

**ACTIVIDAD *in vitro* DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS (*Bacillus subtilis* Y *Lactobacillus brevis*) PARA REDUCIR LA COLONIZACIÓN DE *Salmonella entérica***

Fátima Arteaga-Chávez, Lilian Fuentes-Osorio y Ernesto Hurtado

Carrera de Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria  
Manuel Félix López, Ecuador

Email: [farteaga@espam.edu.ec](mailto:farteaga@espam.edu.ec)

Se determinó la actividad *in vitro* de microorganismos autóctonos (*Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis* y la mezcla de ambos) para reducir la colonización de *Salmonella entérica*. Se utilizó un DCA con arreglo factorial (3x3) siendo los factores los microorganismos y métodos de difusión (directo, filtrado y diluido) en la inhibición del enfrentamiento de microorganismos, con el uso de la técnica Kirby-Bauer. La supervivencia en sales biliares realizada por el conteo de UFC, bajo un diseño que contó con cuatro tratamientos y la curva de crecimiento se realizó mediante la estadística descriptiva arrojada por la absorbancia del espectrómetro UV (longitud de onda 560 nm). Los microorganismos con aplicación de tres métodos frente a *Salmonella entérica* tuvieron un crecimiento favorable a las 24 horas, obteniendo un mayor desarrollo con *Lactobacillus brevis* + *Bacillus subtilis* por método de filtración. La supervivencia a sales biliares, no se encontró variabilidad de resultados. Sin embargo, el *Lactobacillus brevis* sin sales biliares se destacó desde el minuto 30 hasta el minuto 120. Se observó en la curva de crecimiento, *Lactobacillus brevis* tuvo un mayor desarrollo a la hora 20, con un declive de entre 24 a 32 horas, mientras que el *Bacillus subtilis* tuvo un mayor crecimiento a las 24 horas, disminuyendo su actividad a las 28 y 32 horas siendo superior al *Lactobacillus brevis*. Se concluye que ambos microorganismos cumplen con características físicas y biológicas, siendo alternativas idóneas para ser utilizados como probióticos en alimentación animal con fines en la producción animal.

**PALABRAS CLAVE:** Bacterias, probióticos, sales biliares, halos de inhibición, curva de crecimiento.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales son muy frecuentes en estos tiempos, principalmente por el consumo de alimentos, como leche y grasa. Además, ocasionadas por la presencia de bacterias, parásitos y virus. Hernández *et al.* (2013) mencionan que estas son unos de los principales problemas de salud pública en el Ecuador que, se transmiten por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Mientras que, en el sector pecuario Agrocalidad (2013) reporta que el país actualmente no cuenta con ningún programa oficial para el control, prevención y peor aún la erradicación de las principales enfermedades que afectan a los animales.

Los probióticos son una alternativa para desarrollar una colonización microbiológica efectiva del tracto digestivo de los animales mejorando la producción, el desconocimiento de los beneficios de las bacterias probióticas en la productividad hace que estas no sean muy utilizadas por los productores pecuarios y por lo tanto no se favorezcan de las propiedades de estos microorganismos (Enríquez, 2012).

García *et al.* (2014) indican que los probióticos deben reunir las siguientes características: No ser sensibles a las enzimas gastrointestinales, ser estables frente a ácidos y bilis, no conjugarse con sales biliares, poseer capacidad para adherirse a las superficies epiteliales, sobrevivir en el ecosistema intestinal, producir sustancias antimicrobianas y tener capacidad de crecimiento rápido en las condiciones del intestino grueso.

Se han realizado investigaciones *in vitro* sobre la actividad antagonista de los probióticos frente a cepas patógenas; los cuales antes de ser usados deben pasar por un proceso de selección en los cuales se consideran varios aspectos incluyendo características funcionales como: viabilidad, persistencia en el tracto intestinal, inmunomodulación y propiedades antagonistas; estas características de funcionalidad se establecen en los laboratorios con pruebas *in vitro* (González *et al.*, 2016).

La trazabilidad y residuos de fármacos en los productos de tipo animal, significan un problema en la industria animal; donde gracias al uso de probióticos como *B. subtilis* se han podido reducir estos remanentes y poder propiciar un microbiota

intestinal adecuada y poder estimular la inmunidad del animal y el control de bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella* (Patiño, 2019). Mientras que Tobón *et al.* (2020) señalan la existencia de numerosos investigadores que han informado de la capacidad de las bacterias del ácido láctico para producir sustancias antimicrobianas activas contra ciertos organismos patógenos y de descomposición en varios ecosistemas, lo que resulta en un cambio de la población bacteriana en su microambiente.

Ante lo expuesto, se planteó el presente trabajo cuyo objetivo fue evaluar la actividad *in vitro* de microorganismos autóctonos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*) para reducir la colonización de *Salmonella entérica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación

El desarrollo de esta investigación se efectuó en la Unidad de Docencia, Investigación y Vinculación del Laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria perteneciente a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” ubicada en el sitio el Limón en la ciudad de Calceta, Manabí, Ecuador.

### Manejo de las cepas de microorganismos a nivel de laboratorio

Se prepararon medios de cultivo en Caldo MRS (Titanium), Caldo Nutriente (Difco™) y Caldo Selenito para la inoculación *Lactobacillus brevis* (40 LP), *Bacillus subtilis* (20BP) y *Salmonella entérica* (ATCC 13076), respectivamente. Previamente las cepas fueron retiradas de la refrigeradora -20°C y colocadas en refrigeradora a 4°C, con la finalidad de evitar un shock térmico.

La crioconservación de las cepas de *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis*, se realizó bajo centrifugación (1000 rpm/min) de 2 mL de las cepas reactivadas en Eppendorf, se eliminó el sobrenadante y se dejó la sustancia activa, posterior un lavado con 1 mL de agua Peptonada en cada Eppendorf, nuevamente se centrifugó con el retiro del sobrenadante. En la cepa *Lactobacillus brevis* se colocó 1 mL de glicerol al (3%) y 500 µl de leche semidescremada, mientras que

*Bacillus subtilis* se colocó glicerol al 3%; ambas fueron conservados en refrigeradora a -2°C.

### **Inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus brevis* y la mezcla (*Bacillus subtilis* + *Lactobacillus brevis*) frente a *Salmonella entérica* en los distintos métodos**

El Método de Difusión Directo, se transfirió a partir del inóculo de *Salmonella entérica* 1 mL y se procedió a realizar diluciones seriadas en base 10 (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>). A partir de la dilución 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup> se tomó 1mL de *Salmonella entérica* y se la colocó en Agar (Mueller Hinton y MRS) y con el asa de Drigalsky se difundió por toda la caja Petri, dejando reposar por 10 minutos. Transcurridos se realizaron los pocillos sobre la superficie de los agares con ayuda de sorbete de plástico estéril de aproximadamente 6 mm de diámetro, y en cada uno de los pocillos se vertieron 100 µL de *Lactobacillus brevis*, en otros pocillos 100 µL de *Bacillus subtilis*, así mismo en un mismo pocillo se inoculó 50 µL de *Lactobacillus brevis* + 50 µL de *Bacillus subtilis*.

Para la aplicación del Método de Difusión Filtrado, se colocó 1 mL de *Salmonella entérica* en los Agares: Mueller Hinton y MRS, se hicieron los pocillos sobre la superficie de los agares con ayuda de sorbete de plástico estéril de aproximadamente 6 mm de diámetro. Para la obtención de los extractos bacterianos (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus brevis*), se aplicó 1 mL de la cepa reactivada (*Lactobacillus brevis*) en Eppendorf, cada inóculo fue centrifugado a 6.000 rpm durante 5min. Después de centrifugar se filtró el sobrenadante con un filtro bacteriológico Millipore® de 0,2 µm y una jeringa descartable de 5 mL, posteriormente se colocó los extractos de cada cepa en vasos de precipitación de 10 mL; por último, se inoculó el extracto en el pocillo correspondiente y se dejó reposar por 10 minutos y se incubó a 37°C por un tiempo de 24 horas, después de este tiempo se hizo la lectura de las placas por test Kirby Bauer.

La puesta en práctica del Método de Difusión Diluido, se basó en el empleo 1 mL de *Salmonella entérica* en los Agares: Mueller Hinton y MRS, con la realización de los pocillos sobre la superficie de los agares con ayuda de sorbete de plástico estéril de aproximadamente 6 mm de diámetro. La dilución con solución salina (0,85 g de NaCl en 100 mL de agua destilada estéril) a partir de los inóculos de

(*Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis*) se tomó 1 mL y se procedió a realizar diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ), una vez realizado esto, se tomó la última dilución y se la adicionó en el pocillo correspondiente. Se dejó reposar por 10 minutos y se incubó a 37°C por un tiempo de 24 horas, después de este tiempo se hizo la lectura de las placas por test Kirby Bauer.

Los halos de inhibición fueron medidos a través de una regla milimétrica, partiendo desde el pocillo de los microorganismos bajo estudio, hasta donde se inhibe el crecimiento. Para categorizar los niveles de susceptibilidad de los microorganismos frente al patógeno, se tomó en cuenta la siguiente categoría interpretativa: Sensible (un halo con una buena probabilidad de éxito,  $\geq 21$  mm); Intermedio (un halo de inhibición más reducido, 16 mm- 20 mm) y Resistente (Presenta muy poco o casi nada de halo,  $< 15$  mm).

### **Determinación de la curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis***

Se colocó 15 mL de Caldo MRS en 45 tubos para el crecimiento de *Lactobacillus brevis*, se aplicó 1 mL de la cepa reactivada en Eppendorf, se centrifugó a 1000 rpm/min. Después de centrifugar se eliminó el sobrenadante y se dejó la sustancia activa, se hizo un lavado con 1 mL de agua Peptonada en cada Eppendorf, se colocó en la centrifuga de nuevo a 1000 rpm/min, se volvió a retirar el sobrenadante y se inoculó 30  $\mu$ l de la cepa a los tubos Falcons con caldo MRS y se procedió a incubar registrando los tiempos de incubación, al momento de la hora de lectura se colocó 3  $\mu$ l de la cepa en una cubeta y se ubicó en el espectrofotómetro marca JENWAY 6305, para la lectura respectiva mediante la Absorbancia (ABS%). Mientras que para *Bacillus subtilis* se colocó 4000 mL de Caldo MRS en 40 matraces, donde se evaluaría el crecimiento, previamente se aplicó el procedimiento similar al empleado en la cepa *Lactobacillus brevis*.

### **Supervivencia de *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis* en sales biliares**

Se plaqueó 12 mL de Agar MRS (*Lactobacillus brevis*) Agar Nutriente (*Bacillus subtilis*) a las cajas Petri, se dejó solidificar, una vez preparado el material a utilizar, se colocó 1,5 mL de sales biliares (5%) en Caldo MRS y Caldo Nutriente, se colocó en tubos Falcons de 50 mL. Posteriormente en tubos Falcons de 15 mL se inoculó 5 mL de *Lactobacillus brevis* previamente centrifugando a 600 rpm

por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se colocó 5 mL de solución salina y se volvió a centrifugar 600 rpm por 5 minutos una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se colocó 3 mL de caldo MRS y se homogenizó en el vortex. Se inoculó en 15 tubos con 3 repeticiones por minutos (minuto 0, minutos 30, minutos 60, minutos 90, minutos 120 minutos) y se colocó en la incubadora a 37°C.

Una vez cumplido el tiempo esperado se realizó diluciones desde  $10^{-1}$  hasta la dilución  $10^{-7}$ , se procedió a sembrar en las cajas y se colocó la segunda capa. Se incubó a 37 °C durante 48 horas y se midió el crecimiento celular mediante unidades formadoras de colonias (UFC), a intervalos por minutos (minutos 0, minutos 30, minutos 60, minutos 90, minutos 120).

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Para el estudio de la inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos frente a *Salmonella* entérica, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 3x3, siendo los factores los microorganismos (*L. brevis*; *B. subtilis* y mezcla) métodos de difusión (directo, filtrado y diluido) y cuatro repeticiones. Mientras que, para la supervivencia en sales biliares realizada por el conteo de UFC, se organizó en un diseño factorial 2x2, contando con cuatro tratamientos y 12 repeticiones.

La variabilidad de la respuesta medible por el efecto de los factores fue analizada mediante un análisis de varianza, utilizando comparaciones de medias por medio de la prueba de Tukey al 5%. La curva de crecimiento se realizó mediante la estadística descriptiva obtenida por la absorbancia del espectrómetro UV (longitud de onda 560 nm). Los análisis fueron realizados con el software estadístico InfoStat (2017).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos frente a *Salmonella* entérica**

El análisis de varianza realizado en la inhibición del enfrentamiento de microorganismos benéficos frente a *Salmonella* entérica mediante diferentes métodos de difusión, resultó con un efecto altamente significativo ( $P < 0,0001$ ) en la interacción microorganismos x métodos. Se puede apreciar (Tabla 1) que las

bacterias que tuvieron un mejor desarrollo del halo inhibitorio se obtuvieron en la mezcla de las bacterias (*Bacillus subtilis* + *Lactobacillus brevis*) mediante el método de difusión de filtración y *Lactobacillus brevis* por método directo, con promedios de 29,33 ( $\pm$  2,70) y 22,00  $\pm$  (2,70) mm, respectivamente (P<0,05).

Tabla 1. Promedios de halos inhibitorios con la aplicación de diferentes métodos de infusión en cepas de *Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis* + *Bacillus subtilis* frente a *Salmonella* entérica

Microorganismos	Métodos	Promedios
<i>Lactobacillus brevis</i>	Directo	22,00 <sup>ab</sup>
	Filtración	13,67 <sup>c</sup>
	Dilución	17,33 <sup>bc</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	Directo	18,00 <sup>bc</sup>
	Filtración	18,00 <sup>bc</sup>
	Dilución	18,33 <sup>bc</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	Directo	17,33 <sup>bc</sup>
	Filtración	29,33 <sup>a</sup>
	Dilución	17,67 <sup>bc</sup>
EE	2,70	
P-valor	0,0001	

<sup>a,b,c</sup> Letras superíndices distintas en la columna difieren estadísticamente según Tukey (P<0,05).

Los resultados obtenidos en la presente investigación se muestran similares a los obtenidos por Vélez *et al.* (2015) donde expone que las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) crearon halos inhibitorios que mostraron la susceptibilidad al crecimiento de cepas de *Salmonella tiphyrium*, por la observación de zonas claras sin crecimiento de colonias de la bacteria patógena.

Fernández *et al.* (2014) afirman que las investigaciones orientadas al enfrentamiento de patógenos con BAL, el 44% de estas actúan mediante bacteriocinas que enfrentan patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., entre otros. Lo que conlleva considerar a los *Bacillus* y *Lactobacillus* como una alternativa natural con potencial inhibitorio para inactivar patógenos presentes en los alimentos y tracto gastrointestinal.

Contrarios ha estos resultados son los reportados por Rebolledo *et al.* (2013) quienes encontraron que la actividad antagónica de cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus johnsonii* mediante método de dilución y directo frente a *Streptococcus mutans*, resulto ser no significativa (P>0,05). Sin embargo, se obtuvo una mayor capacidad inhibitoria en ambos métodos con el *Lactobacillus casei*. De la misma manera Castañeda y Consuelo (2016) afirman que en

evaluaciones realizadas a *Bacillus subtilis* encontraron que la capacidad antagónica es mayor que en otras cepas de *Bacillus*.

### Determinación de la curva de crecimiento del *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*

La figura 1 se presenta la curva de crecimiento *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis*, se distingue que el *Lactobacillus brevis* tuvo un mayor desarrollo en la hora 20, teniendo un declive entre 24 a 32 horas; mientras que, el *Bacillus subtilis* presento un crecimiento normal, con un mayor crecimiento a las 24 horas, disminuyendo su actividad a las 28 y 32 horas, siendo superior al *Lactobacillus brevis*.

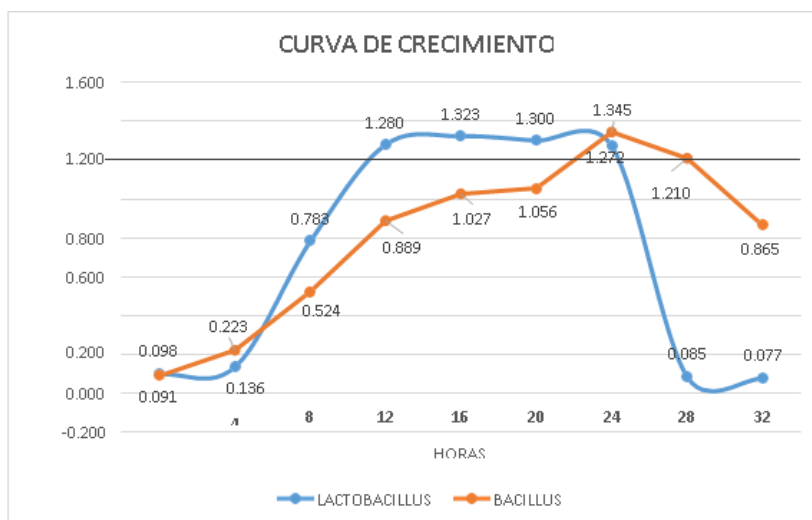


Figura 1. Comportamiento de la curva de crecimiento de *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis* en tiempos de 0 a 32 horas

Castañeda y Consuelo (2016) concuerdan con los datos obtenidos en esta investigación donde afirman que en cepas de *Bacillus* se evidencia el aumento en UFC/mL durante ésta fase de crecimiento en comparación con el resto de la curva de crecimiento, donde el *Bacillus subtilis* tiene una velocidad de crecimiento más elevada que las otras cepas de *Bacillus* y posterior a las 15 horas de evaluación disminuye su crecimiento debido a la disminución de nutrientes, factores esenciales para la respiración; aumento de otros metabolitos que pueden ser sustancias tóxicas y variación del pH hacia la acidez.

Escobar *et al.* (2010) afirman que el resultado del crecimiento de bacterias benéficas como *Lactobacillus* y *Bacillus* depende muchas veces del manejo y



características físico-químicas a las cuales son sometidas las cepas, donde estas podrían ocasionar una variabilidad dentro del normal crecimiento de estos microorganismos.

Lo citado anteriormente corrobora con lo obtenido en esta investigación, ya que estas bacterias son microorganismos susceptibles a condiciones extremas, donde no se aporta con un control de factores de crecimiento normales, como el desarrollo anaerobio con CO<sub>2</sub>.

### **Evaluación de la supervivencia de cepas de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis* en sales biliares**

La supervivencia de las cepas *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus brevis* en sales biliares a distintos tiempos se presenta en la tabla 2. Se observa que no hubo diferencias estadísticas en el minuto cero (0). Sin embargo, desde el momento de incubación hasta el minuto 90 la cepa de *Lactobacillus brevis* (con ausencia de sales biliares) obtuvo un mejor desarrollo que el *Bacillus subtilis* con y sin aplicación de sales biliares y *Lactobacillus brevis* con presencia de sales biliares, donde esta última se destacó en el minuto 120 con un mayor desarrollo; se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0,05$ ) desde el minuto 30 hasta el minuto 120.

Tabla 2. Promedios de supervivencia de cepas (UFC) de *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis* en sales biliares a distintos tiempos (0 a 120 minutos)

Microorganismos	Sales Biliares	Minutos				
		0	30	60	90	120
<i>Lactobacillus brevis</i>	Presencia	613, 33 <sup>a</sup>	926, 67 <sup>a</sup>	881,67 <sup>ab</sup>	659,00 <sup>ab</sup>	498, 67 <sup>a</sup>
	Ausencia	664, 33 <sup>a</sup>	971,00 <sup>a</sup>	983, 67 <sup>a</sup>	693,00 <sup>ab</sup>	439,67 <sup>ab</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	Presencia	608, 33 <sup>a</sup>	513,67 <sup>c</sup>	773,67 <sup>bc</sup>	513,00 <sup>b</sup>	379,33 <sup>ab</sup>
	Ausencia	626, 67 <sup>a</sup>	801,00 <sup>b</sup>	764,33 <sup>c</sup>	617,33 <sup>ab</sup>	325,00 <sup>b</sup>
EE		±20,76	±23,46	±25,43	±36,41	±29,39
P-Valor		0,4541	0,008	0,0600	0,3624	0,9387

<sup>a,b,c</sup> Letras superíndices distintas en la columna difieren estadísticamente según Tukey ( $P < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Milián *et al.* (2014) quienes reportan en estudios realizados en cepas de *Bacillus*, mostraron diferencias estadísticas ( $P < 0,05$ ) presentando una capacidad alta, media y nula para sobrevivir al efecto de las sales biliares, teniendo esta un mayor crecimiento

que las demás cepas por lo que deducen que es evidente que algunas cepas de *Bacillus* spp. puedan ser susceptibles, entre 20 y 25 %, a los fluidos biliares simulados.

Yegani (2010) y Aguavil (2012) citados por Arteaga *et al.* (2017) indican que las cepas de *Bacillus* spp. provenientes del tracto gastrointestinal de pollos Broiler Ross-308, tienen un buen potencial probiótico en aves con excelentes resultados. Asimismo, mencionan que una gran cantidad de las cepas estudiadas mostraron una mayor capacidad de resistencia a esta barrera gástrica, donde según Pérez *et al.* (2011) se debe a la ventaja que presentan estos microorganismos de soportar pH ácidos y descargas biliares en su paso a través del tracto gastrointestinal de los animales.

Vera *et al.* (2018) exponen que la implementación de simulaciones de jugo gástrico artificial (sales biliares) a cepas evaluadas de *Lactobacillus plantarum* presentaron un desarrollo y resistencia favorable hasta el minuto 90, donde se obtuvo una variabilidad de 4,20 - 5,17 log UFC/mL, debido a las condiciones extremas a las que fueron sometidas. Además, afirman que la resistencia a sales biliares se debe a que son resistentes a estas condiciones de jugo gástrico artificial, pudiendo atravesar la barrera fisiológica del tracto digestivo donde sus condiciones presentan pH bajos y la acción de enzimas proteolíticas, en este caso la pepsina.

## CONCLUSIONES

Evaluadas las características inhibitorias, crecimiento y supervivencia en sales biliares (simulación) en los microorganismos *Lactobacillus brevis* y *Bacillus subtilis* se concluye que ambos microorganismos cumplen con tipologías físicas y biológicas, siendo alternativas idóneas para ser utilizados como probióticos en alimentación animal con fines en la producción animal.

## LITERATURA CITADA

Agrocalidad. (2013). Programa Nacional Sanitario Avícola. Dirección de Sanidad Animal. (En línea). EC. Consultado 06 de may. 2018. Formato PDF. Disponible en: <http://www.agrocalidad.gob.ec>

Arteaga, F., López, M., Laurencio, M., Rondón, A., Milian, G., Barrios, V., Bocourt, R. (2017). Selección e identificación de aislados de *Bacillus* spp. del

tracto digestivo de pollos de traspatio, con potencial probiótico. Bolívar, EC. Pastos y Forrajes. 40 (1): 55-64.

- Castañeda, E. y Consuelo, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus sp.*, primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* Bogotá, CO. NOVA. 13 (26): 53-65.
- Enríquez, A. (2012). Evaluación del efecto de un Probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler Ross-308 en Santo Domingo de Los Tsáchilas. Tesis. Ing. Agropecuario. ESPE. Santo Domingo de los Tsáchilas EC. p 1.
- Escobar, L., Rojas, A., Giraldo, G., Padilla, L. (2010). Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. Armenia, CO. Rev. Invest. Univ. Quindío (20): 42 - 49.
- Fernández, K., Chanci, I., Wilches, L., Cardona, J. (2014). Caracterización de los metabolitos de Bacterias Ácido Lácticas y efecto inhibitor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. Medellín, CO. Biosalud. 13 (1): 45- 61.
- García, Y., García, Y., Bocourt, R. (2014). Instituto de Ciencia Animal de la Habana. Departamento de Ciencias Biofísicas. Los probióticos como alimento funcional. (En línea). Consultado 22 de jun. 2018. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/>
- González, T., González, A., Guerrero, I., Zamudio, M. (2016). Evaluación de la actividad probiótica in vitro de bacterias ácido lácticas aisladas de sustratos nativos del estado de Yucatán. (En línea). Formato PDF. Disponible en: <https://smbb.mx>
- Hernández, C., Aguilera, M., Castro, G. (2013). Situación de las enfermedades gastrointestinales. (En Línea). MX. Consultado, 6 de May. 2018. Formato PDF. Disponible en. <http://www.medigraphic.com/>
- Milián, G., Rondón, A., Pérez, M., Samaniego, L., Riaño, J., Bocourt, R., Ranilla, M., Carro, M., Rodríguez, M., Laurencio, M. (2014). Aislamiento e identificación de *Bacillus spp.* en diferentes ecosistemas con fines probióticos. Su utilización en animales. Matanzas, CU. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 48 (4): 347-351.
- Pérez, M., Laurencio, M., Rondón, A., Milián, G., Bocourt, R., Arteaga, F. (2011). Actividad antimicrobiana de una mezcla probiótica de exclusión competitiva y su estabilidad en el tiempo. Matanzas, CU. Rev. Salud Anim. 33 (3): 147-153.
- Rebolledo, M., Rojas, E., Salgado, F. (2013). Efecto de Dos Probióticos que Contienen Cepas de *Lactobacillus casei* variedad *ramnosus* y *Lactobacillus johnsonii* sobre el Crecimiento in Vitro de *Streptococcus mutans*. Concepción, CL. Revista Int. J. Odontostomat. 7 (3): 415 -419.

- Tobón, M., Perdomo, N., Cedeño, M. (2020). Estudio sobre la Actividad Antimicrobiana de los Sobrenadantes del Cultivo de *Lactobacillus*. *Acta Microscópica*, 29(5).
- Vélez, J., Gutiérrez, L., Montoya, O. (2015). Evaluación de la actividad bactericida de Bacterias Ácido Lácticas aisladas en calostro de cerdas frente a *Salmonella typhimurium*. Medellín, CO. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 68 (1): 7481- 7486.
- Vera, R., Ormaza, J., Muñoz, J., Arteaga, F., Sánchez, L. (2018). Cepas de *Lactobacillus plantarum* con potencialidades probióticas aisladas de cerdos criollos. Bolívar, EC. *Revista de Salud Animal*. 40 (2): 1 -12.
- Yate Patiño, A. F. (2019). Beneficios del uso de probióticos como suplemento en la nutrición de pollos de engorde y sus efectos en la reducción de enteritis por salmonella. [https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/13831/1/2019\\_beneficios\\_uso\\_probioticos.pdf](https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/13831/1/2019_beneficios_uso_probioticos.pdf)