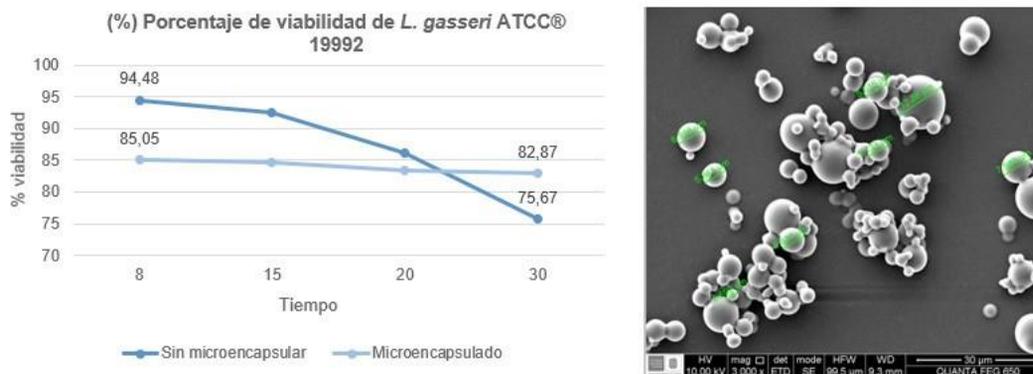


**Figura 1.** Parámetros cinéticos de *L. gasseri* en dos medios de cultivo.

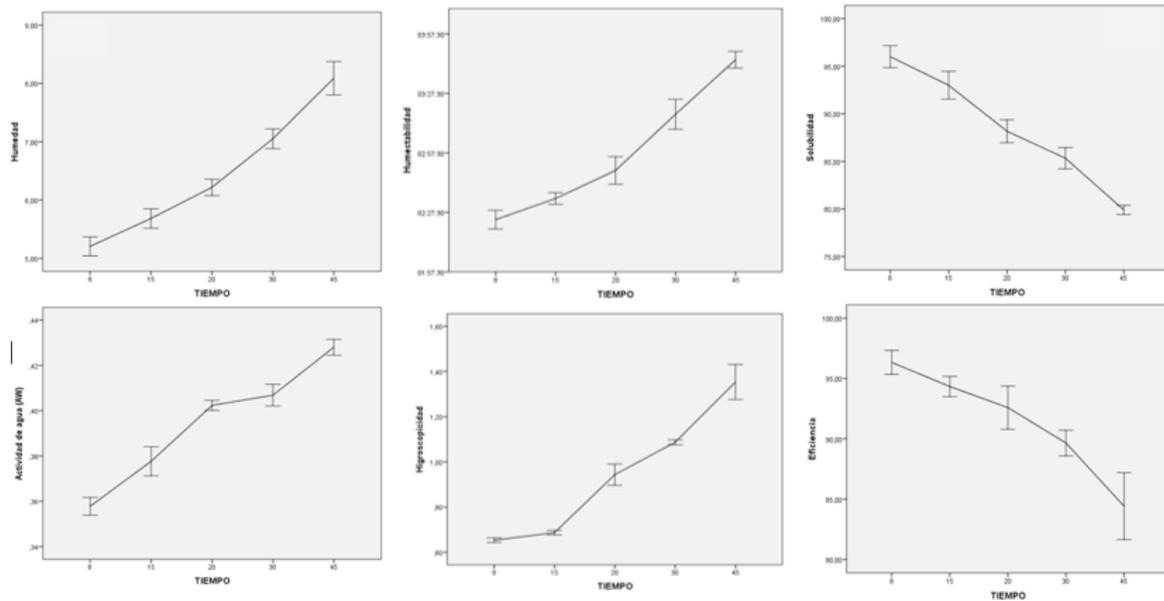
Para elaborar alimentos fermentados con organismos probióticos es importante considerar que el alimento contenga todos los nutrientes para que este sea utilizado directamente como sustrato para el crecimiento del organismo (Sánchez, Barragán y Serna, 2019). Así pues, la leche de vaca contiene galactooligosacáridos, siendo ésta una sustancia prebiótica que confiere beneficio en la salud del huésped, asociado con la modulación de la microbiota, por lo que deben de cumplir requisitos como no ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto gastrointestinal y ser fermentado selectivamente en el colon por un número limitado de bacterias con potencial benéfico (principalmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) (Taco y García-Godos, 2021). Por su parte, la leche de soya es una buena fuente de hidratos de carbono, principalmente sacarosa, rafinosa y estaquiosa,

así como proteínas, magnesio, calcio, hierro, fósforo, potasio y zinc, también es una buena fuente de vitaminas, como el complejo B, C y E, por lo que la soja se considera una excelente alternativa para desarrollar alimentos funcionales (Mendoza-Avenida, 2019). Los ingredientes antes mencionados hacen parte del medio PRO, sumado a este hecho, un ingrediente que se incorporó fue la inulina más extensivamente estudiada es su comportamiento como prebiótico, se sabe que previenen la colonización del intestino humano por microorganismos patógenos porque estimulan el crecimiento de bacterias beneficiosas como bifidobacterias y lactobacilos que pueden clasificarse como comensales intestinales beneficiosos (Armas, Martínez y Pérez, 2019). García-Gutiérrez *et al.* (2020) encontraron al evaluar a *L. gasseri* LM19 en 20 mL de MRS preparado sin glucosa unos crecimientos de 7,30, 7,31 y 7,47 log<sup>10</sup> UFC/mL a las 24 h. La BAL en estudio es un microorganismo que, bajo óptimas condiciones de crecimiento, puede llegar a tener una velocidad máxima específica ( $\mu_{max}$  h<sup>-1</sup>) de crecimiento mayor a 0,5  $\mu_{max}$  h<sup>-1</sup> dependiendo de variables como la temperatura, pH y de la concentración del sustrato y del producto. Al respecto, Parra-Huertas (2010) (citado por Armoa-Rojas, 2020) afirma que los lactobacilos son microorganismos que son capaces de fermentar monosacáridos o polisacáridos para transformarlos en ácidos como láctico, cítrico, propiónico, EPS, bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, endulzantes no calóricos, vitaminas, bebidas lácteas, ensilados, formación de sabores y aromas deseables, maduración de quesos, entre otros. Ahora bien, en las determinaciones de pH y ácido láctico, fue posible observar que existió una relación inversa entre el pH y la acidez, así pues, a medida que asciende el porcentaje de acidez en el medio, atribuido predominantemente al ácido láctico, el porcentaje de pH desciende, este efecto se encontró en la BAL en los dos medios trabajados. De esta manera, la consecuente disminución del pH tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos patógenos o alterantes en el producto, ya que muy pocas bacterias son capaces de crecer en los niveles de pH alcanzados por la acción de las BAL.

En el proceso de microencapsulación de la cepa láctica resultó determinante no solo la técnica de secado por aspersion, si no, los materiales micro encapsulantes. Este recubrimiento jugó un papel importante en la protección y viabilidad de los microorganismos para incrementar su capacidad de resistir las diferentes barreras fisiológicas simuladas del TGI. Se encontró un tamaño de capsula con un valor mínimo de 2,69  $\mu$ m y un valor máximo de 12,26  $\mu$ m, encontrando diferencias significativas entre la cepa sin microencapsular y microencapsulada ( $p < 0,05$ ). Se observó además que existió un descenso de la viabilidad a través del tiempo ( $p < 0,05$ ) (figura 2). En la figura 3 se muestra la tendencia ascendente del porcentaje de humedad (%) con valores iniciales de 5,37 y finales de 8,6, de actividad de agua ( $A_w$  %) con valores iniciales de 0,353 y finales de 0,425 %, de humectabilidad (min) con valores iniciales de 2:22 y finales de 3:47 min e higroscopicidad (g humedad/100 g de sólido seco) con valores iniciales de 0,66 y finales de 1,5 g humedad/100 g de sólido seco. A diferencia de los parámetros anteriores el porcentaje de solubilidad (%) mostraron una tendencia decreciente, con valores iniciales de 97 y valores finales de 79,3 % y en la eficiencia del microencapsulado (%) se encontraron valores iniciales de 97 y valores finales de 79,9 %.



**Figura 2.** Porcentaje de viabilidad de *L. gasseri* sin microencapsular y microencapsulada y microfotografía electrónica.



**Figura 3.** Variables de caracterización física de *L. gasseri* microencapsulada.

El factor más importante en la microencapsulación es la viabilidad y estabilidad de los microorganismos microencapsulados, y estuvo condicionada por diversos factores, como las propiedades físicas de los mismos; en la evaluación de éstas, se obtuvieron resultados variables. La actividad de agua del polvo, pese a su alta higroscopicidad, permaneció estable durante el almacenamiento, lo cual contribuyó a la estabilidad del polvo de la BAL. Según Fritzen-Freire *et al.* (2013) (citado por Rosolen-Dutra *et al.*, 2019) podría ser afectado por el tamaño de partícula al relacionar la superficie externa frente a la adsorción de agua del ambiente. La humedad de las muestras no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), sin embargo, son más altas que algunas reportadas, debido posiblemente a la temperatura de secado, sin embargo, Arepally *et al.* (2020), y coincidiendo con lo reportado en la presente investigación, encontraron valores de humedad del polvo probiótico encapsulado de *L. acidophilus* en un rango de 4,59 a 9,05 %. Al respecto, Lapsiri, Bhandari y Wanchaitanawong (2013) (citado por Sun *et al.*, 2020) mencionan que la composición de la solución encapsuladora es relevante porque puede minimizar los efectos del tratamiento térmico, mejorando la supervivencia durante el secado y la viabilidad durante el almacenamiento. Varios agentes encapsulantes (maltodextrina, proteínas, leche desnatada reconstituida, polisacáridos, entre otros) se han utilizado para proteger a los probióticos del daño térmico y la deshidratación durante el secado por aspersión, mantener su estabilidad durante el almacenamiento y su viabilidad en las condiciones gastrointestinales del huésped.

En la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas se encontraron aceptables valores de crecimiento entre  $2,8 \times 10^7$  y  $3,3 \times 10^9$  UFC/mL y buena supervivencia microbiana de la BAL en la fase gástrica (pH 3,0). En la determinación de resistencia a lisozima, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las diversas concentraciones de lisozima ( $p < 0,05$ ). Respecto a las variables pH (pH 5,0 y 7,0) y sales biliares (0,3 y 1,0 %), correspondientes a la fase intestinal, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los niveles evaluados, así como tampoco se observó un efecto de interacción significativo. Lo anterior, demuestra que la variable crecimiento fue similar en todos los niveles evaluados. Para el caso de la bilis (0,3 y 0,5%) y pH (5,0 y 7,0) los resultados estadísticos mostraron que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Crecimiento de *L. gasseri* a diferentes niveles de pH, sales biliares y bilis.

pH	Sales biliares (%)	Media (LN UFC/mL)	EEM	Intervalo confianza (95 %)	
				Mínimo	Máximo
5,0	0,3	19,291 a	0,351	18,591	19,991
	1,0	19,217 a	0,351	18,517	19,917
7,0	0,3	19,051 a	0,351	18,351	19,751
	1,0	18,934 a	0,351	18,234	19,634
pH	Bilis (%)	Media (LN UFC/mL)	EEM	Intervalo Confianza (95 %)	
				Mínimo	Máximo
5,0	0,3	17,923 a	0,349	17,229	18,618
	0,5	18,838 a	0,349	18,143	19,532
7,0	0,3	18,762 a	0,349	18,067	19,456
	0,5	18,550 a	0,349	17,856	19,245
Superíndices diferentes muestran diferencias estadísticas significativas (p<0,05)					

En los ensayos de la resistencia a las condiciones gastrointestinales *in vitro*, la BAL en estudio evidenció una tendencia de supervivencia a las mismas, superando las barreras enzimáticas fisiológicas encontradas en el TGI, atribuido a la protección térmica y de pared del material micro encapsulante, así como también, a que *L. gasseri* es un microorganismo aislado del TGI y el tracto vaginal del ser humano, por lo tanto, tiene la capacidad de desarrollarse y establecerse en condiciones, que para otros microorganismos pudiesen resultar desafiantes. Chavarrí *et al.* (2010) (citado por Liu *et al.*, 2019) reportaron para *L. gasseri* un porcentaje de viabilidad en condiciones gástricas con un jugo gástrico simulado ajustado a un pH 2,0 de 95 % a los 0 minutos y un porcentaje de 92 % a los 120 minutos, con un crecimiento limite a este tiempo de  $10^7$  UFC/mL y un valor de viabilidad en jugos intestinales simulados ajustados a pH 7,5 de 7,03 Log UFC/mL a los 0 minutos y un valor de 6,95 Log UFC/mL a los 120 minutos. Fuenzalida *et al.* (2021) señalan que, uno de los requisitos importante para determinar la utilización de los *Lactobacillus* como probiótico, es que las cepas sean capaces de adherirse a las células intestinales ya que constituye un prerrequisito para la colonización, dichos *Lactobacillus* deben soportar las barreras potenciales tales como pH del estómago, presencia de bilis y las interacciones con otros microorganismos presentes en el TGI, por tanto, se requieren cepas ácido-tolerantes a extractos gástricos y fluidos duodenales.

En el establecimiento de la concentración mínima inhibitoria en los diferentes métodos frente a las cepas patógenas, se encontró para *L. gasseri* frente a los microorganismos patógenos, diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (p<0,05). Como se puede observar en la figura 5, presentó mayor tamaño de inhibición en el método con disco de agar, seguido por el método PADS y finalmente los métodos de pozos, siendo estos últimos similares entre sí. Los resultados indicaron que las tres concentraciones son similares, dado que no existieron diferencias significativas (p>0,05). En la verificación de producción de EPS se encontró un resultado positivo cuando se sometió a la condición de 28 °C durante 7 días en los medios propuestos, en las otras condiciones a pesar de presentar crecimiento bacteriano, no se observó la formación de colonia mucoide, por lo tanto, se reportó como negativo. En la figura 6, se presenta la formación en caja de Petri de colonia mucoide alrededor de los discos de papel PADS, adicionalmente se observó un crecimiento característico de la BAL, atribuido al periodo de tiempo que se dejaron en incubación, igualmente, se puede observar la precipitación de la colonia mucoide en alcohol absoluto como confirmación de la producción de EPS.

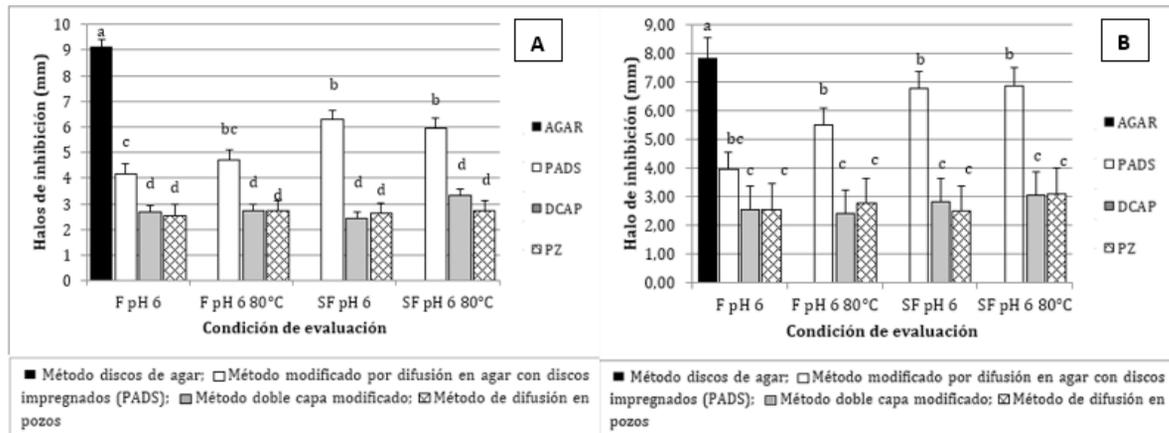


Figura 5. Determinación de los halos de inhibición para *L. gasseri* frente a *S. aureus* (A) y *L. monocytogenes* (B).



Figura 6. Producción de EPS en la cepa láctica.

Gunyakti y Asan-Ozusaglam (2019) encontraron para *L. gasseri* aislada de leche materna, diámetros de halos de inhibición para *E. coli* O157:H7 de 3,5 mm, *S. aureus* ATCC 25923 de 8,20 mm, *L. monocytogenes* ATCC 7644 de 14,19 mm, *Y. enterocolitica* NCTC 11175 de 5,08 mm, entre otros. Por lo tanto, se espera que una cepa que se defina como un cultivo probiótico inhiba el desarrollo de microorganismos patógenos mediante la secreción de diversas sustancias antimicrobianas en un hábitat colonizado, por su parte, los EPS tienen también pertinencia en dicha actividad antimicrobiana. Otra finalidad para los EPS derivados de BAL es su uso en la industria alimentaria como emulsionantes, estabilizadores, espesantes, agentes gelificantes; así como para retener humedad, para influir en la reología, firmeza y sinéresis y para mejorar la textura las propiedades sensoriales, también pueden inducir actividades antimicrobianas y antioxidantes beneficiosas que aumentan aún más su potencial de aplicación en la industria alimentaria (Abid *et al.*, 2021).

Finalmente, en el cuadro 2, se presentan los ensayos de susceptibilidad de agentes antimicrobianos-discos deantibióticos para antibiograma, donde se encontró para la cepa láctica un perfil de resistencia frente a penicilina, cefalotina, ciprofloxacina, gentamicina y dicloxacilina. Respecto a las cepas patógenas, también se encontró una resistencia importante a antibióticos como cefatoxime, ampicilina, penicilina, cefalotina ciprofloxacina,

dicloxacilina, vancomicina y florfenicol. Como criterio para estimar el halo de medición se tomó lo establecido por The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y por el manual de antibiograma de LABORCLIN.

**Cuadro 2.** Ensayos de susceptibilidad frente a agentes antimicrobianos de la cepa láctica y patógenas.

Antibiótico	L. gasseri		S. aureus		L. monocytogenes	
	(mm)	Nivel	(mm)	Nivel	(mm)	Nivel
<b>Cefatoxime (CTX) 30 µg</b>	26	S <sup>a</sup>	23	R <sup>b</sup>	21	R <sup>c</sup>
Vancomicina (VAN) 5 µg	21	S <sup>a</sup>	32	S <sup>b</sup>	18	R <sup>b</sup>
Ampicilina (AMP) 10 µg,	15	I <sup>a</sup>	-	R <sup>b</sup>	32	S <sup>c</sup>
Penicilina (P) 10 IU	5	R <sup>a</sup>	-	R <sup>b</sup>	36	S <sup>c</sup>
Cefalotina (KF) 30 µg	-	R <sup>ab</sup>	14	R <sup>b</sup>	12	R <sup>c</sup>
Ciprofloxacina (CIP) 5 µg	2	R <sup>a</sup>	22	S <sup>ba</sup>	14	R <sup>c</sup>
<b>Gentamicina (CN) 10 µg</b>	12	R <sup>a</sup>	24	S <sup>b</sup>	32	S <sup>cb</sup>
Dicloxacilina (DCX) 1 µg	-	R <sup>a</sup>	-	R <sup>b</sup>	-	R <sup>c</sup>
<b>Florfenicol (FFC) 3 µg</b>	31	S <sup>a</sup>	21	R <sup>b</sup>	15	R <sup>c</sup>
Meticilina (ME) 5 µg	22	S <sup>a</sup>	12	S <sup>b</sup>	23	S <sup>c</sup>

Nivel: S: sensible; I: intermedio; R: resistente; a. CLSI (2012); b. LABORCLIN (2013); c. CLSI (2007).

En contraste con lo encontrado en la presente investigación, autores como Gunyakti y Ozusaglam (2019) reportaron para *L. gasseri* MA-4 un perfil de sensibilidad a ampicilina (10 µg), amoxicilina (30 µg) y penicilina (10 µg) y un perfil de resistencia a gentamicina (10 µg). Según la literatura, las especies de *Lactobacillus* aisladas de diversas fuentes, se observaron más comúnmente como susceptibles a los antibióticos β-lactamasas como la amoxicilina, ampicilina, penicilina G y cloxacilina (Campedelli *et al.*, 2019), también suelen presentar propiedades de resistencia intrínseca (no transmisible) hacia los aminoglucósidos (amikacina, kanamicina y gentamicina) y el grupo de las quinolonas (ácido nalidíxico y ofloxacina) (Yang *et al.*, 2019). En algunos otros estudios, la susceptibilidad a los antibióticos ha sido como un criterio importante para que una cepa sea un buen probiótico, por su parte, Alarjani *et al.* (2021) observaron al evaluar la susceptibilidad a agentes antimicrobianos para *S. aureus*, que más del 35 % de las cepas bacterianas de *S. aureus* aisladas mostraron resistencia a la vancomicina, la penicilina y la eritromicina. Estudios recientes han demostrado que *S. aureus* asociados con la infección por el virus de la gripe aumenta el riesgo de neumonía y la consiguiente mortalidad (Jia *et al.*, 2019). Dentro de los antimicrobianos más frecuentemente implicados en mecanismos de resistencia se encuentran las tetraciclinas y gentamicina, seguido por otros antimicrobianos como penicilina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim. La prevalencia de estos aislados de *Listeria* spp. resistentes a los antibióticos en las producciones ganaderas es extremadamente peligrosa, ya que pueden transferirse fácilmente tanto a los seres humanos como a los animales. La resistencia a la tetraciclina en *L. monocytogenes* se debe principalmente a los plásmidos conjugativos y transposones originados de *Enterococcus* o *Streptococcus*, donde los genes de resistencia implicados son tetS, tetM y tetL. Cabe recordar que el proceso de conjugación incluye contacto directo de célula a célula, formación de pares de apareamiento y transferencia de ADN plasmídico a través de un pili conjugativo, además, se menciona que la adquisición del material genético móvil tiene lugar en el tracto gastrointestinal de los humanos (Chokshi *et al.*, 2019).

## CONCLUSIONES

Se ha reportado en la literatura una importante evidencia del efecto benéfico y probiótico de las cepas lácticas en estudio, debido a su acción inhibitoria frente innumerables patógenos, comprendidos desde bacterias y virus hasta mohos y hongos, así como también su papel como psicobióticos al tener la capacidad, entre uno de

sus mecanismos, de influir en la producción de algunas hormonas que propician el bienestar general del hospedero. Así pues, el crecimiento de la cepa láctica en los medios de cultivo propuestos fue superior a  $3,0 \times 10^9$  UFC/mL y se observó que en los dos medios se alcanzaron fases logarítmicas similares, así como también una mejor producción de ácido láctico en el medio PRO. Respecto a la matriz microencapsulante, la elección de maltodextrina e inulina demostró tener un papel funcional como material de pared y con efecto prebiótico y termoprotector, favoreciendo la viabilidad de las cepas en almacenamiento y cuando se sometió a las mismas a condiciones gastrointestinales. Se encontró también un tamaño de capsula de acuerdo a los límites establecidos, con una superficie lisa y con ausencia de porosidad. Finalmente, se reportó un importante efecto inhibitorio de la BAL frente a las cepas patógenas, encontrando que este efecto en todos los métodos propuestos, sin embargo, los métodos con mejores halos de inhibición fueron: el método de discos de agar, y método de difusión en agar con discos impregnados (PADS). De acuerdo a lo anterior, es posible afirmar que la BAL en estudio corresponde como una alternativa inocua y altamente viable para su aplicación en producción animal, con el fin de, y enmarcados en la prevención y manejo, evitar morbilidad y mortalidad en los animales, así como también en la industria alimentaria para efectos de conservación e inhibición de patógenos potencialmente dañinos en la cadena alimentaria.

## REFERENCIAS

- ABID, YOUSRA; AZABOU, SAMIA; BLECKER, CRISTOPHE; GHARSALLAOUI, ADEM; CORSARO, MARIA M.; BESBES, SOHAIL; ATTIA, HAMADI. Rheological and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by potential probiotic *Leuconostoc citreum*-BMS strain. *Carbohydrate Polymers*, v. 256, 2021, p. 117-523.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117523>
- AHUMADA-FORIGUA, DIEGO A.; MORALES-ERAZO, LAURA V.; ABELLA-GAMBA, JOHANNA P.; GONZALEZ-CARDENAS, IVONNE A. Técnicas de titulación ácido-base: consideraciones metrológicas. *Revista Colombiana de Química*, v. 48, n. 1, 2019, p. 26-34.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v48n1.72401>
- ALARJANI, KHALOUD M.; ALMUTAIRI, ABEER M.; ALQAHTANY, FATMAH S.; SOUNDHARRAJAN, ILAVENIL. Methicillin and multidrug resistant pathogenic *Staphylococcus aureus* associated sepsis in hospitalized neonatal infections and antibiotic susceptibility. *Journal of infection and public health*, v. 14, n. 11, 2021, p. 1630-1634.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.08.031>
- AREPALLY, DIVYASREE; REDDY, RAVULA S.; GOSWAMI, TRIDIB K. Studies on survivability, storage stability of encapsulated spray dried probiotic powder. *Current Research in Food Science*, v. 3, 2020, p. 235-242.  
<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.09.001>
- ARMAS-RAMOS, RAÚL A.; MARTINEZ-GARCIA, DUNIESKY; PEREZ-CRUZ, ENRIQUE R. Fructanos tipo inulina: efecto en la microbiota intestinal, la obesidad y la sociedad. *Gaceta Médica Espirituana* [online]. v. 21, n. 2, 2019, p. 134-145.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S160889212019000200134&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S160889212019000200134&lng=es&nrm=iso)
- ARMOA-ROJAS, JISSEL M. Producción de exopolisacáridos a partir de bacterias ácido lácticas utilizando tusa de maíz como fuente de carbono [Tesis Maestría, Biotecnología industrial]. San Lorenzo (Paraguay): Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2020, 135 p.
- BAUER, A.; KIRBY, W.; SHERRIS, J.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, 1966, p. 493-496.  
[https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4\\_ts.493](https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493)
- CAMPEDELLI, ILENIA; MATHUR, D.; SALVETTI, ELISA; CLARKE, SIOBHÁN; REA, MARIA; TORRIANI, SANDRA; ROSS, PAUL; HILL, COLIN; O'TOOLE, PAUL W. Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and environmental microbiology*, v. 85, n. 1, 2018, e01738-18.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>

- CHOKSHI, AASTHA; SIFRI, ZIAD; CENNIMO, DAVID; HORNG, HELEN. Global Contributors to Antibiotic Resistance. *Journal of global infectious diseases*, v. 11, n. 1, 2019, p. 36–42.  
[https://doi.org/10.4103/jgid.jgid\\_110\\_18](https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_110_18)
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard. Twenty-second informational supplement. 2012. [https://clsi.org/media/2663/m100ed29\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf) [consultado octubre 20 de 2021].
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth informational supplement. 2007.  
[https://webstore.ansi.org/preview-pages/CLSI/preview\\_M100-S17.pdf](https://webstore.ansi.org/preview-pages/CLSI/preview_M100-S17.pdf) [consultado octubre 20 de 2021].
- CRUEGER, WULF; CRUEGER, ANNELIESE. *Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial*. 3 ed. Zaragoza (España): Editorial Acribia, 1993, 413 p, ISBN: 8420007439.
- DUBOIS, MICHEL; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, FRED. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, 1956, p. 350-356.  
<https://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/ac60111a017>
- ELINALVA, MACIEL P.; MURILO, PINHO V.; OLIVEIRA, IVELISE; AFFE, HELEN; NASCIMENTO, ROSELY; SOARES-DE MELO, ITAMAR; DE ABREU-ROQUE, MILTON R.; DE ASSIS, SANDRA. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology*, v. 32, n. 4, 2012, p. 710-714.  
<https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000094>
- FREUDIG, BARBARA; HOGEKAMP, STEFAN; SCHUBERT, HELMAR. Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. *Chemical Engineering and Processing*, v. 38, n. 4-6, 1999, p. 525–532.
- FUENZALIDA, CATALINA; DUFEU, MARIA S.; PONIACHIK, JAIME; ROBLERO, JUAN P.; VALENZUELA-PÉREZ, LUCÍA; BELTRÁN, CAROLL J. Probiotics-Based Treatment as an Integral Approach for Alcohol Use Disorder in Alcoholic Liver Disease. *Frontiers in pharmacology*, v.12, 729950.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.729950>
- HATHI, ZUBEEN; METTU, SRINIVAS; PRIYA, ANSHU; ATHUKORALALAGE, SANDYA; LAM, TSZ N.; CHOUDHURY, NAMITA R.; DUTTA, NABA; EL-OMAR, EMAD; GONG, LAN; MOHAN, GEETHAANJALI; LIN, CAROL S. Methodological advances and challenges in probiotic bacteria production: Ongoing strategies and future perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, v. 176, 2021, 108199.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108199>
- GARCÍA-GUTIÉRREZ, ENRIQUETA; O'CONNOR, PAULA M.; COLQUHOUN, IAN J.; VIOR, NATALIA M.; RODRÍGUEZ, JUAN M.; MAYER, MELINDA J.; COTTER, PAUL D.; NARBAD, ARJAN. Production of multiple bacteriocins, including the novel bacteriocin gassericin M, by *Lactobacillus gasseri* LM19, a strain isolated from human milk. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 104, n. 9, 2020, p. 3869–3884.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10493-3>
- GONZÁLEZ, RAFAEL E.; MENDOZA, JAIME; MORÓN, LENA B. Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. *Información Tecnológica*, v. 26, n. 5, 2015, p.11-16.  
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642015000500003>
- GUIMARÃES, DANIEL P.; COSTA, F.A.A.; RODRIGUES, MARIA I.; MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 16, n. 2, 1999, p. 129-139.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66321999000200004>
- GUNYAKTI, AYSE; ASAN-OZUSAGLAM, MELTEM. *Lactobacillus gasseri* from human milk with probiotic potential and some technological properties. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie- Food Science and Technology*, v. 109, 2019, p. 261-269.  
<https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.043>

- JIA, LEILI; ZHAO, JIANGYUN; YANG, CHAOJIE; LIANG, YUANG; LONG, PENGWEI; LIU, XIAO; QIU, SHAOFU; WANG, LIGUI; XIE, JING; LI, HAO; LIU, HONGBO; GUO, WEIGUANG; WANG, SHAN; LI, PENG; ZHU, BINGHUA; HAO, RONGZHANG; MA, HUI; JIANG, YONG; SONG, HONGBIN. Severe pneumonia caused by coinfection with influenza virus followed by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Induces Higher Mortality in Mice. *Frontiers in immunology*, v. 9, 2019, 3189.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03189>
- JURADO-GÁMEZ, HENRY A.; ROMERO-BENAVIDES, DARIO A.; MORILLO-GARCÉS, JAIRO A. Inhibición de *Lactobacillus gasseri* SOBRE *Yersinia pseudotuberculosis* bajo condiciones in vitro. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, v. 63, n. 2, 2016, p. 95-112.  
<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v63n2.59357>
- LABORCLIN. Manual de antibiograma. 2013. <https://docplayer.com.br/12054382-Antibiograma-rev-07-03-2013-laborclin-produtos-para-laboratorios-Itda-rua-casemiro-de-abreu-521-cep-83-321-210-0800-410027-sac-laborclin-com.html> [consultado octubre 20 de 2021].
- LIU, HUAN; CUI, STEVE W.; CHEN, MAOSHEN; LI, YUE; LIANG, RONG; XU, FEIFEI Y.; ZHONG, FANG. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 59, n. 17, 2019, p. 2863-2878.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1377684>
- LOURENÇO, JEFERSON M.; SEIDEL, DARREN S.; CALLAWAY, TODD R. *Improving Gut Health in Poultry: Part 2. Antibiotics and gut function: historical and current perspectives*. Cambridge (United Kingdom): Burleigh Dodds Science Publishing Ltd, 2019, 546 p., ISBN-13: 9781786763044.
- MADIGAN, MICHAEL T.; MARTINKO, JOHN M.; PARKER, J. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8 ed. Madrid (España): Pearson Prentice Hall, 1999, 2009, 1296 p., ISBN: 0135712254.
- MENDOZA-AVENDAÑO, CLAUDIA; MEZA-GORDILLO, ROCIO; OVANDO-CHACÓN, SANDY. Evaluación de Compuestos Bioactivos y Antinutricionales durante la fermentación con leche de soja con *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG y *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, v. 18, n. 3, 2019, p.  
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Mendoza>
- RICKE, STEVEN C.; CANTO, EN LEE; SUN, KIM; PARK, SI HONG; ZHAOHAO, SHI. Prebiotics and the poultry gastrointestinal tract microbiome, *Poultry Science*, v. 99, n. 2, 2020, p. 670-677.  
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.018>
- RODRÍGUEZ-BARONA, SNEYDER; MONTES, LUZ M.; DE J. RAMÍREZ, DIÓGENES. Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión en presencia de prebióticos. *Vitae*, v. 19, n. 1, 2012, p. 186-188.  
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914053>
- RODRÍGUEZ-BARONA, SNEYDER; GIRALDO, GLORIA I.; MONTES, LUZ M. Encapsulación de probióticos por liofilización en presencia de prebióticos. *Información tecnológica*, v. 27, n. 6, 2016, p. 135-144.  
<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014>
- RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; BUENO, G.; RODRÍGUEZ, D.; DELGADO, G.; SERRANO, P.; BRIZUELA, M. True and Apparent Yields and Maintenance Coefficient and Their Significance on Fermentation Kinetics. *New Horizons in Biotechnology*, v.15, 2003, p. 163-172.  
[https://doi.org/10.1007/978-94-017-0203-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0203-4_15)
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, MARIA. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora [Tesis Ph.D. en Ciencias]. Barcelona (España): Universitat Autònoma de Barcelona, Facultad de Biociencias, 2009, 197 p.
- ROSOLEN, MICHELE D.; BORDINI, FERNANDA W.; DE OLIVEIRA, PATRICIA D.; CONCEIÇÃO, FABRICIO R.; POHNDORF, RICARDO S.; FIORENTINI, ÂNGELA M.; DA SILVA, WLADIMIR; PIENIZ, SIMONE. Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science and Technology*, v. 115, 2019, 108411.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411>

- SABIO, LAURA; GONZÁLEZ, ANA; GLORIA, B.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, JOSÉ; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, OSCAR; BAÑUELO-OLIVARES, MÓNICA; GÁLVEZ, NATIVIDAD; DELGADO-LÓPEZ, JOSÉ M.; DOMINGUEZ-VERA, JOSE M. Probiotic cellulose: Antibiotic-free biomaterials with enhanced antibacterial activity. *Acta Biomaterialia*, v. 124, 2021, p. 244-253.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.039>
- SÁNCHEZ, ÓSCAR, J.; BARRAGÁN, PEDRO, J.; SERNA, LILIANA. Revisión de *Lactobacillus* en la industria alimentaria y sus medios de cultivo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 21, n. 2, 2019, p. 63-76.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.81576>
- SHI, ZHAOHAO; ROTHROCK, MICHAEL; RICKE, STEVEN. Applications of Microbiome Analyses in Alternative Poultry Broiler Production Systems. *Frontiers in veterinary science*, v. 6, 2019, p.157.  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00157>
- TACO, KATHERIN, R.; GARCÍA-GODOS, PAULA. Optimización de parámetros para la elaboración de leche ácida con *Lactobacillus acidophilus*. *Información tecnológica*, v. 32, n. 1, 2021, p. 179-186.  
<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642021000100179>
- TAGG, J.; MCGIVEN, A. Assay system for bacteriocins. *Applied microbiology*, v. 21, n. 5, 1971, p. 943.  
<https://doi.org/10.1128/am.21.5.943-943.1971>
- YANG, FENG; ZHANG, SHIDONG; SHANG, XIAOFEI; WANG, XURONG; YAN, ZUOTING; LI, HONGSHENG; LI, JIANXI. Short communication: Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *Journal of dairy science*, v. 102, n. 1, 2019, p. 140-144.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14576>