



Efecto del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*

Effect of the culture supernatant of *Bifidobacterium animalis lactis* on the survival of *Salmonella typhi*

Jonatan C. Abad-Castillo¹ y Luis A. Llenque-Díaz²

¹Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología-UNT.

RESUMEN

Se evaluó el efecto bactericida del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, para lo cual se prepararon tres sistemas de evaluación, dos de ellos sirvieron de control constituidos por caldo MRS pH 7 y caldo MRS pH 4, y un sistema problema constituido por el sobrenadante obtenido de *B. animalis lactis*. Se colocó a cada sistema 1 mL del inóculo de 3×10^8 células/mL de *S. typhi* y se incubó a 37°C durante 24 horas. A partir de la 0 hora y cada tres horas hasta completar las 24 horas se monitoreo la supervivencia de *S. typhi*, por el método de recuento en placa, mediante la siembra por incorporación. Los resultados evidencian una disminución de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de *S. typhi* hasta las 24 h de evaluación en condiciones de refrigeración. Entonces se concluye que el sobrenadante de *B. animalis* subsp. *lactis* sí afecta la supervivencia de *S. typhi* en las condiciones de ensayo.

Palabras clave: Efecto, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Supervivencia, *Salmonella typhi*

ABSTRACT

Bactericidal effect of supernatant from culture of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* on the survival of *Salmonella typhi* was evaluated in three prepared systems of evaluation; two of them served control constituted by MRS broth pH 7 and MRS broth pH 4, and a system problem constituted by the supernatant obtained from *B. animalis lactis*. It was placed to each system 1 mL of inoculum of 3×10^8 cells/mL of *S. typhi* and incubated at 37 ° C for 24 hours. From 0 hour and every three hours up to complete the 24 hours is monitoring the survival of *S. typhi*, the counting method in plate, through the planting by incorporation. Results show a decrease in colony forming units of colonies (CFU/mL) of *S. typhi* until 24 h of evaluation at refrigerated conditions. It was then concluded that the supernatant from *B. animalis lactis* affects the survival of *S. typhi* in the test conditions.

Keywords: Effect, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Survival, *Salmonella typhi*

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos probióticos aparecen en el tracto gastrointestinal del hombre desde etapas tempranas de la vida, pero al pasar el tiempo y debido a factores como la edad, la dieta, el ambiente, el estrés y la medicación descienden a cantidades que pueden llegar a ser muy pequeñas, lo cual puede favorecer el crecimiento de bacterias patógenas^{1,2}. Cuando se logra que los probióticos se conserven en número o vuelvan a alcanzar niveles importantes en el intestino, el huésped puede experimentar una serie de beneficios como el mejoramiento de la tolerancia a lactosa, acción contra bacterias patógenas y el mejoramiento de la respuesta inmune³. Gracias a su gran capacidad antagonica contra otros microorganismos y conservante se les usa en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos^{4,5}.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están presentes en la alimentación del hombre desde hace mucho tiempo y es posible encontrarlas en muchos productos de leche fermentada como yogurt, también se encuentran en quesos frescos, en diferentes carnes y sus productos y en algunas hortalizas; su actividad antimicrobiana ha sido atribuida a la acumulación de los productos finales de los procesos de fermentación, como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrogeno, o bacteriocinas^{6,7,8}.

Los ácidos orgánicos mayoritarios (láctico y acético) generados como consecuencia del metabolismo fermentativo de las hexosas se han considerado los principales responsables del efecto inhibitor de cepas del género *Bifidobacterium* frente a patógenos gastrointestinales, como *Helicobacter pylori* y *S. entérica*. Los ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) generados a partir del metabolismo de polisacáridos no digeribles en la parte alta del tracto gastrointestinal (prebióticos) por este grupo bacteriano también contribuyen a la reducción del pH en el colon, inhibiendo así su colonización por bacterias patógenas^{9,10,11,12}.

Las bacterias del género *Bifidobacterium* bajan el pH intestinal mediante la producción de ácidos con lo cual impide el desarrollo de bacterias entre ellas *Salmonella* sp. y *S. typhi*^{10,11}. El crecimiento de BAL en medios aerobios conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno como: peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la flora láctica y no láctica^{13,15,16}. El peróxido de hidrógeno ha sido estudiado más ampliamente en leche cruda, donde se genera el sistema antimicrobiano "lactoperoxidasa", sin embargo a pesar de su potencial en la preservación, es reconocida la poca viabilidad de este compuesto en los alimentos, ya que puede tener efectos perjudiciales en su calidad organoléptica causando rancidez de las grasas y reacciones de decoloración y enverdecimiento^{14,17,18,20,21}.

Los ácidos orgánicos mayoritarios (láctico y acético) generados como consecuencia del metabolismo fermentativo de las hexosas se han considerado los principales responsables del efecto inhibitor de cepas del género *Bifidobacterium* frente a patógenos gastrointestinales, como *Helicobacter pylori* y *S. entérica*. Los ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) generados a partir del metabolismo de polisacáridos no digeribles en la parte alta del tracto gastrointestinal (prebióticos) por este grupo bacteriano también contribuyen a la reducción del pH en el colon, inhibiendo así su colonización por bacterias patógenas²¹.

En los últimos años se han identificado y caracterizado diversos **péptidos antimicrobianos** denominados **bacteriocinas** los cuales en su mayoría son producidos por BAL. Los beneficios de éstas en salud humana y animal están bien documentados: presentan varias características y ventajas que las hacen particularmente atractivas: un espectro de inhibición específico, un sistema de autorregulación, estabilidad y procesos de producción costo – efectivo y el consumo en forma segura por los humanos por muchos siglos²².

El modo de acción de las bacteriocinas de bacterias lácticas es la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células sensibles^{23,24}. Este proceso induce la disipación de la fuerza motriz protónica. La formación de poros y la eliminación de la fuerza motriz protónica (fuente de energía celular) promueven la salida rápida de metabolitos de pequeño tamaño, como aminoácidos y nucleótidos, interrumpiendo los procesos de biosíntesis de la célula; además, de la formación de poros, para ciertas bacteriocinas se ha descrito la lisis celular como modo de acción secundario^{15,25}.

La capacidad bactericida de las bacterias probióticas sobre agentes patógenos presentes en alimentos ha sido abarcada en distintas investigaciones, pero no el sobrenadante producto del crecimiento de estas bacterias. Entonces evaluar el sobrenadante obtenido durante las incubaciones del cultivo de *B. animalis lactis* podría resultar efectivo y ser utilizado como conservante de los alimentos que son almacenados en condiciones de refrigeración, como una medida preventiva para controlar el crecimiento de microorganismos contaminantes y evitar la propagación de patógenos. En tal sentido, la presente investigación estuvo dirigida a determinar: (i) el efecto del sobrenadante del cultivo de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, en condiciones de refrigeración, (ii) estadísticamente si hay o no diferencia significativa entre el efecto del sobrenadante de *B. animalis lactis* con el medio MRS a pH 7.0 respecto a la supervivencia de *S. typhi* en condiciones de refrigeración y (iii) estadísticamente si hay o no diferencia significativa entre el efecto del sobrenadante de *B. animalis lactis* con el medio MRS a pH 4 respecto a la supervivencia de *Salmonella typhi* en condiciones de refrigeración.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos

- Cultivo de *Salmonella typhi*, proporcionado por el laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo.
- Cultivo liofilizado de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, comercializado por la empresa Sacco, S.A Italia.
- Sobrenadante obtenido de *B. animalis* subsp. *Lactis* en medio Man Rogosa Sharpe (MRS).

Reactivación y obtención de biomasa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Se pesó 0.1 g del cultivo liofilizado y se añadió en 4 mL de caldo MRS; luego se incubó en una jarra con tapa hermética, en condiciones de microaerobiosis a 37°C durante 72 h. Posteriormente las colonias fueron cosechadas y colocados en un matraz conteniendo 28 mL de caldo MRS y se incubó en condiciones de microaerobiosis a 37°C durante 72 h. Finalmente, se cosechó toda la biomasa en solución salina fisiológica estéril (SSFE) y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min¹⁰.

Inoculación y obtención del sobrenadante del cultivo de *B. animalis lactis*

La biomasa obtenida anteriormente, se inoculó en 100 mL de caldo MRS, y se incubó por 15 h a 37°C en microaerobiosis. Terminado el periodo de incubación, se centrifugó el caldo a 4000 rpm durante 15 min. Luego se filtró el sobrenadante por el método de filtración de membrana empleando una membrana filtrante bacteriológica de 0.45 micras de diámetro¹⁰.

Reactivación y estandarización del inóculo de *Salmonella typhi*.

A partir del cultivo puro, conservado en congelación, se sacó una asada y se sembró en 3 mL de caldo nutritivo, y se incubó a 37°C durante 24 h, en condiciones de aerobiosis. Luego se preparó una suspensión bacteriana en SSFE a una turbidez equivalente al tubo N° 1 del nefelómetro de Mac Farland (3×10^8 células/mL), que fue considerado como inóculo¹⁰.

Efecto del sobrenadante del cultivo de *B. animalis* sobre la supervivencia de *S. typhi*.

Se prepararon tres sistemas de ensayo:

Sistema 1: 9 mL Caldo MRS a pH 7

Sistema 2: 9 mL Caldo MRS a pH 4

Sistema 3: 9 mL del sobrenadante obtenido de *B. animalis lactis*

Luego se agregó 1 mL de inóculo de *S. typhi*, a cada sistema y se incubó a condiciones de refrigeración durante 24 h. A la 0 h, se extrajo 0.5 mL del sistema de evaluación, se hicieron diluciones en SSFE, y se sembró 1 mL en placas, mediante la técnica de incorporación en agar nutritivo; seguidamente, se incubó a 37°C durante 24 h. Se sembró las tres últimas diluciones. Cada uno de los sistemas se evaluó cada tres horas hasta completar las 24 h. Finalmente, se realizó el recuento de colonias y se expresó en UFC/mL¹⁰.

Análisis de datos

El crecimiento promedio (UFC/mL) de *S. typhi* en placa, durante las 24 h de incubación, en cada uno de los sistemas de ensayo, se registró y se presentó en una figura, al mismo tiempo que se aplicó el análisis de varianza a los datos obtenidos^{10,20}.

RESULTADOS

Se observó que la supervivencia de *S. typhi* evaluada en el sobrenadante del cultivo de *B. animalis lactis* con pH 4, que disminuyó en seis logaritmos en relación al recuento inicial, al igual que en caldo MRS a pH 4, por lo que no hay diferencia significativa entre estos dos medios, pero al evaluar la supervivencia de *S. typhi* en caldo MRS, en esta solo disminuye dos logaritmos, por lo tanto aquí si hay diferencia significativa (Fig. 1).

DISCUSIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos con gran capacidad antagónica contra otros microorganismos; siendo de gran interés, ser utilizados como bioconservantes naturales, y disminuyendo en parte el uso de conservantes químicos en los alimentos¹³. Los mecanismos de defensa de bacterias probióticas en contra de diversos tipos de microorganismos patógenos que atacan a individuos, aún sigue siendo un tema muy complejo, lo cual ha motivado que el mundo científico se

interese por conocer con mayor detalle el modo de acción de las bacterias ácido lácticas y de sus metabolitos sobre los microorganismos patógenos^{13,26}. Según Gutiérrez y cols., las cepas de *B. animalis* son consideradas probióticas y producen numerosas sustancias microbianas específicas como ácido láctico y bacteriocinas, entre otras que les confiere su capacidad bactericida; sobre diferentes cepas de bacterias gran negativas^{10,13}.

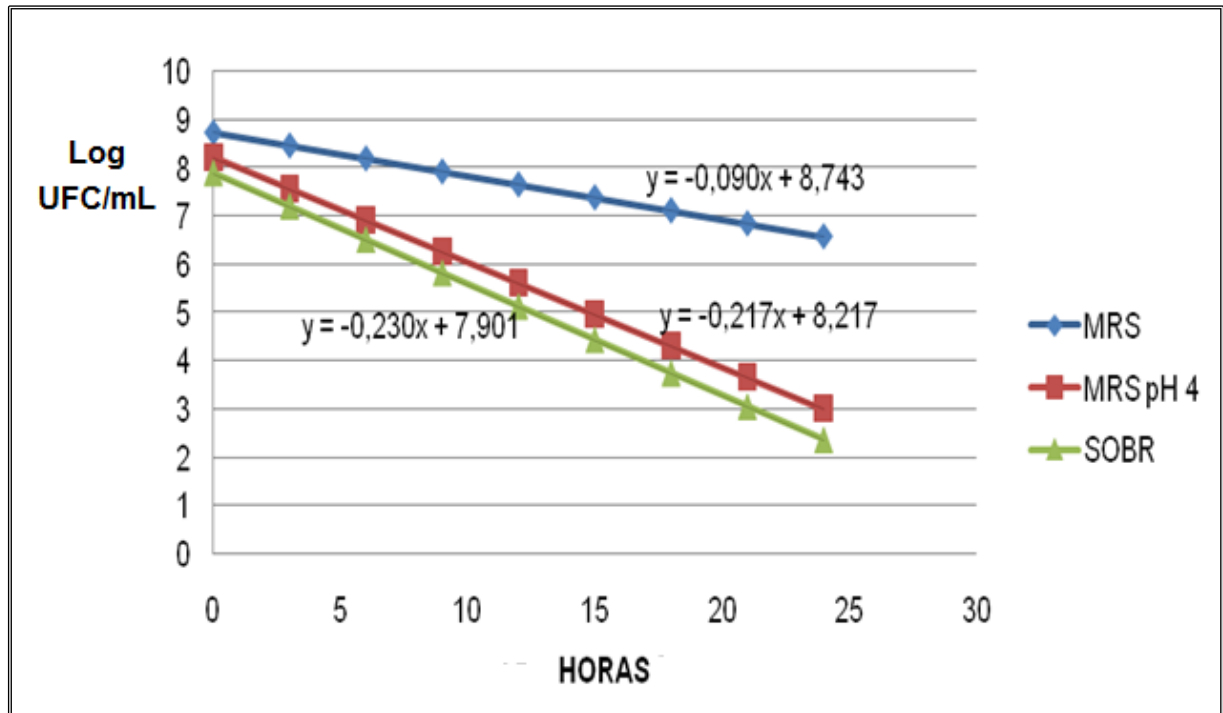


Fig 1. Curvas de supervivencia de *Salmonella typhi* en caldo MRS pH 7, en caldo MRS pH 4, y en sobrenadante de cultivo de *B. animalis* subsp. *lactis*.

Con los resultados obtenidos, se determinó que los productos metabólicos de *B. animalis* subsp. *Lactis* excretados al medio de cultivo presentaron actividad antagónica “in vitro” contra *S. typhi*. Es probable que esta actividad se deba a la producción de sustancias bactericidas específicas contra Gram negativas, las cuales solubilizan el lipopolisacárido y destruyen la membrana citoplasmática vaciando su contenido celular, de esta manera generan inhibición parcial o total de estos microorganismos¹⁵. Al evaluar los productos metabólicos de *B. animalis* subsp. *Lactis* se observa disminuciones logarítmicas significativas de la población de *S. typhi* en los diferentes sistemas de ensayo. El descenso de la población de *S. typhi* durante el proceso podría estar relacionado a la acidez del medio, ya que al evaluar la disminución de la población en el sobrenadante y en el caldo MRS a pH 4 no presenta una diferencia significativa ($p > 0.05$).

Durante la producción de probióticos o alimentos funcionales con bifidobacterias, la viabilidad de las bacterias patógenas se ve afectada por la acidez del medio de cultivo¹⁸. El sobrenadante y el caldo MRS a pH 4 presentaron actividad de inhibición frente a *S. typhi* indicando que la acción inhibitoria podría ser debida a los ácidos orgánicos producidos por *B. animalis*; estos ácidos orgánicos mayoritarios generados como consecuencia del metabolismo fermentativo de las hexosas (láctico y acético) se han considerado los principales responsables del efecto inhibitorio de cepas de *Bifidobacterium* frente a patógenos gastrointestinales como *Salmonella*¹⁹.

La disminución de la población de *S. typhi*, en el sistema inoculado con el sobrenadante, pone en evidencia que fueron excretados los productos metabólicos de *B. animalis* subsp. *Lactis*, entre ellos las bacteriocinas, que podrían tener efecto inhibitorio o bactericida sobre el crecimiento de *S. typhi*. En este sentido, algunos autores han considerado que el espectro de inhibición de estas proteínas es reducido, generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, de forma que presentan actividad bactericida solamente frente a cepas sensibles¹⁷. La producción de bacteriocinas

con un espectro de inhibición relativamente amplio es propia de bacterias de origen alimentario incluidas la carne y sus derivados²⁷. Al respecto, Vásquez y cols, midiendo el efecto del extracto crudo de bacteriocinas sobre las características microbiológicas y sensoriales de *Longissimus dorsi* (solomo redondo) empacado al vacío, encontraron que la eficacia de las bacteriocinas sobre un microorganismo depende del número de microorganismos existentes a inhibir y de la concentración de la bacteriocina. Además, no siempre una buena condición de crecimiento del microorganismo significa una buena producción de bacteriocinas; así mismo, no siempre una bacteriocina es activa in vitro¹⁷.

Con el análisis de los resultados, en relación al sobrenadante obtenido de *B. animalis* subsp. *Lactis*, supone que dicha disminución logarítmica de las bacterias *S. typhi* fueron disminuyendo por la presencia de otros parámetros y de las condiciones que se encontrarían en el sobrenadante. Por lo que, Gutiérrez y cols (2005) mencionan que trabajos previos de Reddy et al., 1984; Abdel-Bar; Harris y Rill, 1987 demostraron que a un pH 5.5, se presenta un mejor nivel de inhibición de los productos metabólicos de *B. animalis*¹⁶, aunque a pH de 3.5 y 4.5 también se encontró actividad bactericida lo que concuerda con el resultado, mostrados en la Fig. 1, en caldo MRS a pH 4 y del sobrenadante, en donde no se encontró diferencia significativa entre los resultados obtenidos. Por su parte, Larrea y cols.²⁰ encontraron que *B. animalis* presenta actividad antimicrobiana frente a *S. typhi*, utilizando la técnica de difusión en pocillos y obtiene solo resultados cualitativos.

El análisis estadístico de los recuentos promedios de las colonias sobrevivientes de *S. typhi* sembrado en caldo MRS y en el sobrenadante del cultivo de *B. animalis* subsp. *Lactis* con pH 4; obteniéndose resultados que confirman que el sobrenadante está ejerciendo un efecto bactericida contra *S. typhi* y nos muestra que existe diferencia significativa al comparar los resultados de estos medios. De igual forma, el análisis estadístico hecho a los recuentos promedios de las colonias sobrevivientes de *S. typhi* sembrado en caldo MRS a pH 4 y en el sobrenadante del cultivo de *B. animalis* subsp. *Lactis*, con pH 4; obteniéndose resultados que nos muestran que no existe diferencia significativa al comparar los resultados de estos medios. Cabe indicar que estos medios presentaron efecto bactericida y esto lo podemos observar en los resultados que muestra la Tabla 1.

Cabe resaltar que las condiciones de microaerobiosis son necesarios para que *B. animalis* subsp. *Lactis* pueda reactivarse ya que es una bacteria que crece en estas condiciones, por ello se adecuó un medios en el cual se pueda generar estas condiciones de microaerobiosis^{15,16,17}, por lo que se logró implementar esta condición incubando en una jarra con tapa hermética, adicionando un sobre de alkaetzer en un tubo de ensayo con agua, y se colocó una vela prendida, para así generar un medio de microaerobiosis.

La conservación de los alimentos y la prevención de la ocurrencia de Enfermedades de Transmisión Alimentaria, han motivado que el mundo industrial y el científico se interesen por conocer con mayor detalle el modo de acción de las bacterias ácido lácticas y de algunos de sus metabolitos sobre los microorganismos patógenos, por lo que la investigación confirmó la utilidad de los extractos obtenidos a partir del crecimiento de las bacterias ácido lácticas pueden controlar el crecimiento de las bacterias entéricas como *S. typhi*; al mismo tiempo que, esta información sirve de base para continuar con otros estudios a fin de evaluar su acción frente a otros microorganismos patógenos²⁰.

CONCLUSIONES

- El sobrenadante de *B. animalis* subsp. *Lactis* sí afecta la supervivencia de *S. typhi* en condiciones de refrigeración hasta por 24 h de incubación.
- Existe diferencia significativa entre el efecto del sobrenadante de *B. animalis* subsp. *Lactis* con el medio MRS pH 7 respecto a la supervivencia de *S. typhi* en las condiciones de ensayo.
- No existe diferencia significativa entre el efecto del sobrenadante de *B. animalis* subsp. *Lactis* con el medio MRS a pH 4 respecto a la supervivencia de *S. typhi* en las condiciones de ensayo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gutiérrez-Ramírez L, Gómez-Espina A, Arias-Jaramillo L, Tangarife - Patiña B. Evaluación de la viabilidad de una capa prebiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. REDALYC. 2007; 4 (2): 37-42.
2. Martins A, Martins F, Gomes D, Elian S, Vieira A, Teixeira M, Cara D, Nardi R, Nicoli J. Evaluation of in vitro antagonism and of in vivo immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. Lactis. Arch Microbiol. 2010;192(12): 995-1003
3. Bustamante P, Mayorga L, Ramírez H, Martínez P, Barranco E, Azaola A. Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica. Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 2006. 37(002): 5-10
4. Cástulo I, Del campo M, Gómez H, Alaníz R. Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. REDALYC. 2008; 6(5): 1-17.
5. Amores R, Calvo A, Maestre J, Martínez-Hernández D. Probióticos. Rev.Esp. Quimioterapia.2004; 17(2): 131-139.
6. González B, Jiménez Z, Heredia N, Villarreal L, García G, Gómez M. Efecto de microorganismos prebióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var *typhimurium*. REDALYC. 2006; 9(4):365-374.
7. Ferreira F, Marcal A, Duarte R, Nicoli J. Perfil de susceptibilidad de antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum* Bb12 y *Bifidobacterium longum* Bb46. REDALYC. 2001; 1(2):1519-5228.
8. Corrales A, Henderson M, Morales LI. Sobrevivencia de microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *bifidobacterium lactis* en helado batido. REDALYC.2007;34(2): 2-5
9. Veiga P, Ann C, Beal C, Michaud M, Delaney M, Dubois A, et al. *Bifidobacterium animalis* subs. Lactis fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes.PNAS.2010;107(42): 18132-18137.
10. Organización Mundial de Gastroenterología. Guías Prácticas: Prebióticos y probióticos 2008. España. Organización Mundial de Gastroenterología. 2008.
11. Castellanos A, Murguía M. Evaluación de un probiótico para el control de salmonella en pollos de engorda en Yucatán. REDALYC.1999;30(3): 243-248
12. Esterso E, Paiba J, Mesquita A. Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella enteric* Serovar enteritidis experimental infection in Chickens. Revista Brasileira de Ciencia Avícola. 2007; 9 (1): 69 – 73
13. Gutiérrez - Ramírez L, Acosta - Otálvaro E. Determinación del potencial bactericida in vitro de un callado nativo de *L. casei* frente a *E. coli*. REDALYC. 2008; 5(2): 68-73.
14. Vásquez S, Suarez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. SCIELO. 2009;36(1): 64-71
15. Rojas C, Vargas P. Bacteriocinas: Sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. Tecnología en marchas. 2008; 21(2): 9-16.
16. Gutiérrez L, Estrada A, Montoya O. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. REDALYC. 2005; 58(1):2601-2609
17. Vásquez S, Suarez H, Montoya O. Efecto del extracto crudo de bacteriocinas sobre las características microbiológicas y sensoriales de solomo redondo (*Longissimus dorsi*) empacado al vacío. REDALYC. 2008;16(2): 10-14
18. Mayorga-Reyes P, Bustamante C, Gutiérrez-Nava A, Barranco-Florido E. y Azaola-Espinosa A. Crecimiento, sobrevivencia y adaptación de *Bifidobacterium infantis* a condiciones ácidas. Rev. Mexicana de Ingeniería Química. 2009; 8(3): 259-264
19. Sanz Y, Collado M, Dalmau J. Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC). Unidad de Nutrición y Metabolopatías. Hospital Infantil La Fe. Valencia. Acta Pediatra Esp. 2006; 64: 74-78
20. Larrea H, Flores M, Huapaya J. evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I. REDALYC. 2007
21. Lee J, O'Sullivan D. Genomic insights into bifidobacteria. Microbiology and molecular biology. 2010; 74(3): 378-416
22. Coventry M, Gordon J, Alexander M, Hickey M, Wan J. A food-grade process for isolation and partial purification of Bacteriocins of lactic acid bacteria that uses Diatomite calcium silicate. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62(5): 1764-1769
23. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. J Mol Microbiol Biotechnol 2007;13:194-199

24. Monroy-Dosta M, Castro-Barrera T, Fernández-Perrino F, Mayorga-Reyes L. Bacteriocinas producidas por bacterias prebióticas. 2009
25. Ralph J, Tagg J, Bibek R. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*. 1995; 59(2): 171-200
26. Mejía J, Chacón Z. Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización *in vitro* como potenciales probióticos. *REDALYC*. 2007; 17(2): 178-185
27. Laurencio M, Perez M, Millian G, Rondón A. Actividad probiotica de una mezcla de exclusión competitiva en indicadores microbiológicos en pollos de ceba. *REDALYC*. 2005; 5(1):48-53.