

---

# “Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I”

“EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA. Part I”

---

(\*) Hernani Larrea C., Martha Flórez F., José Huapaya Y.

## RESUMEN

Se evaluó la actividad antimicrobiana de seis diferentes bacterias ácido lácticas sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae*, bacterias patógenas del tracto gastrointestinal. Los ensayos determinaron que todas ellas presentaron acción antimicrobiana sobre las bacterias entéricas, destacando *Lactobacillus fermentum*, quien produjo un efecto bactericida.

## PALABRAS CLAVE

Bacterias ácido lácticas. Actividad antimicrobiana.

## ABSTRACT

The antimicrobial activity of six different lactic acid bacteria was evaluated on *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* and *Shigella dysenteriae*, pathogenic bacteria of the gastrointestinal tract. Tests determined that all of them presented antimicrobial action on the enteric bacteria, especially *Lactobacillus fermentum*, that generated a bactericidal effect.

## KEY WORDS

Lactic acid bacteria, antimicrobial activity.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un creciente interés, tanto por parte de la comunidad científica como de la población general, hacia el papel que los probióticos pueden desempeñar en el mantenimiento de la salud y en la prevención y tratamiento de diferentes enfermedades<sup>1</sup>.

Sin embargo, el concepto *probiótico* ha cambiado a lo largo de los años, volviéndose más amplio y menos preciso. La

definición más aceptada actualmente es que son microorganismos vivos que, al ser ingeridos, producen un efecto positivo en la salud del individuo<sup>2</sup>. Son numerosos los microorganismos que se incluyen en las listas de posibles probióticos, principalmente, bacterias ácido lácticas (BAL) de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*<sup>3</sup>.

Se ha identificado un grupo de requerimientos como importantes propiedades que deben cumplir las BAL a fin de ser efectivos organismos probióticos. Estos incluyen: su habilidad de adherirse a las células, el poder excluir o reducir la adherencia patógena, su resistencia y multiplicidad, su capacidad para producir bacteriocinas antagonistas al crecimiento patógeno así como coagregar y formar una flora balanceada<sup>4</sup>.

Hoy en día, debido a las características previamente señaladas, se hace necesario destacar las posibilidades terapéuticas de las bacterias ácido lácticas que pueden ser útiles en el tratamiento de patologías infecciosas<sup>5</sup>, como en la prevención de infecciones urinarias<sup>6,7</sup>, para el tratamiento de diarreas infantiles o del viajero<sup>8</sup>, así como para las relacionadas con el consumo de antibióticos, en el tratamiento del estreñimiento<sup>9,10</sup> y en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, dada su capacidad de modular la flora intestinal<sup>11,12,13</sup>.

De otro lado, ciertas cepas de BAL actúan sobre las reacciones de hipersensibilidad retardada, la producción de anticuerpos, la activación funcional de macrófagos<sup>5</sup>, y también son capaces de ejercer una acción antitumoral al inhibir agentes químicos carcinogénicos<sup>14,15,16</sup>.

La finalidad del presente estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes cepas de bacterias ácido lácticas frente a algunos agentes patógenos comunes en infecciones gastrointestinales del hombre.

---

(\*) Centro de Microbiología y Parasitología  
Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres  
hlarrea@usmp.edu.pe

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Microorganismos

#### Caracterización de la suspensión de bacterias ácido lácticas

Las cepas puras liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 33200, *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338, *Lactobacillus casei* ATCC 27139, *Lactobacillus plantarum* ATCC 10776, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 y *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 fueron sembradas en medio de Man, Rogosa y Sharp (MRS) e incubadas a 37° C por 48 horas bajo condiciones de anaerobiosis y posteriormente mantenidas a 4° C (cepas control).

Para los estudios se inocularon en tubos de ensayo conteniendo caldo MRS (pH 6,0) con 10<sup>7</sup> UFC/mL de cultivo puro. Se incubaron a 37° C por 24 horas y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue colocado en baño maría a 45° C y resuspendido en 1/5 de su volumen original en agua destilada. Finalmente fue filtrado a través de una membrana estéril de 0,22 µm de porosidad. Esta solución madre se denominó suspensión BAL<sup>17</sup>.

#### Caracterización de las bacterias indicadoras

Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizaron las siguientes cepas incubadas en caldo nutritivo a 37° C por 24 horas: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae*, aisladas e identificadas a partir de muestras clínicas.

Estas cepas fueron sembradas por estrias en agar triptícaso soya (ATS) e incubadas a 37° C por 18 horas. Posteriormente, se recolectaron los microorganismos existentes en la superficie de cultivo, llevándolos a un tubo de ensayo conteniendo suero fisiológico estéril, al cual se agregó un par de colonias hasta tener una turbidez equivalente a la escala 0,5 de MacFarland, denominándose a esta, suspensión inóculo<sup>17</sup>.

### Bioensayo

#### Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la mínima cantidad de BAL capaz de impedir el crecimiento bacteriano. Mediante la técnica de macrodilución en caldo se determinó la CMI capaz de inhibir el desarrollo microbiano visible, utilizando un inóculo de 0,1 mL de concentración equivalente a la escala 0,5 de McFarland.

Se realizaron diluciones seriadas a la mitad en caldo Müeller-Hinton (MH). Se emplearon dos controles: el primero fue el

control positivo (caldo MH al que se añadió la suspensión bacteriana) y el segundo fue el control negativo (caldo MH sin suspensión bacteriana). Se emplearon las siguientes diluciones de BAL: 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 µL/mL, formándose doce ensayos, cada uno con tres repeticiones por microorganismo.

Al término de la inoculación de la cepa a cada uno de los tubos, se procedió con una homogenización suave y de inmediato se llevó a incubar a 30° C por un período de 18 horas. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura de los tubos, determinando su grado de turbidez, para lo cual fue necesario comparar cada uno de los tubos con los controles positivo y negativo<sup>18</sup>.

#### Determinación de la concentración mínima bactericida

La concentración mínima bactericida (CMB) se definió como la menor concentración de BAL capaz de reducir el recuento de microorganismos en un 99,9%. A partir de los resultados de la concentración mínima inhibitoria se determinó la CMB. Para ello, se extrajo 1 mL de los tubos en los cuales no se observó crecimiento visible del inóculo (inhibición de crecimiento); esta suspensión fue sembrada en placas Petri, debidamente rotuladas con la concentración correspondiente, añadiéndose luego agar Müeller-Hinton (MH) a 45° C aproximadamente.

Se utilizó como control positivo agar MH con 0,1 mL de inóculo sin BAL, y como control negativo, agar MH sin inóculo y sin BAL. Las placas se dejaron incubar durante 24 horas a 30° C.

La lectura de los resultados se realizó en aquellas placas donde las BAL fueron capaces de eliminar completamente el desarrollo bacteriano o que eliminó al 99,9% de bacterias, comparándolo con el control negativo. La suspensión se consideró bactericida si su CMB, fue igual o ligeramente superior (no más de una dilución) que la CMI<sup>18</sup>.

## RESULTADOS

La principal dificultad encontrada en el desarrollo del presente estudio fue la estandarización del bioensayo para la evaluación de la actividad antimicrobiana.

No habiendo un protocolo uniformizado de trabajo en la evaluación de la actividad antimicrobiana nos vimos en la necesidad de realizar una serie de ensayos preliminares, lo que permitió descartar las técnicas de difusión en pocillo y en disco en una primera parte, luego de lo cual se procedió a la evaluación *in vitro*. Luego de casi dos años de pruebas, se validó el bioensayo utilizado en esta investigación.

**TABLA 1. Promedio de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la suspensión de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a *Escherichia coli* bajo condiciones de laboratorio. 2006.**

BAL	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (μL/mL)													
	Control positivo	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Control negativo
L.acidophilus	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L.fermentum	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.casei	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
L.plantarum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
L.bulgaricus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L.helveticus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

(+): presencia de turbidez; (-): ausencia de turbidez.

**TABLA 2. Promedio de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la suspensión de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a *Salmonella enteritidis* bajo condiciones de laboratorio. 2006.**

BAL	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (μL/mL)													
	Control positivo	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Control negativo
L.acidophilus	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.fermentum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L.casei	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L.plantarum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L.bulgaricus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L.helveticus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+): presencia de turbidez; (-): ausencia de turbidez.

**TABLA 3. Promedio de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la suspensión de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a *Shigella dysenteriae* bajo condiciones de laboratorio. 2006.**

BAL	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (μL/mL)													
	Control positivo	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Control negativo
L.acidophilus	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
L.fermentum	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L.casei	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L.plantarum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L.bulgaricus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L.helveticus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

(+): presencia de turbidez; (-): ausencia de turbidez.

**Efecto bacteriostático**

Las Tabla No. 1, 2 y 3 muestran el promedio de los ensayos de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las suspensiones de bacterias ácido lácticas frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae*, respectivamente.

El mejor efecto bacteriostático frente a *Escherichia coli* lo presentó *Lactobacillus fermentum* con una CMI de 4 µL/mL. En el caso de *Salmonella* fue *Lactobacillus acidophilus* el mejor con una CMI de 4 µL/mL mientras que en el ensayo con *Shigella* fue *Lactobacillus casei* el que presentó una mejor CMI con 8 µL/mL.

**Efecto bactericida**

Las Tabla No. 4, 5 y 6 muestran el promedio de los ensayos de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de las suspensiones de bacterias ácido lácticas frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae*, respectivamente.

El mejor efecto bactericida frente a *Escherichia coli* lo presentó *Lactobacillus fermentum* con una CMB de 8 µL/mL. En el caso de *Salmonella* fue *Lactobacillus acidophilus* el mejor con una CMB de 16 µL/mL mientras que en el ensayo con *Shigella* fue *Lactobacillus casei* el que mostró una mejor CMB con 32 µL/mL.

La comparación de los efectos bacteriostático y bactericida de las diferentes bacterias ácido lácticas frente a las bacterias entéricas, se muestra en los Gráficos No. 1 y 2, respectivamente.

**DISCUSIÓN**

Las bacterias ácido lácticas destacan por su capacidad de producir sustancias de actividad bactericida como son las bacteriocinas. Estas sustancias purificadas podrían evaluarse como alternativa en el tratamiento de infecciones bacterianas tóxicas o sistémicas por microorganismos resistentes a la mayor parte de los antibióticos conocidos.

**TABLA 4. Promedio de la concentración mínima bactericida (CMB) de la suspensión de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a *Escherichia coli* bajo condiciones de laboratorio. 2006.**

BAL	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µL/mL)													Control negativo
	Control positivo	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
L.acidophilus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L.fermentum	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L.casei	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L.plantarum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L.bulgaricus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L.helveticus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+): presencia de colonias; (-): ausencia de colonias.

**TABLA 5. Promedio de la concentración mínima bactericida (CMB) de la suspensión de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a *Salmonella enteritidis* bajo condiciones de laboratorio. 2006.**

BAL	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µL/mL)													Control negativo
	Control positivo	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
L.acidophilus	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
L.fermentum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L.casei	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L.plantarum	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
L.bulgaricus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
L.helveticus	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

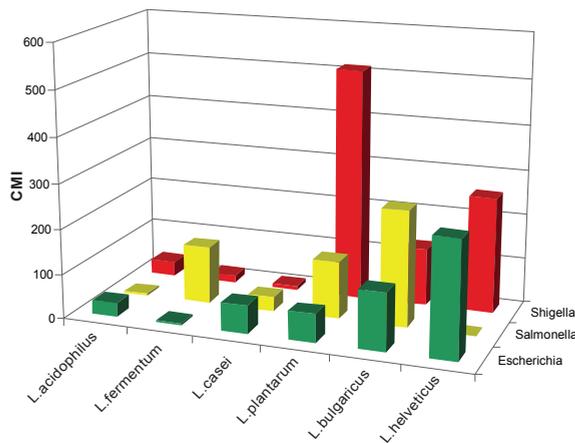
(+): presencia de colonias; (-): ausencia de colonias.

**TABLA 6. Promedio de la concentración mínima bactericida (CMB) de la suspensión de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a *Shigella dysenteriae* bajo condiciones de laboratorio. 2006.**

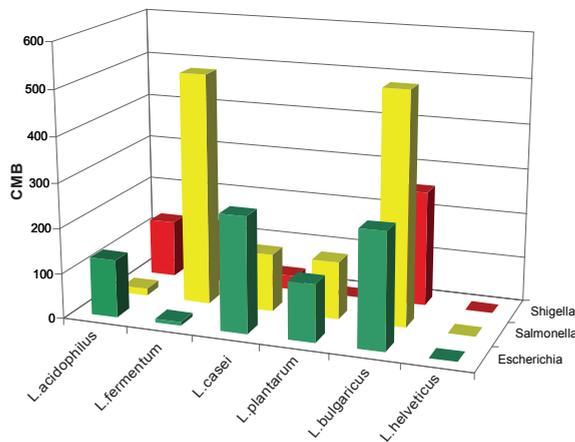
BAL	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (µL/mL)													
	Control positivo	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Control negativo
<i>L.acidophilus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>L.fermentum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>L.casei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>L.plantarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L.bulgaricus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>L.helveticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

(+): presencia de colonias; (-): ausencia de colonias.

**Gráfico N° 1 Comparación del efecto bacteriostático de bacterias ácido lácticas frente a bacterias entericas**



**Gráfico N° 2 Comparación del efecto bactericida de bacterias ácido lácticas frente a bacterias entericas**



Las bacteriocinas pueden constituir una alternativa a la utilización masiva de antibióticos, además de contribuir a la disminución de resistencias frente a los mismos y combatir un grupo cada vez más amplio de bacterias patógenas resistentes a la mayor parte de los antibióticos producidos y conocidos en la actualidad<sup>19,20</sup>.

Es interesante considerar el papel que las bacterias ácido lácticas pueden desempeñar en el campo de las infecciones. El aumento en el uso de antibióticos, el incremento de las resistencias bacterianas, el aumento de los pacientes inmunodeprimidos y de las infecciones oportunistas en estos pacientes, y la aparición de nuevos patógenos, son factores que determinan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias en el tratamiento y prevención de las infecciones.

En el pasado se han llevado a cabo una serie de estudios siguiendo diferentes metodologías lo que no permite una comparación real de los resultados. Dentro de estos estudios merecen mencionarse el de Consignado y col.<sup>21</sup>, quienes encontraron actividad antibacteriana en *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae*. Utilizaron el método de placa vertida a partir de un inóculo de 10<sup>3</sup> UFC/mL, sin embargo no indican la concentración de la BAL ni el tipo de inhibición encontrado.

Por su parte, Reque y col.<sup>22</sup> encontraron que *Lactobacillus fermentum* presentaba actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, utilizando la técnica de difusión en pocillos que solo obtiene resultados cualitativos. Asahara y col.<sup>23</sup> hallaron actividad antimicrobiana en *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli* e indicaron que *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* no presentaron actividad significativa. Chuayana y col.<sup>24</sup>, utilizando una metodología no estandarizada, llegaron a la conclusión que *Lactobacillus casei* tendría una acción bacteriostática frente a

*Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Sin embargo, no mencionan ningún valor referencial de esta afirmación.

Otros estudios que se han basado en la determinación de los diámetros de inhibición incluyen el de Oyetayo y col.<sup>25</sup> quienes verifican la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* frente a *Escherichia coli*; Nowroozi y col.<sup>26</sup> quienes estudiaron la actividad de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* frente a *Salmonella typhi* y finalmente Erdogru y Erbilir<sup>28</sup> quienes han comprobado la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli*.

El presente estudio confirma la utilidad de las bacterias ácido lácticas en el control de bacterias entéricas y sirve de base para continuar con otros estudios a fin de evaluar su acción frente a otros microorganismos de importancia médica, en particular bacterias grampositivas y levaduras así como valorar las ventajas del uso de combinaciones de bacterias lácticas.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus* presentan diferentes grados de actividad antimicrobiana frente a bacterias entéricas.
2. El mejor efecto bacteriostático lo presentaron *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus acidophilus* frente a *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*, respectivamente, con una CMI de 4 µL/mL.
3. El mejor efecto bactericida lo presentó *Lactobacillus fermentum* frente a *Escherichia coli* con una CMB de 8 µL/mL.

C. Hernani Larrea.  
Fac. Medicina USMP.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Sr. Guil Virgilio Alfaro por su asistencia técnica en el desarrollo de la presente investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVAREZ-OLMOS M.; OBERHELMAN R. 2001. "Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy" *Clinical Infectious Diseases* 32:1567-76.

2. ROBERFROID M. 2000. "Prebiotics and probiotics: are they functional food?" *Am J Clin Nutr* 71: 1682-7.
3. REID G. 1999. "The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*" *Applied and environmental microbiology* 65: 3763-6.
4. TUOMOLA E.; CRITTENDEN R.; PLAYNE M.; ISOLAURI E.; SALMINEN S. 2001. "Quality assurance criteria for probiotic bacteria" *Am J Clin Nutr* 73: 393-8.
5. ISOLAURI E. 2001. "Probiotics in human disease" *Am J Clin Nutr* 73:1142-6.
6. REID G. 2000. "Probiotics in the treatment of diarrheal diseases" *Current Infectious Disease Reports* 2: 78-83.
7. REID G.; BRUCE A. 2001. "Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications" *J Inf Dis* 183: 77-80.
8. REID G. 2000. "Probiotic therapy and functional foods for prevention of urinary tract infections: state of the art and science" *Current Infectious Disease Reports* 2:518-522.
9. DE VRESE M.; STEGELMANN A.; RICHTER B.; FENSELAU S.; LAUE C.; SCHREZENMEIR J. 2001. "Probiotics—compensation for lactase insufficiency" *Am J Clin Nutr* 73: 421-9.
10. FLOCH M.; HONG-CURTISS J. 2001. "Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders" *Current Gastroenterology Reports* 3: 343-350.
11. BEZKOROVAINY A. 2001. "Probiotics: determinants of survival and growth in the gut" *Am J Clin Nutr* 73: 399-405.
12. DUNNE C.; SHANAHAN F. 2002. "Role of probiotics in the treatment of intestinal infections and inflammation" *Current Opinion in Gastroenterology* 18: 40-45.
13. FEDORAK R.; MADSEN K. 2004. "Probiotics and the management of inflammatory bowel disease" *Inflamm Bowel Dis* 10: 286-299.
14. DE ROSS N.; KATAN M. 2000. "Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998" *Am J Clin Nutr* 71: 405-411.
15. SALMINEN S.; ARVILOMMI H. 2001. "Probiotics demonstrating efficacy in clinical settings" *Clinical Infectious Diseases* 32:1577-8.
16. WOLLOWSKI I.; RECHKEMMER G.; POOL-ZOBEL B. 2001. "Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer" *Am J Clin Nutr* 73: 451-5.
17. ESTRADA A.; GUTIÉRREZ L.; MONTOYA O. 2005. "Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp y *Escherichia coli*" *Rev Fac Nal Agr Medellín* 58: 2601-9.

18. ANDREWS J. 2001. "Determination of minimum inhibitory concentrations" *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 5-16.
19. JAMUNA M.; JEEVARATNAM K. 2004. "Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins" *J Gen Appl Microbiol* 50: 79-90.
20. SAVADOGO A.; OUATTARA C.; BASSOLE I.; TRAORE A. 2006. "Bacteriocins and lactic acid bacteria: A minireview" *African Journal of Biotechnology* 5: 678-683.
21. CONSIGNADO G.; PEÑA A.; JACALNE A. 1993. "In vitro study on the antibacterial activity of *Lactobacillus casei* against four diarrhea-causing organisms" *Phil J Microbiol Infect Dis* 22: 50-55.
22. REQUE E.; PANDEY A.; FRANCO S.; SOCCOL C. 2000. "Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* lpb for use as probiotic in chickens" *Brazilian Journal of Microbiology* 31:303-307.
23. ASAHARA T.; NOMOTO J.; WATANUKI M.; YOKOKURA T. 2001. "Antimicrobial activity of intrarethally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of escherichia coli urinary tract infection" *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45: 1751-1760.
24. CHUAYANA E.; PONCE C.; RIVERA M.; CABRERA E. 2003. "Antimicrobial activity of probiotics from milk products" *Phil J Microbiol Infect Dis* 32: 71-74.
25. OYETAYO V.; ADETUYI F.; AKINYOSOYE F. 2003. "Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo" *African Journal of Biotechnology* 2: 448-452.
26. NOWROOZI J.; MIRZAII M.; NOROUZI M. 2004. "Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria" *Iranian J Publ Health* 33:1-7.
27. ERDOGRUL O.; ERBILIR F. 2006. "Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods" *Turk J Biol* 30: 39-44.