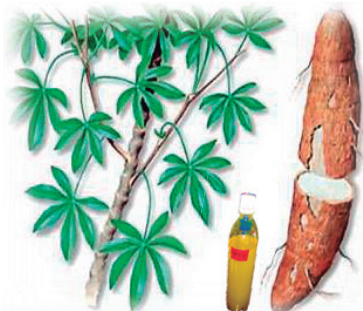


## Identificación de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de sustrato fermentado de yuca (*Manihot esculenta*)

### Identification of *Lactobacillus* sp with probiotic potential from fermented yuca (*Manihot esculenta*)

Roger Antonio Urbina Orozco<sup>1</sup>, Kels Rahomi Guerrero Montenegro<sup>1</sup>, Wendell Antonio Mejía Tinoco<sup>2</sup>, Isaías Ezequiel Sánchez Gómez<sup>3</sup>, Jannin Ronaldo Hernández Blandón<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ingeniero Zootecnista, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8268-3532> / ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9878-7507> <sup>2</sup>MSc.en Biotecnología <sup>3</sup>MSc. en Sanidad Vegetal, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6604-1660> [isanchez@ci.una.edu.ni](mailto:isanchez@ci.una.edu.ni) <sup>4</sup>Ingeniero Zootecnista, Universidad Nacional Agraria



#### RESUMEN

En Nicaragua sistemas de producción pecuaria se ven afectados por la baja disponibilidad de alimento y agua en la época seca, ocasionando el aumento de enfermedades y desnutrición, afectando directamente los parámetros productivos y reproductivos del hato. De igual forma para contrarrestar este tipo de situaciones entra el uso de antibióticos de uso profiláctico, terapéuticos y promotores de crecimientos capaces de eliminar patógenos y actuar de manera drástica sobre la flora microbiana necesaria para el funcionamiento del aparato digestivo además de influir en la acumulación de residuos en los productos finales de importancia para los consumidores. El género *lactobacillus* representa un alto potencial biotecnológico, estas bacterias contribuyen al desarrollo de características organolépticas de los alimentos y generan un ambiente poco favorable para el desarrollo de microorganismos patógenos. El objetivo de este trabajo fue identificar mediante pruebas in vitro las especies de *Lactobacillus* con potencial probiótico procedentes de sustrato fermentado de yuca. Mediante las pruebas bioquímicas se identificaron dos *lactobacillus* sp, *L. casei* y *L. Brevis*. Las especies de *Lactobacillus* previamente identificadas fueron sometidas a la prueba de resistencia a diferentes niveles de pH, mostrando resistencia a las condiciones ácidas. La prueba de antagonismo microbiano frente *E. Coli* ATCC 25922 y *Salmonella* sp, demostraron presencia de halos de inhibición, indicando acción antimicrobiana sobre el crecimiento de los patógenos. Las especies de *L. casei* y *L. Brevis* fueron sensibles a los antibióticos Trimetoprim Sulfametaxona y oxitetraciclina al realizar la prueba de sensibilidad. Estos resultados demuestran que las cepas identificadas pueden ser utilizadas como probiótico en la alimentación de los animales o como inoculante en el proceso de ensilaje.

**Palabras clave:** probiótico, antagonismo, tolerancia, especie.

#### ABSTRACT

In Nicaragua systems of production cattle they are affected by the low availability of food and water in dry season causing the increase of diseases and malnutrition, affecting directly the productive and reproductive herd parameter, Likewise counteract this types of situations comes the of antibiotics by prophylactic therapeutic use and growth promoters, able to eliminate pathogens and eliminate drastically on the microbial flora necessary for the functioning or the digestive system also to influencing the accumulation of waste in final products of importance to consumers, the genus *lactobacillus* represents a high biotechnological potential, this bacteria contribute to the increase organoleptic of food and generate an unfavorable environment for the growth of pathogens microorganisms. The objective of this work was identify with vitro test the species of *lactobacillus* with high probiotic through fermented substrate of yuca, through biochemical tests, *lactobacillus* sp, *L.casei* and *L.brevis* was identified, the *lactobacillus* species previously identified was in a resistance tests with different level of pH showing resistance to the acid conditions, the microbial antagonism test in front *E.coli* ATCC 25922 and *salmonella* sp demonstrate the presence of inhibition of halos, showing antimicrobial action over the pathogens growth the *L.casei* and *L.brevis* species was sensitive to Trimetoprim sulfametaxona and oxitetraciclina antibiotics, to realize the sensitive tests. These results demonstrate that the identified strains can be used as a probiotic in the feeding of the animals or as an inoculant in the silage process.

**Keywords:** Probiotic, antagonism, tolerance, species.

Recibido: 12 de junio del 2018  
Aceptado: 29 de octubre del 2018



© Copyright 2018. Universidad Nacional Agraria

Los artículos de la revista La Calera de la Universidad Nacional Agraria, Nicaragua, se comparten bajo términos de la licencia Creative Commons: Reconocimiento, No Comercial, Compartir Igual. Las autorizaciones adicionales a las aquí delimitadas se pueden obtener en el correo [freddy.aleman@ci.una.edu.ni](mailto:freddy.aleman@ci.una.edu.ni)

En los sistemas ganaderos de América Central es común el uso de diferentes estrategias para la alimentación del ganado, las que se destacan el pastoreo, el uso de ensilajes, heno y la suplementación con concentrados artesanales. En Nicaragua existen una época seca, durante la cual la oferta de forrajes es deficiente y en consecuencia afecta negativamente los parámetros productivos y reproductivos de la ganadería. Los recursos usados en la época seca como alimento se caracterizan por presentar bajos valores nutritivos (Fujisaka *et al.*, 2005).

En época de verano la productividad del ganado se ve afectada por la escasez de alimento y agua, así mismo el aumento en los índices de enfermedades y desnutrición. Al llegar la época de invierno, se asume el reto de recuperar las pérdidas ocasionadas por el manejo inadecuado de los animales y las condiciones ambientales del verano, para lograr obtener mejores ganancias y una productividad rentable en términos económicos (Vives, 2012).

En la producción animal se persigue siempre conseguir una buena situación sanitaria y de rendimiento en los parámetros productivos para obtener resultados económicos rentables manteniendo una relación directa entre el funcionamiento del tracto intestinal, la tasa de crecimiento, índice de conversión y las diversas enfermedades que conlleva a someter al ganado a tratamientos con antibióticos o quimio-terapéuticos, capaces de eliminar tanto patógenos como la flora bacteriana necesaria para el funcionamiento del aparato digestivo (García, 2016).

La búsqueda de nuevas alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento se ha incrementado y actualmente se buscan compuestos que aumenten la inmunidad del huésped y no tengan efectos secundarios o residuales en los productos de origen animal. Los probióticos tienen gran potencial por su efecto modulador de la microbiota del tracto gastrointestinal que genera efectos positivos en el huésped (Giraldo *et al.*, 2015).

El género *Lactobacillus* representan un alto potencial biotecnológico, dada su presencia en diversos procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano y animal. Estas bacterias contribuyen al desarrollo de las características organolépticas de los alimentos, además generan ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos, debido a su marcada capacidad antagonista (Rondón *et al.*, 2008). Las especies *Lactobacillus* son una alternativa al uso del antibiótico con el fin de equilibrar la microbiota intestinal mejorando la asimilación de nutrientes y disminuir los residuos de fármacos en alimentos de origen

animal considerándolo como un factor de riesgo en la salud pública (Lozano *et al.*, 2008).

El objetivo de este estudio es identificar especies del género *Lactobacillus* con potencial probiótico en sustrato fermentado de yuca (*Manihot esculenta*), para suministrarse como una alternativa alimenticia de bajo costo en los sistemas de producción logrando potenciar y aumentar la capacidad digestiva de los animales en producción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del estudio.** El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Agraria, ubicado en el km 12 1/2 en las coordenadas geográficas 12°08'33" de latitud norte y 86°10'31" de longitud oeste (INETER, 2010).

**Aislamiento de las bacterias ácido-lácticas.** La muestra de sustrato fermentado de yuca fue obtenida siete días después de haber sido incubado utilizando 300 gramos de yuca fresca como sustrato en 500 ml de agua destilada y seis gramos de melaza. Posteriormente el sustrato fue trasladado al laboratorio para su análisis. El aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) se realizó por el método de dilución en serie, el cual consiste en homogenizar la muestra y de esta tomar 1 ml del sustrato para ser diluido de manera higiénica al diluyente (agua destilada) y ser homogenizada. Preparada la dilución madre ( $10^{-1}$ ) se procedió a preparar diluciones decimales subsiguientes, para cada dilución se utilizaron tubos con 9 ml de agua destilada (se traspasó 1 ml) a la siguiente dilución ( $10^{-2}$ ) se realizó el mismo procedimiento hasta formar la dilución ( $10^{-7}$ ) (Gutiérrez, 2012).

Se inocularon platos Petri con medio MRS previamente esterilizados con alícuotas de 0,1 ml de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  esparcida con ayuda de un asa Drigalsky sobre la superficie del medio, se hizo de manera triplicada para ambas diluciones. Estas se incubaron en jarras de anaerobiosis por un periodo de 24 a 48 horas a 30°C. Posterior al periodo de incubación unas veces ya con un resultado de crecimiento de colonias bacterianas se tomaron las colonias para proceder nuevamente hacer inoculadas en medios MRS utilizando un asa redonda realizando rayado estriado en tres direcciones, estas se incubaron nuevamente por un periodo de 24 a 48 horas a 30°C con la finalidad de obtener colonias más puras.

**Identificación de las cepas de *Lactobacillus*.** Se realizaron observaciones de colonias bacterianas aisladas mediante coloración Gram al microscopio óptico y se con-

servaron únicamente las que presentaron morfología de bacilos. Posteriormente se realizaron determinación de esporas y pruebas de fermentación de carbohidratos tales como: lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol xilosa.

**Prueba de resistencia a diferentes tipos de pH.** Se inoculo con un asa bacteriológica 3 ml de caldo MRS ajustado a pH 1.5 a 6.0 con intervalos de 0.5 con HCl 1N y se incubaron a 30°C durante 24 horas en condiciones de microaerofilia (Mantilla y Burgos, 2012). Posteriormente se midió la turbidez del medio para demostrar la viabilidad de las colonias.

**Capacidad antagonica de las cepas *Lactobacillus* sobre bacterias patógenas.** Se utilizaron colonias previamente identificadas de *Lactobacillus* sp, resistentes a diferentes grados de pH, posteriormente se sometieron a la prueba de antagonismo mediante el método de Kirby-Bauer (1966) el cual consiste en utilizar el medio solido Mueller Hilton inoculado con la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* sp, respectivamente a una concentración 1x10<sup>8</sup> (0.5 grado de turbidez escala Mackfarland), posteriormente se impregnaron discos de papel filtro esterilizados de 0.5mm de diámetro con las bacterias ácido lácticas identificadas (CNDR, 2004). Las placas se encubaron por un periodo de 24 a 48 horas a 30°C en condiciones de aerobiosis posterior al periodo de incubación se verificó la actividad antagonica por la formación de zonas transparentes alrededor de las colonias con un diámetro mayor a 1mm.

**Prueba de sensibilidad a antibiótico.** Las colonias de bacterias previamente identificadas como *Lactobacillus*, y resistentes a diferentes grados de pH, fueron sometidas a pruebas de sensibilidad a antibióticos a través del método de Kirby-Bauer (1966) consiste en colocar discos de papel impregnados de antibióticos en la superficie del medio previamente inoculado con una suspensión bacteriana 0,5 Mackfarland. Se produce la difusión de antibiótico y el crecimiento bacteriano en la superficie del medio. En el área donde la concentración de antibiótico es suficiente para evitar el crecimiento bacteriano se observa un halo de inhibición con borde definido claramente y con el disco ubicado en el centro del círculo (CNDR, 2004). Para el estudio se utilizaron los medios de cultivos Müller Hilton y medio MRS con previa colocación de los discos con antibióticos según las normas NCCLS (Oxitetraciclina 30µg, Trimetropim Sulfametaxona 25µg) las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis por un periodo de 24 a 48 horas a 30°C posterior al tiempo de incubación la lectura fue efec-

tuada por la medición del diámetro de la zona (Halo) de inhibición.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación de especies *Lactobacillus*.** A partir de la muestra de sustrato de yuca fermentada, se aislaron diez colonias bacterianas y una colonia de levadura en platos Petri conteniendo agar MRS. Las observaciones microscópicas en siete aislados bacterianos con tinción Gram mostraron morfología compatible con *Lactobacillus* sp, mientras que dos mostraron morfología para Bacillus Gram negativos y un único aislado con Bacillus Gram positivos. Mediante pruebas bioquímicas identificaron las especies de *Lactobacillus casei* y *brevis*.

Las especies de *L. casei* y *L. brevis* son bacteria facultativamente heterofermentativa, encontrándose en diferentes hábitats tales como productos lácteos, ensilaje, tractos intestinales humanos, bocas y aguas residuales (Collins *et al.*, 1989), *L. casei* es productora de ácido láctico predominantemente de la forma isomérica L (+), se le considera generalmente como segura (GRAS) y tiene un amplio número de aplicaciones en la industria alimentaria (Arellano *et al.*, 2013).

Estudio realizado por Velásquez *et al.*, 2015, describe a *Lactobacillus casei* como una bacteria probiótica muy eficaz para equilibrar la microflora intestinal, prevenir los trastornos intestinales, regular el sistema inmune específicamente de la respuesta inmune celular y además posee una potente acción antidiarreica. *Lactobacillus brevis* es tolerante a los jugos gastro intestinales, tiene la capacidad de mejorar la salud intestinal se ha utilizado en terapias de intestino irritables. *Lactobacillus brevis* son tradicionalmente utilizados en productos fermentados esta cepa actualmente es una de la más utilizada como probiótico (Ronka *et al.*, 2003).

Los resultados del estudio pueden ser utilizados para mejorar la especificidad y selectividad de microorganismos probiótico a partir de la incorporación de bacterias ácido lácticas a sustratos fermentados de yuca u otro tipo de sustrato de origen vegetal y animal.

**Prueba de tolerancia a pH.** Los siete aislados de *Lactobacillus* fueron sometidos a la prueba de tolerancia a pH, observándose crecimiento bacteriano únicamente en las especies identificadas como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus casei*. Para los géneros de *Lactobacillus* sp, las condiciones de pH no fueron favorables para su crecimiento (cuadro 1).

Rodríguez *et al.*, (2008) afirma que el comportamiento de los cultivos del género *Lactobacillus*

**Cuadro 1.** Prueba tolerancia de *Lactobacillus* sp a diferentes niveles de pH

Especies identificadas	Concentración									
	pH 1.5	pH 2	pH 2.5	pH 3	pH 3.5	pH 4	pH 4.5	pH 5	pH 5.5	pH 6
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> sp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

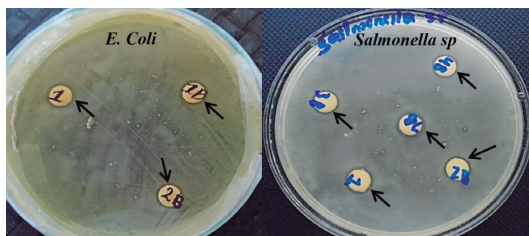
Positivo (+). Crecimiento de las cepas, Negativo (-). Ningún crecimiento.

frente a niveles de pH bajos son capaces de sobrevivir en condiciones de acidez similares a las existentes en el estómago de animales y seres humanos. (Mandingan *et al.*, 2004) menciona que el género *Lactobacillus* es más resistente a condiciones acidas que otras bacterias lácticas siendo capaces de crecer aun cuando el pH haiga caído tanto permitiéndole crecer durante la fermentación láctica natural.

(Carr y col, 2002, citado por Ramírez *et al.*, 2011) indica que las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer en pH tan bajos como 3.2 otras a valores tan altos como 9.6 y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5 permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no tolerarían el pH ácido.

León (2012) hace referencia a la resistencia de los *Lactobacillus* a niveles de pH ácido, por presencia de una gradiente constante entre el pH extracelular y el pH citoplasmático los microorganismos GRAM positivo utilizan un mecanismo conocido como F1-F0ATPasa.

Capacidad antagonica de las cepas *Lactobacillus* sobre bacterias patógenas. Las especies *Lactobacillus casei* y *brevis* exhibieron actividad antagonica contra el patógenos *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella* sp, observándose halos de inhibición con diámetro de 10mm, indicando que los aislados identificado tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del patógeno (figura 1).



**Figura 1.** Halos de inhibición (Flechas) observados en prueba de antagonismo microbiano de *L. casei* y *L. brevis* frente a *E. coli* ATCC 25922 (Izquierda) y *Salmonella* sp (Derecha). 2B: cepa de *Lactobacillus brevis*, 1, 4B, 3B Y 1B: cepa de *Lactobacillus Casei*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio se asimilan con los de (Benítez, 2015) en donde se evaluó la capacidad antagonica de cuatro aislamientos de *Lactobacillus* sp; frente a las bacterias patógenas *E. Coli* y *Salmonella* sp en el cual los aislados presentan una gran actividad antimicrobiana. De igual manera (Amarocho, 2011) indico que la actividad inhibitoria frente a *Salmonella* de las especies *Lactobacillus* podría deberse a los componentes celulares, exclusión competitiva por nutrientes, a la presencia de ácido láctico y otras sustancias activas a pH bajo.

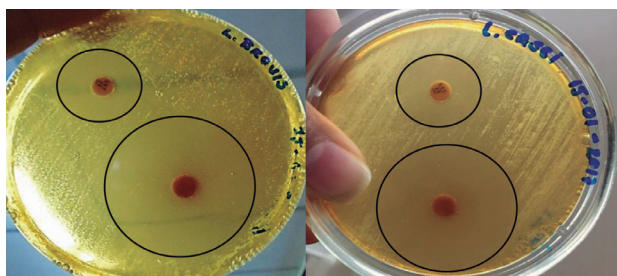
Estudio realizado por (Sánchez *et al.*, 2011) se obtuvieron resultados similares a los del presente, en donde se evaluaron los aislados de *Lactobacillus* sp frente a *E. Coli* 25922 y se determinó la producción de ácidos orgánicos que inhibieron el crecimiento de *E. Coli*.

En este estudio no se evaluó la naturaleza de los procesos de producción de sustancia antagonica de las cepas previamente identificadas *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus casei* pero en un estudio realizado por (Ferreira *et al.*, 2011) describe que en esta actividad pueden estar presentes ácido láctico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, di acetilo, acetaldehído y sustancias de naturaleza proteica antimicrobiana, llamadas bacteriocinas (Cabezas, 2005, citado por Gaitan, 2013) las bacteriocinas son sustancias extracelulares diferentes a los antibioticos que son producidas de forma natural por especies del género *lactobacillus* estas bacteriocinas inhiben el crecimiento a diferentes especies patógenas.

Mateau *et al.*, (1997); citado por García *et al.*, (2009) manifiestan que las bacterias del género *Lactobacillus* además de producir sustancias antagonicas pueden llegar a prevenir o tratar diversas enfermedades gastro-intestinales compitiendo por sitios específicos contra las bacterias patógenas (Gaitan, 2013) menciona que se puede dar también una actividad antimicrobiana por la competencia de nutrientes que se encuentren en el intestino.



**Prueba de sensibilidad a antibiótico.** Los aislados de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus Brevis* fueron sensibles a Trimetropim Sulfametaxona, debido a que se observaron halos de inhibición mayores a 19 mm, también fueron sensibles a oxitetraciclina con halos de inhibición mayores a 15mm (figura 2). Según los criterios de la NCCLS un microorganismo es sensible a Trimetoprim Sulfametaxona si el halo de inhibición es mayor o igual a 19 mm y son resistentes si el halo es menor o igual a 10mm, en relación a oxitetraciclina los microorganismos son sensibles si los halos son mayores o igual a 15 mm y son resistentes si presentan halos menores o igual 11 mm.



**Figura 2.** Prueba de sensibilidad de *Lactobacillus brevis* (Izquierda) y *Lactobacillus casei* (derecha) frente a los antibióticos Trimetoprim Sulfametaxona y Oxitetraciclina.

Los resultados obtenidos en el estudio son similares a encontrados por Lara, 2009 quien refiere que las cepas de *Lactobacillus* especies son susceptibles a oxitetrac-

iclina debido a que no se observa crecimiento bacteriano en presencia del antibiótico, (Moreno, 2012) evaluó la susceptibilidad de las cepas aisladas de *Lactobacillus* sp frente al antibiótico Trimetoprim Sulfametaxona, obteniendo como resultado las cepas fueron sensibles a este antibiótico.

De igual manera (Jurado *et al.*, 2009) evaluó cepas de *Lactobacillus* sp con oxitetraciclina en la cual las cepas fueron sensibles. La sensibilidad de las cepas podría depender de la resistencia a ciertas concentraciones de antibióticos, debido a la presencia de algunos plásmidos, o a propiedades particulares de la pared y membrana de estos microorganismos haciéndolos impermeables a antibióticos. Los resultados también coinciden con estudio realizado por Rodríguez, 2009 en la que destaca a las cepas de *Lactobacillus* como sensibles a la mayoría de los antibióticos de elección en terapias humanas y veterinaria.

## CONCLUSIONES

Se identificaron especies de *Lactobacillus* sp, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus brevis* por medio de pruebas de fermentación de carbohidratos. Las cepas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus brevis* presentaron resistencias a niveles bajos de pH y mostraron antagonismo al enfrentarlas a la cepa bacteriana *E. coli* ATTC 25922 y *Salmonella* sp., sin embargo, resultaron ser sensible al antibiótico Trimetropin-sulfametazona y Oxitetraciclina.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorocho Cruz, C. 2011. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja guirra. Tesis Doctoral. Valencia, España. Universidad politécnica de valencia. NI 253.
- Arellano Arriaga, A. 2013. Evaluación del proceso y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membrana. Tesis de grado. Universidad Nacional de Querétaro. Querétaro, México. NI 109.
- CNDR (Centró Nacional de Diagnóstico y Referencia). 2004. Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica. Managua, NI p 273-297.
- Collins, M; Phillips, B; Zanoni, P. 1989. Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. Nov. International journal of systematic bacteriology (39) (2) 105-108.
- Ferreira Barbosa, F; Jardim de Lima Barbosa, L; Silva Bambirra, L; Figueira Aburjaile, F. 2011. Produção de substâncias envolvidas no fenômeno de antagonismo bacteriano. Revista de Biologia e Ciências da Terra 11(1): 1-10.
- Fujisaka, F; Holmann, M; Peters, A; Schmidt, D; White, C; Burgos, J; Ordoñez, M; Mena, M; Posas, H; Cruz, C; Hincapié, B. 2005. Estrategias para minimizar la escasez de forrajes en zonas con sequías prolongadas en Honduras y Nicaragua.
- Gaitan Vaca, D. 2013. Aislamiento y evaluación de bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica a partir de productos cárnicos madurados artesanalmente. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- García Franco, A. 2016. Aislamiento, caracterización y determinación del potencial probiótico de bacterias lácticas de pollos. Tesis de pregrado. Universidad nacional del centro de buenos aires. Buenos aires, Argentina.
- García, A; Henríquez, P; Retamal, P; Pineda, S; Delgado, C; Gonzales, C. 2009. Propiedades probióticas de *Lactobacillus* sp aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. Rev Méd Chile 137(1):369-376.
- Giraldo Carmona, J; Narváez Solarte, W; Díaz López, E. 2015. Probiótico en cerdos: resultados contradictorios. Revista Biosalud 14(1):81-90.
- Gutiérrez, Y. 2012. Universidad Nacional Agraria. Modulo práctico: técnicas de laboratorio. Managua. NI. 61 p.
- Jurado, H; Aguirre, D; Ramirez, C. 2009. Caracterización de bacterias probiótica aisladas del intestino grueso de cerdos Como alternativa al uso de antibióticos. Rev.MVZ Córdoba 14(2):1723-1735.

- León Reissig, M. 2012. Evaluación *in vitro* de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico. Tesis de grado. Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay.
- Lozano, M; Arias, D. 2008. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. Revista colombiana de ciencias pecuaria 21(1):121-135.
- Mantilla, C; Burgos, A. 2012. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. Revista colombiana biotecnológica 14(1):31-40.
- Moreno Galarza, L. 2012. Aislamiento y selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Tesis de Magister en Ciencias-Microbiología. Bogotá, CO. Universidad Nacional de Colombia. NI 93.
- Rodríguez, O; Perea, J; Martín, Y; Fernández, M; Padrón, I; Núñez de Villavicencio, M. 2008. Evaluación *in vitro* de resistencia de bacterias lácticas a la barrera gástrica y biliar de cerditos y a enterobacterias patógenas. Revista Computadorizada de Producción Porcina 15(3):277-271.
- Rondón, A; Samaniego, M; Bocourt, R; Rodríguez, S; Milián, G; Ranilla, M; Laurencio, M; Pérez, M. 2008. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. Procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. Somenta 6(1):56-63.
- Ronka, E; Malinen, E; Saarela, M; Rinta-Koski, M; Aarnikunnas, J; Palva, A. 2003. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. International Journal of Food Microbiology 83(1):63-74.
- Sánchez, L; Vichi, J; Llanes, M; Castro, E; Soler, D; Espinosa, I; Kociubinski, G; Ferreira, C. 2011. Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* sp. como candidato a probióticas. Revista de Salud Animal 33(3):154-160.
- Velásquez Téllez, J; Giraldo Giraldo, G; Padilla Sanabria, L; Giraldo Castaño, Y. 2015. Crecimiento de *Lactobacillus casei* ssp *casei* ATCC 393 en suero clarificado. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial 13(1):19-27.
- Vives Noguera, R. 2012. Suplementación estratégica y mejoramiento de la alimentación en época de verano. Tesis de grado. Antioquia, CO. Corporación Universitaria la Sallista. NI 102.