

Research Article

Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Small Intestine of Piglets as Possible Probiotic Strains

Caracterización Bioquímica de Bacterias Ácido Lácticas Procedentes de Intestino Delgado de Lechones Como Posibles Cepas Probiótica

Carlos Castillo, Guido Brito, Luis Tello, and Luis Flores

Carrera de Zootecnia, Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior de Chimborazo, Riobamba, Ecuador

ORCID

Luis Flores: <https://orcid.org/0000-0002-7642-7049>

II CONGRESO
INTERNACIONAL DE
PRODUCCIÓN PECUARIA Y
AGROINDUSTRIAL ESPOCH
2021 (II CEPPEA 2021)

Corresponding Author: Carlos
Castillo; email:
luis.tellof@epoch.edu.ec

Published: 14 June 2022

Production and Hosting by
Knowledge E

© Castillo C et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract

A major problem the pig farms are facing today is the use of industrial probiotics that can harm both the animals and the consumers. Thus, the main objective of this study was the selection, characterization, and identification of the *Lactobacillus* sp strains from the small intestine of piglets as possible probiotic strains. Eight animals were divided into two groups – one with four 21-day-old piglets and the other with four 40-day-old ones. Descriptive statistics were applied. Once the sowing was done, the strains found in the small intestine were isolated according to their morphology. Eight strains were found, and basic biochemical tests were carried out, such as gram staining. All eight strains were Bacilli-positive and the catalase, oxidase, and KOH tests were negative. Next, biochemical tests were carried out for the identification of each isolated strain, such as the acidification test in which the longer hours of acidification lead to a considerable decrease in pH while a 0.3% growth in the bile. Moreover, strain 6 had greater resistance to the bile while strain 5 had a lower resistance. Using the bile and carbohydrate fermentation, the following *Lactobacillus* species were identified: *Lactobacillus fermentarun*, *L. delbrueck ii*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. acidiphilus*, *L. brevis*, *L. johnsonii*, and *L. plantarun*. The authors conclude that isolated strains can be used as probiotics if they meet the minimum CFU/gr and recommend conducting other biochemical tests such as the API 50 CHL tests for better identification.

Keywords: *Lactobacillus* sp., piglets, lactic acid, bacteria, small intestine.

Resumen

La problemática de hoy en día en las explotaciones porcícolas es la utilización de probióticos industriales los cuales pueden causar perjuicios a la salud del animal y del consumidor, es por ello que el objetivo principal de la presente investigación fue la selección, caracterización e identificación de las cepas de *Lactobacillus* sp provenientes del intestino delgado del lechón como posibles cepas probióticas, se utilizaron 8 animales divididos en 2 grupos 4 de 21 días y 4 de 40 días y se aplicó una estadística descriptiva. una vez realizada la siembra, se realizó el aislamiento de las cepas encontradas en el intestino delgado de acuerdo a su morfología se encontró 8 cepas, después se realiza las pruebas bioquímicas básicas como es tinción Gram siendo todas las cepas Bacilos positivos además las pruebas de catalasa, oxidasa y KOH dieron resultados negativos luego de esto se realizó las pruebas bioquímicas para su respectiva identificación de cada cepa aislada como es la prueba

 OPEN ACCESS



de acidificación en la cual a mayor horas de acidificación existe una mayor disminución considerable del pH, mientras que, en el crecimiento en bilis al 0,3% la cepa 6 es quien tuvo una mayor resistencia a la bilis y la cepa 5 una menor resistencia a la bilis y la fermentación de carbohidratos la cual se utilizó para la identificación de las especies de *Lactobacillus* encontrándose los siguientes: *Lactobacillus fermentarum*, *delbrueckii*, *reuteri*, *casei acidiphilus*, *brevis*, *johnsonii* y *plantarum*, se concluye que las cepas aisladas pueden ser utilizadas como probióticas al cumplir con el mínimo de UFC/gr y se recomienda aplicar otras pruebas bioquímicas como las pruebas API 50 CHL para una mejor identificación.

Palabras Clave: *Lactobacillus sp.*, lechones, bacterias, ácido láctico, intestino delgado.

1. Introducción

Los probióticos son organismos vivos que se utilizan hoy en día para mejorar la digestión del intestino de los animales especialmente en estados de estrés como es al momento del destete donde los animales son más susceptibles a contraer enfermedades las cuales disminuyen su rendimiento productivo.

Actualmente ante la prohibición de los antibióticos como promotores del crecimiento en la Unión Europea y la creciente demanda por parte de los consumidores de una mayor calidad y seguridad alimentaria, los probióticos pueden jugar un papel muy activo en la alimentación porcina, como sustancias estimulantes del crecimiento y de la mejora en la salud animal, siendo unas sustancias bien vistas por parte de los consumidores [1].

El uso inadecuado de antibióticos para contrarrestar problemas gastrointestinales en lechones al destete, "ha generado resistencias cruzadas y una disminución en efectividad de los medicamentos. Los antibióticos utilizados en dosis de ataque, ejercen un efecto favorable en el tracto digestivo de lechones sobre microorganismos patógenos, responsables de los desórdenes intestinales; además, las bacterias patógenas compiten con el huésped por nutrientes afectando el desempeño de los animales. [2]

Una de las fuentes de obtención de *Lactobacillus* es el tracto gastrointestinal de animales; la cantidad y la variedad de las especies va a depender de la alimentación que reciba dicho animal desde los primeros días de su nacimiento. Cuando los animales se desarrollan en sistemas de producción, tanto extensivos como en forma silvestre, la colonización del aparato digestivo ocurre en forma espontánea adquiriendo la microbiota del entorno que le rodea. En un animal sano cada porción del intestino es colonizada por una microbiota típica, la cual se adapta y se desarrolla en una simbiosis benéfica con el hospedero [3]



Las bacterias ácido lácticas forman parte de la microbiota intestinal normal de muchos animales y actúan como probióticos. Comparten características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común; son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, inmóviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes, son negativos a la oxidasa y catalasa. Asimismo, como principal producto de la fermentación de carbohidratos generan ácido láctico, crecen a diferentes temperaturas y alta concentración de sal, toleran pH ácido o alcalino y son principales microorganismos utilizados como probióticos [4].

En la actualidad se buscan compuestos que aumenten la inmunidad del huésped y no tengan efectos secundarios o residuales en los productos de origen animal; es allí donde los probióticos, prebióticos y simbióticos tienen un gran potencial por su efecto modulador de la microbiota del tracto gastrointestinal, que genera efectos positivos en el huésped.

2. Materiales y Métodos

2.1. Sacrificio y obtención de muestras del intestino delgado

Antes del sacrificio el animal debe estar sujetado e inmovilizado correctamente para ser aturdidos, el material de aturdimiento debe ser de acuerdo a la especie y el tamaño del animal, una vez aturdidos deben ser sangrados inmediatamente y faenados para posteriormente proceder a la extracción del intestino delgado del cerdo.

Esta investigación se realizó en los laboratorios de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH obteniéndose una muestra de cada parte del intestino delgado para posteriormente realizarse las diluciones hasta la menor 3 a la cual se realizó la siembra en agar mrs para luego continuar con el aislamiento de las colonias

El procedimiento de preparación de las diluciones de las muestras fue realizado mediante diluciones seriadas, cual estable, pesar 10g de la muestra de cada parte del intestino delgado y colocar en un matraz de Erlenmeyer conteniendo 90 mL de agua peptonada previamente esterilizada, agitar el envase hasta su homogenización, [5] Para la siembra se utilizó Agar MRS [6].

2.2. Aislamiento de microorganismos

Para seleccionar las colonias con características macroscópicas pertenecientes a las BAL se tomó en cuenta como es la forma tamaño color, las placas que fueron utilizadas



para el recuento en agar MRS a un pH 5 y se incubó las placas en posición invertida a 37°C por 72h en condiciones aeróbicas, [5].

Table 1

Morfología de las cepas aisladas.

# Cepa	Forma	Color	Tamaño (mm)	Superficie
1	Circular	Crema	0,5	Liza
2	Irregular	Blanca	1	Concavo
3	Irregular	Blanca	3	Liza
4	Irregular	Crema	2	Convexo
5	Irregular	Blanca	4	Liza
6	Circular	Blanca	2	Convexo
7	Irregular	Blanca	5	Convexo
8	Circular	Blanca	0,1	Liza

Table 2

Identificación bioquímica de cepas aisladas.

Cepa	Tinción	Catalasa	Oxidasa	KOH
1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

2.3. Pruebas bioquímicas

2.3.1. Prueba de catalase

Se realiza un frotis sobre un portaobjetos limpio, posteriormente se adicionó entre 1 y 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 %, se observó la presencia o ausencia de efervescencia para comprobar la existencia de catalasa. Las bacterias ácido lácticas son catalasa negativa [3].

Tomar una colonia con el asa de inoculación y depositarla sobre una tira de oxidasa. La cepa es catalasa positiva cuando hay un viraje del color blanco de la tira a morado, caso contrario se reporta como oxidasa negativa. [5].

**Table 3**

T de student para la prueba de acidificación.

	6 horas	12 horas
Media	6,40625	5,4975
Varianza	0,1231125	0,23719286
Observaciones	8	8
Coefficiente de correlación de Pearson	0,96675751	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	7	
Estadístico t	14,8650643	
P(T<=t) una cola	7,4718E-07	**
Valor crítico de t (una cola)	1,89457861	
P(T<=t) dos colas	1,4944E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	2,36462425	

Table 4

Prueba de fermentación de carbohidratos.

# Cepa	Glucosa	Fructosa	Lactosa	Maltosa	Manitol
1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
2	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
4	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
6	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
8	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

2.3.2. Prueba de tinción de Gram

Esta técnica permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de coloración. Los organismos que retienen el color violeta se (acetona), y se tiñen con el siguiente colorante (safranina) y aparecen como rojos, se denominan Gram-negativas [6].

2.3.3. Prueba KOH

Esta prueba es un método rápido de confirmación de la tinción Gram. La ausencia de formación de hilo mucoide nos informa de la resistencia de la pared bacteriana a la

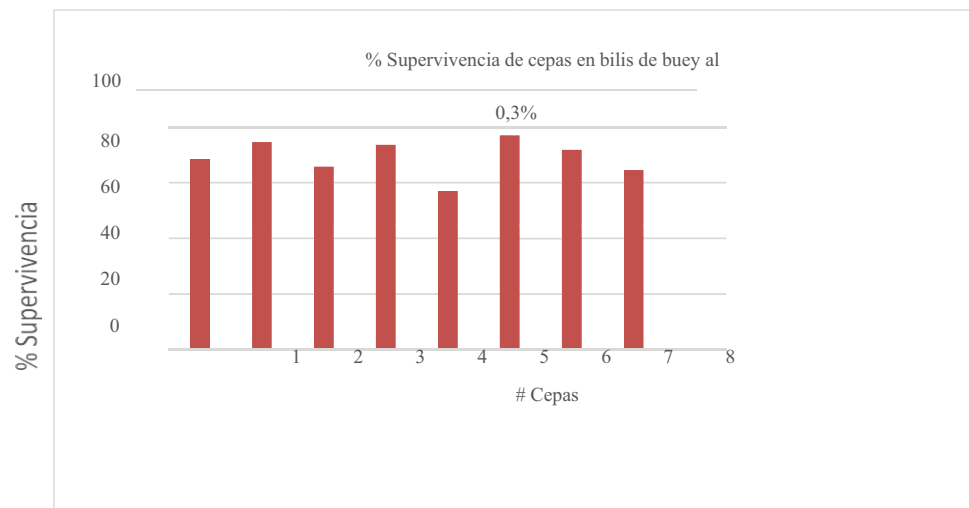


Figure 1

Crecimiento en bilis de buey deshidratada..

solución alcalina, de modo que si la prueba KOH nos da resultado negativo (no hay hilo mucoso), la bacteria será Gram positiva, y viceversa. [6].

2.3.4. Prueba de fermentación de azúcares

Colocar 10 ml del caldo rojo fenol en un tubo de ensayo estéril que contiene en su interior un tubo Durham con la abertura hacia abajo. Auto clavar los tubos de ensayo a 121 °C por 15 minutos. Con el asa de inoculación se tomó una cepa aislada e inocularla en el caldo rojo fenol preparado. Incubar a 37° los aislados de MRS, por 48h. Si hay fermentación del carbohidrato el medio se tornará amarillo y si hay producción de gas durante la incubación de los cultivos, éste se manifiesta por la presencia de burbujas en el interior de los tubos Durham, reportando así la prueba como positiva. [5].

2.3.5. Simulación de tolerancia a jugo gástrico y sales biliares

En la evaluación de la tolerancia de estas cepas a pH ácido luego de activar el microorganismo, se tomaron 100 µl del cultivo y se inoculó en caldo MRS ajustado a pH 2,0 con HCL 6 M y se incubó por 2 h a 37 °C. En la determinación de la tolerancia a sales biliares de las cepas evaluadas se tomaron 100 µl del cultivo fresco y se inoculó en caldo MRS enriquecido con sales biliares (0,3%), (pH: 7,0) se incubó por 48 h a 37 °C. La confirmación de células viables se realizó con el procedimiento descrito anteriormente [7]



3. Resultados y Discusión

3.1. Morfología de la cepas aisladas

De acuerdo con los resultados expuestos en Tabla N°1 Según [8] manifiesta que se aisló 12 cepas del intestino delgado en su investigación siendo mayores a las aisladas en esta investigación pudiendo ser la razón la baja de pH de 7 a 5 siendo donde se desarrollan específicamente bacterias ácido lácticas del genero lactobacilos.

En relación al tamaño de las cepas aisladas tienen un mínimo de 0,1mm hasta 5mm de diámetro como se describe en el cuadro 4 la cuales son casi similares a lo descrito por [9] al igual que [10] los cuales manifiestan que las cepas de Lactobacillus formaron colonias cuyo tamaño fue de 1 a 2 mm, de color blanco cremoso, de forma redonda, puntiformes, con bordes enteros, y superficie convexa, de consistencia butirosa.

3.2. Identificación bioquímica de cepas aisladas

En la Tabla N° 2 morfológicamente se identificaron 8 cepas Bacilos Gram positivos las cuales luego de realizar las pruebas bioquímicas básicas se concluyeron que son bacterias ácido lácticas, para que una bacteria sea un lactobacilo debe ser negativo a oxidasa, catalasa e hidróxido de potasio, y positivo a tinción Gram como menciona en sus estudios realizados por [8] de igual manera menciona [11] en su investigación siendo los resultados de estas dos investigaciones similares a nuestros resultados obtenidos. De igual manera menciona [12] que la caracterización morfológica y bioquímica de las BAL halladas, donde se encontró que todas las colonias se tiñen de azul, seleccionándolas como BAL por la especificidad del medio y por lo tanto son bacilos Gram positivos.

3.3. Prueba de acidificación

En la tabla 3 [13] manifiesta en su investigación dice que la resistencia al pH bajo, es una de las propiedades requeridas en los microorganismos probióticos, su razón se debe al tránsito de los microorganismos deseables por el tracto gastrointestinal luego de haber resistido la alta acidez encontrada en el estómago, en este órgano, se tiene estimado que el tiempo de duración de la digestión es de tres horas y los valores de pH oscilan entre 2.0 -3.0 en algunos casos llegando hasta 1.0 comparados con nuestros resultados son superiores ya que a mayor tiempo mayor disminución del pH al ser bacterias ácido lácticas [12] menciona que también se puede considerar que todas son ácidas con PH



que van de 3,75 a 5,74 siendo estos resultados casi similares a los obtenidos en la presente investigación a las 12 horas con un promedio de 5,49.

3.4. Fermentación de carbohidratos

En la tabla 4 de acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas de fermentación de carbohidratos el cual la cepa 1 dio positivo a lactosa, fructosa, maltosa y glucosa, negativo a manitol, el cual es similar a los resultados obtenido por [14] [15] siendo en esta última investigación positivo el manitol lo cual lo identifica como *Lactobacillus fermentarun*.

La cepa 2 luego de realizar la prueba de fermentación de carbohidratos se obtuvo los siguientes resultados dando negativo a lactosa, maltosa y manitol siendo semejantes a los resultados expresados por [16] y positivo a fructosa y glucosa identificándolo como *Lactobacillus delbrueckii*.

Los resultados de la fermentación de carbohidratos de la cepa 3 dio positivo a lactosa, maltosa y glucosa siendo semejantes a los descritos por [17] y negativo a fructosa y manitol siendo similares estos resultados a los encontrados por [18] identificándolo como *Lactobacillus reuteri*.

La cepa 4 después de observar los resultados de la fermentación de carbohidratos siendo positivo a lactosa, fructosa, maltosa, manitol y obteniendo un resultado negativo en glucosa la cual puede ser variable su fermentación según lo descrito por [15] identificándolo como un *Lactobacillus casei*.

La cepa 5 según las pruebas de fermentación de azúcares dio positivo a lactosa, fructosa, maltosa y glucosa, negativo a manitol, siendo similares los resultados encontrados por [14] siendo identificado como *Lactobacillus acidiphilus*.

De los resultados obtenidos en la prueba de fermentación de carbohidratos, de la cepa 6 los cuales son positivos a lactosa, fructosa, maltosa, glucosa y manitol los cuales son iguales a los resultados que manifiesta al igual que [19] en sus investigaciones lo identifican como *Lactobacillus brevis*.

Los resultados obtenidos luego de la prueba de fermentación de carbohidratos de la cepa 7 se observó resultado negativo manitol y positivos para maltosa, lactosa, fructosa y glucosa positivos como lo describe en Abis Enciclopedia siendo identificado como *Lactobacillus johnsonii*.

De acuerdo a los resultados de la fermentación de carbohidratos de la cepa 8 la cual dio resultados positivos a lactosa, fructosa, maltosa, glucosa y manitol siendo



sus resultados igual a los descritos por [15] de igual manera manifiesta [19] siendo identificado como *Lactobacillus plantarum*.

3.5. Bilis de buey deshidratada

Los resultados de la figura 1 [20] manifiesta en su investigación que las cepas se clasifican como resistentes por encima del 68 % (R), tolerantes entre 34,0 - 66,9 % (T) y sensibles por debajo de 33,9 % al momento de analizar nuestros resultados se observó que existen 5 cepas resistentes por encima del 68%, la cepa 1,2,4,6 y 7 y tolerantes 3 cepas siendo la 3,5 y 8.

Según [21] las cepas de *Lactobacillus* permanecen viables cuando se exponen a valores de pH de 2.5-4.0, pero exhiben pérdida de viabilidad a valores de pH más bajos las cepas tolerantes al ácido tienen la ventaja de sobrevivir en las condiciones de pH bajo del estómago (tan bajo como pH 2,0), donde se secretan ácidos clorhídrico y gástrico. [14] menciona que un cultivo probiótico eficaz, las BAL deben ser viables con alrededor del 0,3% de sales biliares.

4. Conclusiones

Al realizar la caracterización morfológica de las cepas obtenidas del intestino delgado de los lechones se encontraron 8 cepas con característica de bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas.

Al realizar la caracterización e identificación de las cepas aisladas mediante las pruebas bioquímicas se encontraron que eran bacilos positivos, oxidasa, catalasa, y KOH negativos además se realizó las pruebas de acidificación, y de crecimiento en bilis

En el intestino delgado de los lechones se aislaron 8 cepas de lactobacilos con capacidades probióticas las cuales después en pueden ser usadas en la alimentación de lechones al momento del destete para disminuir el estrés producido por el mismo.

References

- [1] Sotillo QA. Características de la flora intestinal del lechón: efecto de los probióticos. Ediporc. 2007;102:19-27.
- [2] Mendoza González, N. E. (2020). Evaluación de un biopreparado probiótico de *Lactobacillus Plantarum* en la dieta de lechones al destete (Master's thesis, Calceta:



ESPAM MFL).

- [3] Jaimes G, Zulay Y. Revencyt-RedidiCiencia. Aislamiento, identificación y caracterización molecular de *Lactobacillus* sp, provenientes de diferentes fuentes animales y ensilados: su evaluación como potencial probiótico para nutrición animal. Mérida-Venezuela 2011. <http://bdigital.ula.ve/RediCiencia/>.
- [4] Rojas Mogollón, C., Ochoa Mogollón, G., Alfaro Aguilera, R., Querevalú Ortiz, J., & Sánchez Suárez, H. (2021). Producción y evaluación de inóculos lácteos probióticos obtenidos del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) propuestos para alimentación porcina. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(1), 120-137.
- [5] Mecánica F, Por P, Cruz D, Darwin F, Chimbo V. (2015) Escuela superior politécnica de chimborazo. Chimbo, J. *Revista de la Inducción Biológica*, 24 (2), 40 - 45
- [6] Montero V. Galindo V. Propuesta de gestión para la optimización de procesos productivos en una planta de beneficio de pollo de engorde tipo amarillo. Facultad de Ciencias y Tecnología; Universidad del Azuay, 2016. Available from: <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/6858>
- [7] Cueto-Vigil, M. C., Acuña-Monsalve, Y., & Valenzuela-Riaño, J. (2010). In vitro evaluation of probiotic potential of lactic bacteria acid isolated From coastal serum. *Actualidades Biológicas*, 32(93), 129-138.
- [8] Mena G. La importancia de utilizar el juego simbólico en la primera infancia de los niños y niñas. Escuela de Postgrado; Universidad Nacional de Tumbes, 2019. Available from: <http://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/UNITUMBES/1042/QUILICHECABANILLAS{%}2CIRMA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [9] Cortez R, Aranguren A. Aislamiento e identificación de bacterias ácido láctico del género *Lactobacillus* SPP a partir de heces de perros (*Canis lupus familiaris*) mestizos lactantes. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 2014;19:5-10. Available from: http://bibvirtual.ucla.edu.ve/cgiwin/be_alex.exe?Autor=Gonz{%}E1lez,+M.&Nombrebd=RVSP&Sesion=276824151&TipoDoc=S.
- [10] Ramírez-López, C., Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Información tecnológica*, 27(6), 115-128. DOI 10.4067/S0718-07642016000600012.
- [11] Cabrera PJ, Andueza F. Evaluación Microbiológica de las aguas termales del balneario las Peñas, cantón Baños, provincia Tungurahua. Facultad de Ciencias; Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., 2015. Available from: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4633>.
- [12] Sánchez H, Ochoa G. Molecular identification of lactobacilos of the digestive tract of piglet (*Sus scrofa domesticus*). *Manglar*. 2016;13(1):3-16. DOI



10.17268/manglar.2016.002.

- [13] Galarza LJ. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Posgrado Interfacultades de Microbiología; Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Facultad de Ciencias Facultad 2012.
- [14] Huang J, Zhang W, Hu Z et al. Isolation, characterization and selection of potential probiotic lactic acid bacteria from feces of wild boar, native pig and commercial pig. *Livestock Science*. 2020;237:104036. DOI 10.1016/j.livsci.2020.104036. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104036>
- [15] Ahmad MS, Zargar M, Mir S et al. Morphological and biochemical studies for the identification of *Lactobacillus plantarum* sp. nov., and *Lactobacillus fermentum* SP. Nov., from municipal waste. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018;7(5):1421-1424. DOI 10.13140/RG.2.2.13721.06240.
- [16] Martínez M, Steven B. Correlación del estudio de la simbiosis microbiana. Facultad de Ciencias; Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador Sede Guayaquil 2019 available from: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/48596789/4613>.
- [17] Zhao X, Gänzle MG. Genetic and phenotypic analysis of carbohydrate metabolism and transport in *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*. 2018;272:12-21. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.021. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.021>.
- [18] Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C et al. Probiotic characterization of *Lactobacillus* isolates from canine faeces. *Journal of Applied Microbiology*. 2019;126(4):1245-1256. DOI 10.1111/jam.14197.
- [19] Peralta LP. Actividad antagónica de bacterias ácido lácticas aisladas de queso fresco artesanal frente a *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. Facultad de Ciencias Biológicas; Cusco-Perú 2014
- [20] Vera-Mejía, R., et al. "Lactobacillus plantarum strains with probiotic potentials isolated from Creole pigs." *Revista de Salud Animal* 40.2 (2018). Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253570X2018000200004&lng=en&nrm=iso&tIng=es.
- [21] Song M, Yun B, Moon JH, Park DJ, Lim K, Oh S. Characterization of selected *Lactobacillus* strains for use as probiotics. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2015;35(4):551-556. DOI 10.5851/kosfa.2015.35.4.551.