

Artículo original

Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. frente a bacterias patógenas causantes de mastitis en vacas lecheras

Ana Julia Rondón Castillo^{a,*}, Aymara Valdivia Ávila^a, Sheila Casals Bruffau^a, Marta Laurencio Silva^a, Grethel Milián Florido^a, Fátima Arteaga Chávez^b, Marlene Martínez Mora^a, Marlen Rodríguez Oliva^a

^aCentro de Estudios Biotecnológicos. Universidad de Matanzas. Cuba.

^bLaboratorio de Biología Molecular. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador.

Recibido 19 de febrero de 2019; aceptado 17 de septiembre de 2019

Resumen: El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* frente a bacterias patógenas causantes de mastitis en vacas. Se utilizaron *Lactobacillus* procedentes del cepario del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas. También se tomaron muestras de la microbiota de la ubre de vacas con mastitis subclínica, para el aislamiento de bacterias patógenas en medios selectivos, las cuales se identificaron a través de la caracterización morfológica y bioquímica. La evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas de *Lactobacillus* se realizó a partir de la técnica de difusión de sustancias en el agar y el enfrentamiento en cocultivos. Como resultado se constató que las cepas *Lactobacillus brevis* 17LP y *Lactobacillus salivarius* C65, produjeron sustancias antimicrobianas que inhibieron a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. y *S. aureus* ATCC 29213. Se demostró que las cepas productoras de antimicrobianos redujeron la población de todos los patógenos a las 24 h en los cocultivos. Los resultados de la actividad antimicrobiana de estas cepas avalan su posible uso como probióticos en la prevención de la mastitis bovina.

Palabras clave: probióticos; *Lactobacillus*; vacas; mastitis.

Evaluation of the antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. against pathogenic bacteria that cause mastitis in dairy cows

Abstract: The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. against pathogenic bacteria that cause mastitis in cows. *Lactobacillus* species used came from the Biotechnological Studies Center of the University of Matanzas strain bank. Also, microbiota samples were taken from the udder of cows with subclinical mastitis for bacterial culture in selective media, which were identified by morphology and biochemical characterization. The evaluation of the antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. was carried out in agar by the substance diffusion technique and confrontation in cocultures. As results, strains of *Lactobacillus brevis* 17LP and *Lactobacillus salivarius* C65 were found to produce antimicrobial substances that inhibited *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. It was shown that strains producing antimicrobial products reduced the population of all pathogens after 24 h in the cocultures. The results of the antimicrobial activity of these species support its possible use as probiotics for prevention of bovine mastitis.

Keywords: probiotics; *Lactobacillus*; cows; mastitis.

* Correspondencia:
E-mail: ana.rondon@umcc.cu

Introducción

La mastitis constituye una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que puede producirse por factores físicos, químicos, mecánicos o infecciosos. El 80% de los casos de mastitis en vacas lecheras es ocasionado por la invasión de microorganismos patógenos específicos en los pezones y tejidos de la ubre; el resto de los casos es resultado de

lesiones traumáticas, con o sin invasión secundaria de los mismos. Sin embargo, la presentación más importante es la forma subclínica, donde no se evidencia inflamación, pero se revelan cambios en los tejidos [1].

A esta enfermedad se le atribuyen numerosas pérdidas económicas debido al decomiso de leche, cuartos mamaros perdidos y empleo de medicamentos, entre otros factores [2]. En este sentido se plantean diversas medidas preventivas

y curativas con el fin de combatir este padecimiento como la utilización de numerosos fármacos, entre los que se destacan los antibióticos, como las sulfonamidas por vía intramamaria y sistémica, el uso de terapias no tradicionales como acupuntura, oxígeno-terapia, electrolitos, ácido fosfórico y otros [3].

El uso indiscriminado de los antibióticos en el mundo, tanto en el hombre como en los animales, provoca resistencia microbiana, de ahí la necesidad de sustituir a estos antimicrobianos en la producción animal por otros aditivos alternativos que sean compatibles con el medio ambiente y eviten efectos negativos en la salud humana, tales como los probióticos [4].

Entre los microorganismos que más se utilizan como probióticos están los del género *Lactobacillus*, los cuales desempeñan un papel muy importante en la barrera microbiológica primaria que se forma en las mucosas, con el fin de prevenir infecciones. Las bacterias ácido lácticas (BAL) están entre los componentes principales de la microbiota indígena del canal del pezón y son candidatas potenciales para diseñar un producto probiótico que controle la mastitis y pueda utilizarse como sellante del pezón [5]. De ahí que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. frente a bacterias patógenas causantes de mastitis en vacas lecheras.

Materiales y métodos

Material biológico utilizado: Para evaluar la actividad antibacteriana de cepas de *Lactobacillus* spp. frente a bacterias causantes de mastitis, se utilizaron las cepas *L. salivarius* C65 y *L. brevis* 17LP, procedentes del cepario del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas, Cuba, las cuales fueron aisladas e identificadas por Rondón *et al.* [6] y Arteaga *et al.* [7]. Como cepas patógenas se utilizaron aislados de vacas con mastitis y la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 del Laboratorio de Microbiología de la misma Universidad.

Selección de las vacas para la toma de muestras: En la vaquería 65 de la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas, Cuba, se realizó la selección de vacas enfermas para la toma de muestras. Para ello se detectó de forma cualitativa el contenido de células somáticas, mediante la prueba de California (CMT) a diez vacas, con el objetivo de detectar la presencia de mastitis en el momento del ordeño. La prueba se desarrolló a partir de la metodología descrita por Acuña y Rivadeneira [8] y la interpretación de los resultados se realizó de acuerdo a lo descrito por Mellenberger [9].

Aislamiento de cepas patógenas del canal del pezón de vacas con mastitis: Se utilizaron cinco vacas lecheras positivas a la CMT y para el aislamiento de las bacterias se emplearon los procedimientos descritos por Derakhshani *et al.* [10]. Se introdujeron por el canal del pezón hisopos estériles para arrastrar la mayor cantidad de patógenos. Seguidamente se

inocularon en tubos que contenían 10 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI, BIOLIFE®). Las muestras se trasladaron al laboratorio de Microbiología y se incubaron a 37 °C por 18 h en agitador térmico (UNITRONIC 320 OR) a 110 g.

A partir de las muestras anteriores, se realizaron diluciones seriadas hasta el valor 10^{-7} en solución salina estéril (SSE 0,9% de NaCl) y de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} se sembraron 0,1 mL en tres placas de Petri de 90 mm de diámetro con diferentes medios selectivos según Britanialab [11]. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Seguidamente se seleccionaron las colonias morfológicamente diferentes y se sembraron en cuñas de agar nutritivo para su crecimiento a 37 °C por 48 horas y su posterior conservación a 4 °C.

Identificación de los aislados por métodos microbiológicos tradicionales: Para la identificación de los aislados se realizó la caracterización morfológica y bioquímica. Entre las técnicas empleadas están la tinción de Gram, siembra de las colonias en medios selectivos para su descripción morfológica, prueba de la catalasa, hidrólisis de la caseína, hidrólisis del almidón, producción de indol, reducción de nitratos y fermentación de azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa y maltosa), según lo descrito por Harrigan y McCance [12].

Evaluación de la actividad antimicrobiana por difusión en agar: Se empleó la técnica descrita por Schillinger y Lucke [13]. Para ello, de las cepas productoras (cultivos de lactobacilos conservados en leche y glicerol 10%) se tomó 1 mL y se inoculó en frasco Erlenmeyer que contenían 100 mL de caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS). Estos se incubaron en condiciones estáticas por 18 horas a 37 °C. Posteriormente se tomaron muestras de 10 mL a la hora 24, las cuales se centrifugaron a 15.000 g a 5 °C por 10 min y el sobrenadante se esterilizó a través de filtros de acetato de celulosa con poros de 0,22 μm (Sartorius™).

Los aislados del canal del pezón de vacas con mastitis subclínica se utilizaron como cepas indicadoras, entre ellas: *Klebsiella* spp., *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *S. aureus* y *Proteus* spp. También se empleó la cepa de *S. aureus* ATCC® 29213 como cepa control. Todas las cepas indicadoras se inocularon en caldo BHI (BIOLIFE®) y se incubaron en agitador térmico a 37 °C y 120 rpm durante 18 h.

De los cultivos de las cepas indicadoras se tomaron 200 μL , que se inocularon en tubos de ensayo con 20 mL de agar Müeller Hinton a 45 °C, que fueron vertidos en placas de Petri de 90 mm de diámetro para su solidificación. En cada placa que contenían las cepas patógenas se abrieron pocillos de 7 mm de diámetro, en los que se depositaron 60 μL de las muestras de las cepas productoras y un control negativo (caldo MRS). Las placas se mantuvieron a 4 °C por un tiempo de 4 h para una mejor difusión de las sustancias en el agar. Luego se incubaron entre 18-24 h a 37 °C hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos de inhibición. El diámetro de los halos se midió con

regla milimetrada. A cada valor se le restó el diámetro de los pocillos. El ensayo se realizó por triplicado.

Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de cocultivos: La actividad antagónica de *L. salivarius* C65 y *L. brevis* 17LP frente a bacterias potencialmente patógenas se estudió a través de cultivos asociados o mezclas de cultivos. Para ello se empleó la técnica descrita por Orłowski y Bielecka [14], modificada por los autores del presente trabajo, al sustituir el medio de alimento para pollos por caldo de leche (CL), para simular el ecosistema de la ubre de la vaca. Este medio se elaboró con 64 g de leche en polvo para 1000 mL de agua destilada, el cual se esterilizó por tinalización (tres fases de 30 min a 100 °C).

Para el desarrollo de los cocultivos, se adicionó CL a frascos Erlenmeyer de 250 mL a razón de 100 mL de volumen efectivo. En cada uno se añadió 1 mL del cultivo de las cepas productoras (16 logaritmo neperiano Ln de las UFC.mL⁻¹ de *L. brevis* 17LP o *L. salivarius* C65) y 1 mL del cultivo patógeno o indicador (con una población similar a la cepa productora) y se incubaron por 24 horas a 37 °C en condiciones estáticas. A las 0, 8, 16, y 24 h se tomaron muestras para realizar el conteo de los lactobacilos y los microorganismos patógenos. Se dispuso además de cultivos controles para el crecimiento de las dos cepas productoras y las cinco indicadoras puras con la utilización del mismo medio CL. Para realizar el conteo de *Klebsiella* spp., *E. coli* y *Proteus* spp. viables se utilizó agar MacConkey (Biocen) y para *Staphylococcus* agar manitol salado (Merck). El conteo de *Lactobacillus* se realizó en agar MRS (Biocen). El ensayo se realizó por triplicado.

Análisis estadístico: Para procesar el resultado de la actividad antibacteriana de las cepas de *Lactobacillus* por el método de difusión de sustancias en el agar se utilizó un análisis de varianza simple. El efecto de las cepas de *Lactobacillus* spp. frente a microorganismos patógenos en cocultivos se analizó con la utilización de estadística descriptiva, para lo cual se calculó la media y la desviación estándar. El paquete estadístico que se empleó para ambos análisis fue INFostat, Versión 2012 [15].

Resultados y discusión

Aislamiento de bacterias causantes de mastitis: Se aislaron un total de 18 cepas, de las cuales se seleccionaron cinco por las características diferenciales de las colonias en los medios de cultivo selectivos [11].

Identificación de las cepas patógenas aisladas: En la tabla 1 se presenta la caracterización morfológica y bioquímica realizada a los aislados de vacas con mastitis. A partir de estos resultados y las características del crecimiento de las colonias en los medios selectivos, se realizó la identificación preliminar de las bacterias, para lo cual se utilizó el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática [16]. La misma quedó como sigue: 1. *Klebsiella* spp., 2. *S. epidermidis*, 3. *E. coli*,

4. *S. aureus*, 5. *Proteus* spp. Estas bacterias están entre las causantes de mastitis, aunque se conoce que en Cuba también inciden otros microorganismos como *Corynebacterium bovis*, *Enterobacter* spp. y *Streptococcus agalactiae* [17].

Efecto antimicrobiano de *L. brevis* 17LP y *L. salivarius* C65 frente a bacterias potencialmente patógenas: Los resultados de las mediciones de los halos de inhibición se muestran en la tabla 2. Se puede observar que las dos cepas produjeron la inhibición de todos los aislados patógenos, con algunas diferencias entre ellas ($p \leq 0,05$). La cepa *L. salivarius* C65 fue más efectiva frente a *S. epidermidis*, mientras que *L. brevis* 17LP mostró mayor inhibición frente a las cepas salvajes y de colección de *S. aureus*. La producción de ácidos por parte de las cepas de *Lactobacillus* debió disminuir el pH a niveles letales o se produjo la paralización del crecimiento de estos microorganismos, ya que aunque se reporta que algunas de estas cepas patógenas son resistentes a pH ácidos, se conoce que la mayoría de estos microorganismos no crecen por debajo de pH 4 [18].

Se conoce que los ácidos orgánicos débiles son más efectivos que los inorgánicos en la acidificación del medio intracelular; se supone que esto ocurre porque es más fácil su difusión a través de la membrana celular en su forma no disociada (lipofílica), los que posteriormente se disocian en el interior de la célula inhibiendo el transporte celular y la actividad enzimática. La mayoría de los microorganismos crece a pH entre 5 y 8, ya que la acidificación del interior celular conduce a la pérdida del transporte de nutrientes, los microorganismos no pueden generar más energía de mantenimiento, y a una velocidad variable según las especies, se produce la muerte celular [19].

Tsai *et al.* [20] comprobaron que las cepas de *Lactobacillus* LAP5 y LF33, aisladas de cerdo y pollo respectivamente, fueron capaces de inhibir *in vitro* a *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* y *Bacillus cereus*, fundamentalmente por la producción de ácido láctico.

Se considera que, entre las características más importantes de los probióticos para promover la salud, está su actividad inhibitoria frente a microorganismos patógenos [21]. De acuerdo con el diámetro de la zona de inhibición, esta fue clasificada como fuerte ($\varnothing = 20$ mm), moderada (\varnothing entre 10 y 20 mm) y débil ($\varnothing = 10$ mm) [22]. En el presente trabajo los halos que produjeron las cepas *L. brevis* 17LP y *L. salivarius* C65 se pueden clasificar como moderados, ya que exhibieron valores entre 8,33 hasta 18 mm.

Es de vital importancia que las cepas candidatas a probióticos inhiban el desarrollo de bacterias del género *Staphylococcus* (*S. aureus* y *S. epidermidis*) y del grupo coliformes (*Klebsiella* spp. y *E. coli*), ya que son, según Wolter *et al.* [23], los causantes principales de la mastitis bovina.

En el presente trabajo, los mayores halos de inhibición se observaron en presencia de *Staphylococcus*, considerado el principal agente causante de la mastitis. Estas bacterias son patógenos contagiosos y se transmiten por los tejidos infectados durante el proceso de ordeño. Este

Tabla 1. Caracterización morfológica y bioquímica de los cinco aislados de vacas con mastitis subclínica.

Caracterización morfológica					
	1	2	3	4	5
Tinción de Gram	G (-)	G (+)	G (-)	G (+)	G (-)
Características morfológicas de las colonias	Colonias grandes rosadas mucosas en agar MacConkey	Colonias de color rojo en agar manitol sal	Colonias de color amarillo en agar bilis verde brillante	Colonias de color amarillo en agar manitol sal	Colonias grandes incoloras en agar MacConkey
Caracterización bioquímica					
Prueba de la catalasa	+	+	+	+	+
Hidrólisis de la urea	+	+	-	+	+
Producción de indol	-	+	+	+	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+
Fermentación de azúcares:					
lactosa	+	-	+	-	-
sacarosa	+	+	+	+	+
glucosa	+	+	-	+	+
maltosa	+	+	+	+	+
Resultados de la identificación					
	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus</i> spp.

G (+) = Grampositivo; G (-) Gramnegativo

microorganismo puede producir gangrena y afectar otros tejidos; sin embargo no pueden sobrevivir grandes periodos en el medio ambiente [24].

Efecto antimicrobiano de L. brevis 17LP y L. salivarius C65 por el método de cocultivo: En la figura 1 se aprecian los resultados del desarrollo de cocultivos con *L. brevis* 17LP y las cepas indicadoras *Klebsiella* spp., *S. epidermidis*, *E. coli*, *Proteus* spp., *S. aureus* (cepa salvaje) y *S. aureus* ATCC® 29213 en medio de cultivo CL. Se observó que tanto el cultivo control como el cocultivo de *Lactobacillus*,

continuaron su crecimiento en el medio, fundamentalmente a partir de las 8 horas. Significa que este cultivo tuvo que generar la batería enzimática para poder asimilar los nuevos componentes de este medio y adaptarse a las condiciones físicas y químicas de este sustrato. Sin embargo, a medida que pasó el tiempo, las células de las cepas indicadoras perdieron viabilidad y a las 16-24 horas no se observaron células vivas en los cocultivos, excepto *S. aureus* ATCC® 29213 que mostró un crecimiento más lento, lo cual indica que en ese momento de muestreo, la concentración de sustancias antimicrobianas presentaba niveles tan elevados, que eliminaron total o parcialmente a todos los microorganismos inoculados.

Adeniyi *et al.* [25] comprobaron que las BAL desarrollan actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *Klebsiella* spp. Estos autores aislaron, caracterizaron e identificaron bacterias ácido lácticas de intestinos de vacas para probar su actividad antimicrobiana frente a patógenos potenciales del mismo hábitat. Concluyeron que estas bacterias pueden utilizarse como probióticas y servir como agentes bioterapéuticos, lo que constituye una alternativa útil al uso de antibióticos como suplemento en el forraje animal.

Liévin-Le Moal y Servin [26] y Haghshenas *et al.* [27] refirieron que los lactobacilos presentan una marcada actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos, por lo que constituyen una fuente prometedora para el desarrollo de agentes anti-infecciosos que actúen en el lumen o intracelularmente. Estos resultados coinciden con los traba-

Tabla 2. Acción antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. frente a cepas indicadoras.

Cepas productoras	Cepas indicadoras Diámetro del halo (mm) 18 h					
	1	2	3	4	5	6
<i>Lactobacillus salivarius</i> C65	11,67	17,33	13,67	8,33	12,67	12,67
<i>Lactobacillus brevis</i> 17LP	16,00	14,33	13,67	17,67	12,00	18,00
EE	2,98	1,88	2,33	1,33	3,47	2,56
p	0,360	0,007	0,060	0,007	0,890	0,021

1. *Klebsiella* spp., 2. *S. epidermidis*, 3. *E. coli*, 4. *S. aureus*, 5. *Proteus* spp., 6. *S. aureus* ATCC 29213. EE: Error estándar. Valor de p es significativo >0,05.

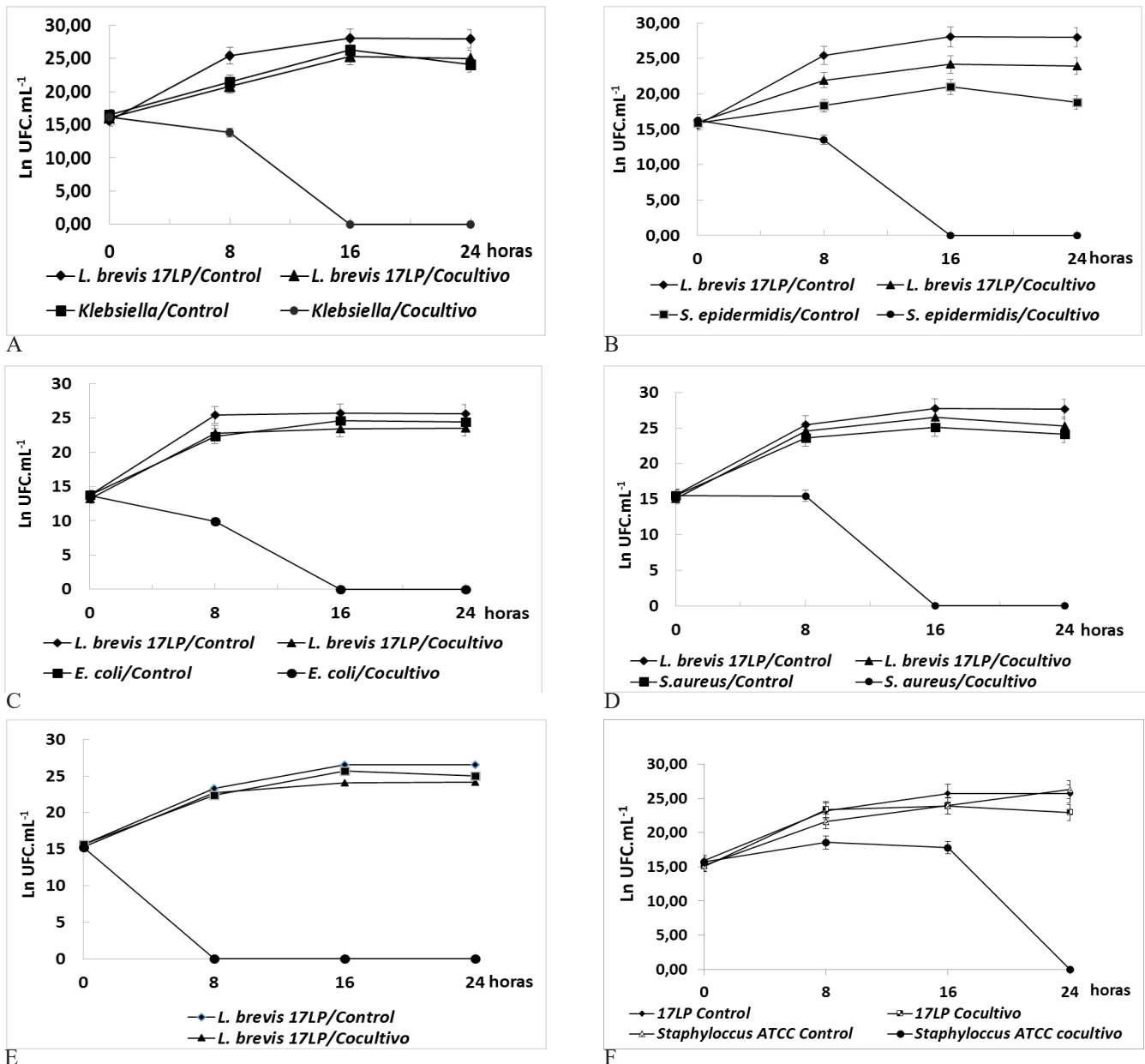


Figura 1. Comportamiento del crecimiento de A. *Klebsiella* spp., B. *Staphylococcus epidermidis*, C. *Echerichia coli*, D. *Proteus* spp., E. *Staphylococcus aureus* y F. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en presencia del *Lactobacillus brevis* 17LP en medio caldo leche, hasta las 24 h. Las barras representan la desviación estándar. Ln: Logaritmo neperiano de las UFC.

jos realizados por Montero *et al.* [28], quienes determinaron que cepas de *Lactobacillus* inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, evidenciándose la actividad antagónica al producir halos de inhibición mayores de 0,5 centímetros de diámetro. Por su parte, Abril [29] logró aislar tres cepas pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas (*L. lactis*, *L. brevis* y *Leuconostoc lactis*), que presentaron actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella enteritidis*.

En el caso del *L. salivarius* C65, se enfrentaron a las mismas cepas indicadoras (*Klebsiella* spp., *S. epidermidis*, *E. coli*, *Proteus* spp., *S. aureus* y *S. aureus* ATCC® 29213) en el medio de CL. Se observó, que también se produjo la inhibición de todos los microorganismos (Figura 2).

L. salivarius C65 fue capaz de inhibir a *E. coli* desde las 8 h. En este sentido se conoce que esta bacteria y diferentes

especies de coliformes se encuentran en el intestino grueso de animales de sangre caliente y se eliminan en las heces fecales. Las mastitis por *E. coli* se observan frecuentemente en las primeras semanas de lactancia, después del parto. Esta forma transcurre de aguda a hiperaguda, y en la mayoría de los casos presenta síntomas generales de infección. En los casos de mastitis con un desenlace mortal, *E. coli* es el patógeno aislado con más frecuencia [23].

Fernández *et al.* [30] demostraron que la administración oral de *Lactobacillus* puede ser un enfoque eficiente para tratar la mastitis contagiosa. Los autores valoraron el potencial de *L. salivarius* PS2 para prevenir esta condición, cuando se administró a mujeres que habían experimentado esta infección después de los embarazos. Este estudio, aunque realizado en humanos, es un punto de referencia que

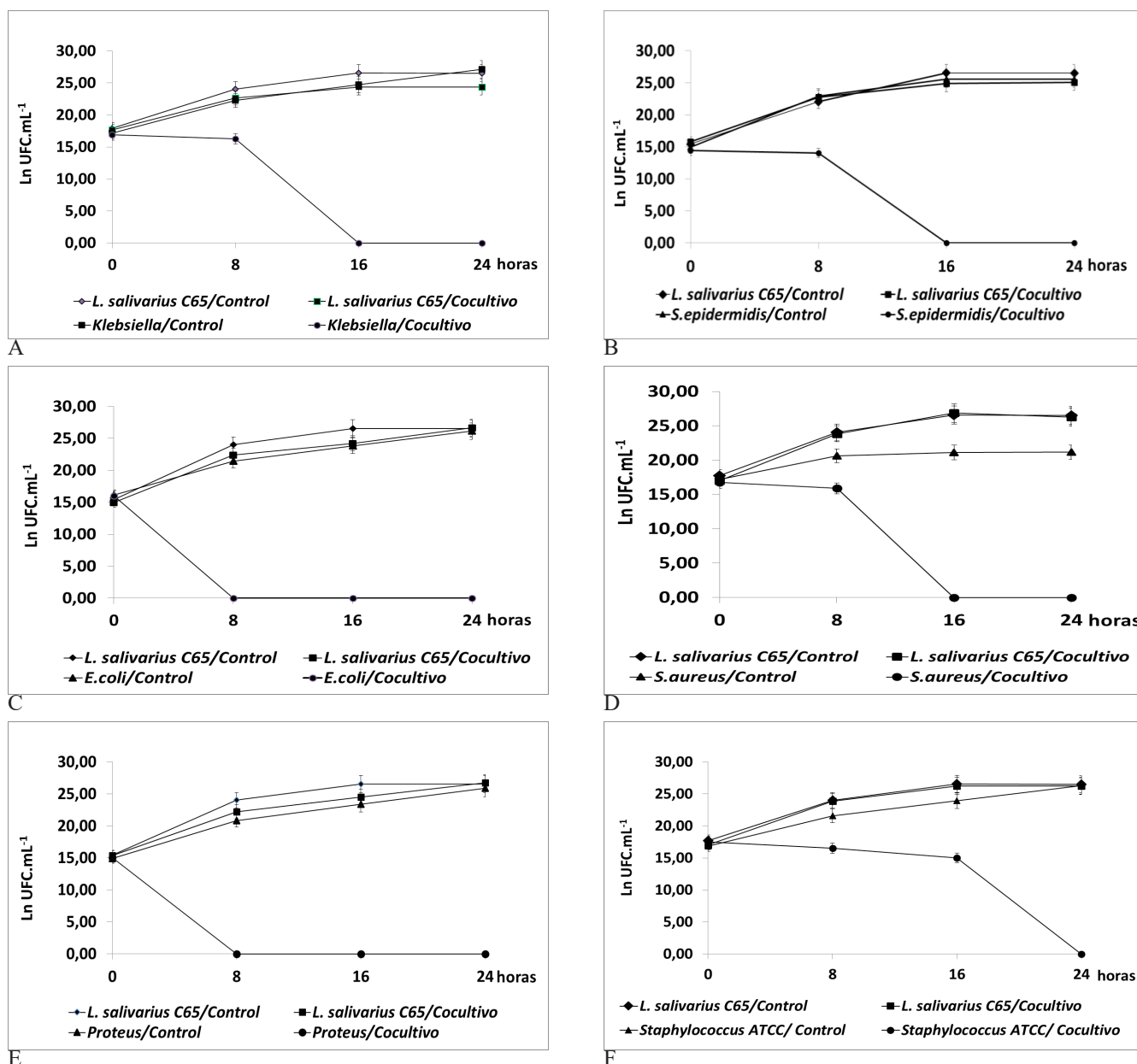


Figura 2. Comportamiento del crecimiento de A. *Klebsiella* spp., B. *Staphylococcus epidermidis*, C. *Escherichia coli*, D. *Proteus* spp., E. *Staphylococcus aureus* y F. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en presencia de *Lactobacillus salivarius* C65 en medio caldo leche, hasta las 24 h. Las barras representan la desviación estándar. Ln: Logaritmo neperiano de las UFC.

indica las potencialidades que tiene esta bacteria probiótica de prevenir la presencia de bacterias patógenas.

Staphylococcus coagulasa negativo (SCN) es la causa más común de las infecciones intramamarias y las especies que lo constituyen se describen como patógenos emergentes de la mastitis bovina [17]. Mientras que en los años sesenta la mastitis por estafilococos tenía una escasa importancia, actualmente se aísla esta bacteria en un 20% de las muestras bacteriológicamente positivas de cuartos mamarios afectados por esta enfermedad [23]. Los resultados del presente trabajo son promisorios, ya que *L. salivarius* C65 inhibió completamente a este microorganismo *in vitro* a las 8 h.

Conclusiones

Las cepas *L. brevis* 17LP y *L. salivarius* C65 mostraron potencialidades para utilizarse como probióticas en la prevención de la mastitis en vacas lecheras al inhibir el desarrollo de bacterias patógenas causantes de esta enfermedad.

Referencias

1. Ma C, Zhao J, Xi X, Ding J, Wang H, Zhang H, KwoK LY. Bovine mastitis may be associated with the deprivation of gut *Lactobacillus*. *Beneficial Microbes* 2015; 7:95-102.
2. Uchuari IA. Evaluación de la lidocaína clorhidrato

- como tratamiento alternativo de la mastitis subclínica bovina en animales de mediana producción láctea. Trabajo de Titulación. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias. Universidad Técnica de Machala. Ecuador, 2018.
3. Cuchini O. Electron acupuncture for serdus mastitis in cows. *Veterinary Moscow*. 1987; 6:45-6.
 4. Tim J, Dumonceaux JE, Hill SM, Hemmingsen AG, Van Kessel E. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72:2815–23.
 5. Frola ID, Pellegrino MS, Giraudo JÁ, Nader-Macias MF and Bogni CI. Evaluation of beneficial Lactic Acid Bacteria strains as a potential probiotic for the prevention of bovine mastitis. *Front. Immunol*. 2015. Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA 2015 - 11th Congress of the Latin American Association of Immunology - 10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología. Doi: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00231.
 6. Rondón AJ, Samaniego LM, Bocourt R, Rodríguez S, Milián G, Ranilla MJ, Laurencio M, Pérez M. Isolation, identification and partial characterization of the probiotic properties of *Lactobacillus* spp. strains obtained from the gastrointestinal tract of broilers. *Cienc Tecnol Aliment*. 2008; 6:17-22.
 7. Arteaga F, Laurencio M, Rondón AJ, Milián G, Bocourt R. Aislamiento, selección e identificación de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico y tecnológico del tracto digestivo de pollos de traspatio. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2018; 38:15-20.
 8. Acuña V, Rivadeneira A. Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha. Tesis de grado. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolqui, Quito, Ecuador; 2008. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA%20I-003435.pdf>. Acceso 8 mayo 2019
 9. Mellenberger R, Roth C. California Mastitis Test. Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT) Disponible en: http://www.milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/212/2011/09/hoja-de-informacion-de-la-prueba-de-mastitis-california_spanish.pdf. Acceso 21 de junio 2019.
 10. Derakhshani H, Plaizier JC, De Buck J, Barkema HW, Khafipour E. Composition of the teat canal and intramammary microbiota of dairy cows subjected to antimicrobial dry cow therapy and internal teat sealant. *J Dairy Sci*. 2018; 101:10191-205.
 11. Britanialab. Medios de cultivo para Microbiología. Disponible en: www.britanialab.com.ar/esp/productos.html. Acceso 8 de mayo 2019.
 12. Harrigan WF, McCance M. Métodos de laboratorio de Microbiología. León, España: Editorial Academia; 1968.
 13. Schillinger U, Lucke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake isolated from meat. *Appl Environ Microbiol*. 1989; 55:1901-6.
 14. Orłowski A, Bielecka M. Preliminary characteristics of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains as probiotic candidates. *Polish J Food Nutrition Sci*. 2006; 15:269-76.
 15. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG; González L, Tablada M, Robledo CW. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, 2012; Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>. Acceso 23 de junio 2019.
 16. Garrity GM, Bell JA, Lilburn G. Taxonomic outline of the prokaryotes *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second Edition. New York: Springer US; 2004. DOI:10.1007/bergeysoutline200405. Disponible en: <http://141.150.157.80/bergeysoutline>. Acceso 30 de mayo 2019.
 17. García-Sánchez F, Sánchez-Santana T, López-Vigoa O, Benítez- Álvarez MA. Prevalence of subclinical mastitis and associated microorganisms. *Pastos y Forrajes*. 2018; 41:33-8.
 18. Yang Y, Irlanti M, Wei K, Khoo J, Zheng Q, Setyawati M, Shin YJ, Lee S, Yuk H. Membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression of *Salmonella enteritidis* cells adapted to lactic 57 acid and trisodium phosphate and their resistance to lethal heat and acid stress. *Int J Food Microbiol*. 2014; 191:24-31.
 19. Chung HJ, Bang W, Drake MA. Stress response of *Escherichia coli*. *Compr Rev Food Sci F*. 2006; 5:52-64.
 20. Tsai CC, Hsieh HY, Chiu HH, Lai YY, Liu JH, Yu B, Tsen HY. Antagonistic activity against *Salmonella* infection *in vitro* and *in vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *Int J Food Microbiol*. 2005; 102:185-94.
 21. Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius A, Bartkiene E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Con*. 2013; 31:539-45.
 22. Lim YS. Probiotic characteristics of bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Malaysian Foods. PhD thesis. Malaysia: University Putra, 2010. Disponible en: <http://psasir.upm.edu.my/id/eprint/9834/>. Acceso 8 junio 2019.
 23. Wolter W, Castañeda VH, Kloppert B, Zschoeck M. La mastitis bovina. Universidad de Guadalajara: Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Dpto. de Salud Pública, 2009.
 24. Hogan J, González R, Harmon R, Nickerson S, Oliver S, Pankey J, Smith K. Laboratory handbook on bovine mastitis. US, Madison WI: National Mastitis Council, 1999.
 25. Adeniyi BA, Adetoye A, Ayeni FA. Antibacterial activities of lactic acid bacteria isolated from cow

- faeces against potential enteric pathogens. Afr J Health Sci. 2015; 15:888–95.
26. Liévin-Le Moal V, Servin AL. Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. Clin Microbiol Rev. 2014; 27:167–99.
 27. Haghshenas B, Nami Y, Haghshenas M, Abdullah N, Rosli R, Radiah D, Khosroushah AY. Bioactivity characterization of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Microbiology Open. 2015; 4:803–13.
 28. Montero PM, Caballero A, Durán M. Antagonistic action of *Lactobacillus* spp. against *Staphylococcus aureus* in cheese from Mompox. Rev Fac Nac Agron. 2015; 68:7721-27.
 29. Abril AS. Aislamiento y determinación de la actividad antibacteriana de bacterias ácido lácticas de quesos artesanales de San Fernando- Azuay contra cepas patógenas. Trabajo de Grado. Cuenca-Ecuador: Universidad del Azuay; 2016. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/5895>. Acceso 13 de junio 2019.
 30. Fernández L, Cárdenas N, Arroyo R, Manzano S, Jiménez E, Martín V, Rodríguez JM. Prevention of infectious mastitis by oral administration of *Lactobacillus salivarius* PS2 during late pregnancy. Clin Infect Dis. 2016; 62:568-73.