

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

In vitro ACTIVITY OF *Bacillus subtilis* AND *Lactobacillus brevis* TO REDUCE COLONIZATION OF *Salmonella* entérica

Fuentes-Osorio, Lilian; Arteaga-Chávez, Fátima; Hurtado, Ernesto Antonio; Rondón Castillo, Ana Julia; Rodríguez Oliva, Marlen

Lilian Fuentes-Osorio

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria Manuel
Félix López, Ecuador

Fátima Arteaga-Chávez

fatima.artega@espam.edu.ec

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria Manuel
Félix López, Ecuador

Ernesto Antonio Hurtado

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria Manuel
Félix López, Ecuador

Ana Julia Rondón Castillo

Universidad de Matanzas, Cuba

Marlen Rodríguez Oliva

Universidad de Matanzas, Cuba

Revista ESPAMCIENCIA

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador

ISSN: 1390-8103

Periodicidad: Semestral

vol. 13, núm. 1, 2022

revista@espam.edu.ec

Recepción: 06 Diciembre 2021

Aprobación: 28 Junio 2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/527/5274203004/>

DOI: https://doi.org/10.51260/revista_espamciencia.v13i1.309



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

Resumen: 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 in vitro. 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. 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 *L. brevis* sin sales biliares se destacó desde el minuto 30 hasta el minuto 120. 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: Probióticos, sales biliares, halos de inhibición.

Abstract: The in vitro activity of indigenous microorganisms (*Lactobacillus brevis*, *Bacillus subtilis* and the mixture of both) to reduce the colonization of *Salmonella enterica* in vitro was determined. A DCA with factorial arrangement (3x3) was used, being the factors the microorganisms and diffusion methods (direct, filtered and diluted) in the inhibition of the confrontation of microorganisms, with the use of the Kirby-Bauer technique. Survival in bile salts performed by the CFU count, under a design that had four treatments. The microorganisms with the application of three methods against *Salmonella enterica* had a favorable growth at 24 hours, obtaining a greater development with *Lactobacillus brevis* + *Bacillus subtilis* by filtration method. Survival to bile salts, no variability of results was found. However, *L. brevis* without bile salts stood out from minute 30 to minute 120. It is concluded that both microorganisms meet physical and biological characteristics, being suitable alternatives to be used as probiotics in animal feed for animal production purposes.

Keywords: Probiotics, bile salts, inhibition halos.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe mayor conciencia en cuanto a los efectos nocivos por el uso excesivo de antibióticos, lo que ha creado un interés en los probióticos debido a sus beneficios sobre la microbiota intestinal (Yadav et al., 2020); no obstante, 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 originan uno de los principales problemas de salud pública en el Ecuador, dado que, se transmiten por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Es importante destacar que, Agrocalidad (2013) reporta actualmente el sector pecuario del país no cuenta con ningún programa oficial para el control, prevención y peor aún la erradicación de las principales enfermedades que afectan a los animales.

El excesivo y abusivo uso de los antibióticos ha dado lugar a un doble problema que puede tener consecuencias nefastas para la salud de los consumidores: la resistencia a los antibióticos y la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos. Por ello, el uso de probióticos parece ser una alternativa adecuada para superar estos problemas por su capacidad de modular el sistema inmunitario y la microflora intestinal, y considerando además su papel antagonico frente a ciertas bacterias patógenas y su capacidad para desempeñar el papel de factor de crecimiento (a veces asociado con prebióticos) cuando se utilizan como aditivos para piensos (Arsène et al., 2021) y calidad de la carne (Al-Shawi et al., 2020).

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 que 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 *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* (Yate, 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 enterica*.

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

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

La crioconservación de las cepas de *B. subtilis* y *L. brevis*, se realizó bajo centrifugación (1000 rpm/min) de 2 mL reactivadas en tubo de microcentrífuga (Eppendorf), se eliminó el sobrenadante y se dejó el ingrediente activado posterior un lavado, posteriormente se lavó con 1 mL de agua Peptonada al 0.1% en cada Eppendorf, nuevamente se centrifugó con el retiro del sobrenadante. En la cepa *L. brevis* se colocó 1000 µL de glicerol al (3%) y 500 µL de leche semidescremada, mientras que *B. subtilis* se colocó glicerol al 3%; ambas fueron conservados en un congelador a -20°C.

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

Se utilizó el método de difusión directo, que consistió en transferir a partir del inóculo de *Salmonella* entérica 1 mL diluciones seriadas en base 10 (10⁻¹ a 10⁻⁸). A partir de la dilución 10⁻⁷ y 10⁻⁸ se tomó 1 mL de *Salmonella* entérica y se la colocó en Agar (Mueller Hinton y MRS) y con el asa de Drigalsky se dispersó por toda la caja Petri, dejando reposar por 10 minutos. Posteriormente, se realizaron los pocillos (perforaciones) 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 *L. brevis*, en otros pocillos 100 µL de *B. subtilis*; asimismo, en un mismo pocillo se inocularon 50 µL de *L. brevis* + 50 µL de *B. 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, a través del sorbete de plástico de 6 mm de diámetro, aproximadamente, previamente esterilizado. Para la obtención de los extractos bacterianos (*B. subtilis* y *L. brevis*), se aplicó 1 mL de la cepa reactivada (*L. brevis*) en Eppendorf, cada inóculo fue centrifugado a 6.000 rpm durante 5 min. Después de centrifugar se filtró el sobrenadante con 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 *S. 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 (*L. brevis* y *B. 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 en condiciones anaerobias 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 con 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, ≥ 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).

Supervivencia de *B. subtilis* y *L. brevis* en sales biliares

Se plaqueó 12 mL de Agar MRS (*L. brevis*) Agar Nutriente (*B. subtilis*) a las cajas Petri ((90 x 14 mm), se coloca 1,5 mL de Sales Biliares (5%) en Caldo MRS y Caldo Nutriente; en tubos falcon de 15 mL se inoculó 5 mL de *L. brevis* previamente centrifugando a 600rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se colocó 5 mL de solución salina y se vuelve 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 el vortex. Se inoculó en 15 tubos con 3 repeticiones por minuto (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 realizaron diluciones desde 10⁻¹ hasta la dilución 10⁻⁷, se procedió a sembrar en las cajas. 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 *S. 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, para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey al 5%. Los análisis fueron realizados con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición en el enfrentamiento de microorganismos benéficos frente a *S. entérica*

El análisis de varianza realizado en la inhibición del enfrentamiento de microorganismos benéficos frente a *S. entérica* mediante diferentes métodos de difusión, presentó con un efecto altamente significativo ($P < 0,0001$) en la interacción microorganismos x métodos. Se puede apreciar en el cuadro 1 que las bacterias (*B. subtilis* + *L. brevis*) presentaron un mayor desarrollo del halo inhibitorio, mediante el método de difusión de filtración y *L. brevis* por método directo, con promedios de 29,33 ($\pm 2,70$) y 22,00 $\pm (2,70)$ mm, respectivamente ($P < 0,05$).

CUADRO 1.

Promedios de halos inhibitorios con la aplicación de diferentes métodos de infusión en cepas de B.

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

subtilis, L.brevis y L. brevis + B. subtilis frente a S.entérica.

b,c 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) formaron halos inhibitorios que mostraron la susceptibilidad al crecimiento de cepas de *Salmonella tiphymurium*, por la observación de zonas claras sin crecimiento de colonias de la bacteria patógena.

Al respecto, 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 base en los hallazgos de Rebolledo et al. (2013), la actividad antagónica de cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus johnsonii* mediante método de dilución y directo frente a *Streptococcus mutans*, resultó ser no significativa ($P > 0,05$). Sin embargo, se obtuvo una mayor capacidad inhibitoria en ambos métodos con el *L. casei*. Mientras que, Divyashree et al. (2021) reportaron actividad antimicrobiana de las cepas *Lactobacillus casei*- MYSRD 108 y *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 contra *Salmonella paratyphi*. De la misma manera Castañeda y Consuelo (2016) afirman que en evaluaciones realizadas a *B. subtilis* encontraron que la capacidad antagónica es mayor que en otras cepas de *Bacillus*.

Evaluación de la supervivencia de cepas de *B. subtilis* y *L. brevis* en sales biliares

La supervivencia de las cepas de *B. subtilis* y *L. brevis* en sales biliares a distintos tiempos se presenta en el cuadro 2. Se observa que no hubo diferencias estadísticas en el minuto cero (0). Aun cuando, se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) desde el minuto 30 hasta el minuto 120. Se destaca desde el momento de incubación hasta el minuto 90, que la cepa de *L. brevis* (con ausencia de sales biliares) obtuvo un mejor desarrollo que el *B. subtilis* (con y sin aplicación de sales biliares); aunque, en el minuto 120 el *L. brevis* con presencia de sales biliares, presenta un mayor desarrollo

CUADRO 2.
Promedios de supervivencia de cepas (UFC) de *B. subtilis* y *L. brevis* en sales biliares a distintos tiempos (0 a 120 minutos) con tomas directas.

Microorganismos	Sales Biliares	Minutos				
		0	30	60	90	120
<i>Lactobacillus brevis</i>	Presencia	613,33a	926,67a	881,67ab	659,00ab	498,67a
	Ausencia	664,33a	971,00a	983,67a	693,00ab	439,67ab
<i>Bacillus subtilis</i>	Presencia	608,33a	513,67c	773,67bc	513,00b	379,33ab
	Ausencia	626,67a	801,00b	764,33c	617,33ab	325,00b
EE		±20,76	±23,46	±25,43	±36,41	±29,39
P-Valor		0,4541	0,008	0,00600	0,03624	0,009387
a,b,c Letras superíndices distintas en la columna difieren estadísticamente según Tukey (P<0,05).						

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

Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Milián et al. (2014) quienes 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.

Desde el punto de vista de Yegani (2010) y Aguavil (2012) citados en Arteaga et al. (2017) 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, esto indica la ventaja que presentan estos microorganismos de soportar pH ácidos y descargas biliares en su paso a través del tracto gastrointestinal de los animales (Pérez et al., 2011).

En efecto, 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.

En este sentido, Singh et al. (2020) concluyen que el *L. brevis* mostró la mayoría de las propiedades probióticas, como 10% de tolerancia al cloruro de sodio, 1% de tolerancia a la bilis, crecimiento en pH 2, y actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

La investigación realizada ratifica algunas características manifestadas por Ruiz et al. (2021) que refieren en *B. subtilis*, la efectividad de su uso como probiótico, principalmente debido a su probada actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, enzimática e inmunomoduladora.

CONCLUSIONES

B. subtilis y *L. brevis* 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). <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/a1.pdf>
- Al-Shawi, S. G., Dang, D. S., Yousif, A. Y., Al-Younis, Z. K., Najm, T. A., and Matarneh, S. K. 2020. The potential use of probiotics to improve animal health, efficiency, and meat quality: A Review. *Agriculture*, 10(10): 452.
- Arsène, M. M., Davares, A. K., Andreevna, S. L., Vladimirovich, E. A., Carime, B. Z., Marouf, R., and Khelifi, I. 2021. The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Veterinary World*, 14(2): 319.
- 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.
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., González, I., Tablada, E., Díaz, M., Robledo, C., Balzarini, M. 2020. InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
- Divyashree, S., Anjali, P. G., Somashekaraiah, R., and Sreenivasa, M. Y. 2021. Probiotic properties of *Lactobacillus casei*-MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*. *Biotechnology Reports*, 32, e00672.
- Fernández, K., Chanci, I., Wilches, L., Cardona, J. 2014. Caracterización de los metabolitos de Bacterias Ácido Lácticas y efecto inhibidor 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). <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. [https://smbb.mx/congresos%20smbb/puerto vallarta03/TRABAJOS/AREA_VI/CARTEL/CVI-24.pdf](https://smbb.mx/congresos%20smbb/puerto%20vallarta03/TRABAJOS/AREA_VI/CARTEL/CVI-24.pdf)
- Hernández, C., Aguilera, M., Castro, G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 31 (4):137-151.
- 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., Milian, 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 *rhamnosus* . *Lactobacillus johnsonii* sobre el Crecimiento in Vitro de *Streptococcus mutans*. Concepción, CL. *Revista Int. J. Odontostomat*. 7(3):415 -419.
- Ruiz Sella, S. R., Bueno, T., de Oliveira, A. A., Karp, S. G., and Soccol, C. R. 2021. *Bacillus subtilis natto* as a potential probiotic in animal nutrition. *Critical Reviews in Biotechnology*. 41(3):355-369.
- Singh, V., Ganger, S., and Patil, S. 2020. Characterization of *Lactobacillus brevis* with potential probiotic properties and biofilm inhibition against *Pseudomonas aeruginosa*. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 66(1):14.
- Tobón, M., Perdomo, N., Cedeño, M. 2020. Estudio sobre la Actividad Antimicrobiana de los Sobrenadantes del Cultivo de *Lactobacillus*. *Acta Microscópica*, 29(5):2718-2723.
- 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-Mejía, R., Ormaza-Donoso, J., Muñoz-Cedeño, J., Arteaga-Chávez, F., Sánchez-Miranda, L. 2018. Cepas de *Lactobacillus plantarum* con potencialidades probióticas aisladas de cerdos criollos. Revista de Salud Animal, 40(2).
- Yadav, M., Mandeep., and Shukla, P. 2020. Probiotics of diverse origin and their therapeutic applications: a review. Journal of the American College of Nutrition, 39(5):469-479.
- 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://n9.cl/645ox>