

## ACTIVIDAD BACTERICIDA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *Bacillus megaterium* Y *Lactococcus lactis* CONTRA *Aeromonas veronii* Y *Streptococcus agalactiae*

IN VITRO BACTERICIDAL ACTIVITY OF THE EXTRACTS OF *Bacillus megaterium* AND  
*Lactococcus lactis* AGAINST *Aeromonas veronii* AND *Streptococcus agalactiae*

Luz Adriana GUTIÉRREZ RAMÍREZ, MSc<sup>1\*</sup>; Carlos Arturo DAVID RUALES, MSc<sup>2</sup>;  
 Magally ROMERO TABAREZ, PhD<sup>3</sup>

Recibido: Mayo 12 de 2016 Aprobado: Noviembre 09 de 2017

### RESUMEN

**Antecedentes:** Microorganismos patógenos como *Aeromonas sp* y *Streptococcus agalactiae*, producen grandes pérdidas en la industria acuícola, especialmente por su capacidad virulenta. Una forma de controlar estas pérdidas es mediante el empleo de microorganismos probióticos. **Objetivos:** En esta investigación se evaluó el efecto bactericida de los extractos de bacterias probióticas *Lactococcus lactis* y *Bacillus megaterium*, aislados de intestino de tilapia (*Oreochromis sp*) frente a *A. veronii* y *S. agalactiae*, patógenos de tilapia. **Metodología:** El efecto bactericida de los extractos de *L. lactis* y *B. megaterium* se determinó por el ensayo de difusión en pozos, encontrando halos de inhibición frente a *A. veronii* hasta de 35 mm. El extracto de *L. lactis* fue evaluado por cromatografía HPLC y el de *Bacillus megaterium* por espectrofotometría de masas. **Resultados:** Los resultados mostraron que ambos extractos controlaron el crecimiento de *A. veronii* y *S. agalactiae*, los análisis estadísticos no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la inhibición generada entre los dos extractos de probióticos, todos controlaron el crecimiento de estos patógenos *in vitro*. El *L. lactis* produjo sólo ácido láctico, el cual se determinó por HPLC, mientras que los análisis obtenidos en masas para el extracto de *B. megaterium* evidenciaron la presencia de ácido palmítico, esteárico e imidazol. **Conclusión:** Todos estos hallazgos evidencian el efecto positivo de los microorganismos probióticos en el control del crecimiento de patógenos en la tilapia.

**Palabras clave:** bactericida, inhibición, *Aeromonas*, *Streptococcus*, probióticos.

### ABSTRACT

**Background:** Microorganisms and pathogens such as *Streptococcus agalactiae* and *Aeromonas sp* produce large losses in the aquaculture industry, especially ability they possess virulent species. One way to control these losses is through the use of probiotic microorganisms. **Aims:** In this research bactericidal effect extracts two bacteria *Lactococcus lactis* and *Bacillus megaterium*, Isolated tilapia gut (*Oreochromis sp*) and characterized as probiotics, evaluated against *A. veronii* and *S. agalactiae*. **Methods:** The extract of *Lactococcus lactis* and *Bacillus megaterium* controlled *A. veronii* and *S. agalactiae* for diffused assay *in vitro*. Both extracted were evaluated by HPLC and *Bacillus megaterium* by mass spectrometry. The results showed that

<sup>1</sup> Biotecnología, Docente de Tiempo Completo, Corporación Universitaria Lasallista. Medellín, Colombia.

<sup>2</sup> Acuicultura, Docente de Tiempo Completo, Corporación Universitaria Lasallista. Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Profesora Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Medellín, Colombia.

\* Autor de correspondencia: [lugutierrez@lasallistadocentes.edu.co](mailto:lugutierrez@lasallistadocentes.edu.co)

the extracts controlled the growth *A. veronii* and *S. agalactiae*, statistical analyzes showed no significant differences ( $p > 0.05$ ) in inhibiting generated among the three extracts probiotics, they controlled all the growth of these pathogens in vitro. The determined study by HPLC detected lactic acid alone while analyzes masses obtained showed the presence of palmitic, stearic acid and imidazole. **Conclusion:** These findings demonstrate the positive effect of probiotic microorganisms in controlling the growth of pathogenic in the aquaculture industry.

**Keywords:** bactericide, inhibition, *Aeromonas*, *Streptococcus*, probiotics.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años la acuicultura ha tenido un desarrollo importante a nivel mundial (1), este crecimiento ha implicado intensificación y mayor estrés en el cultivo, generando problemas con enfermedades, deterioro ambiental y pérdidas económicas; la prevención y control de enfermedades en peces emplea por lo general antibióticos, provocando resistencia en los patógenos por su uso continuado (2). Ante este panorama, se han buscado alternativas que permitan controlar los patógenos sin los efectos colaterales que regularmente producen los antibióticos.

El uso de probióticos puede ser una opción para la reducción de antibióticos en acuicultura (3), debido a las propiedades metabólicas que ellos presentan como la producción de sustancias inhibitorias, competencia por espacio y nutrientes o por modulación de respuesta inmune (4).

Las bacterias ácido lácticas y algunas especies de *Bacillus* sp han sido ampliamente usadas como probióticos por los innumerables beneficios tanto en humanos como en animales (5). Las bacterias ácido lácticas producen ácidos orgánicos como el ácido láctico, ácido acético y peróxidos entre otros; algunas especies de *Bacillus* generan enzimas y también ácido orgánicos. Ambos grupos bacterianos, cuando son consumidos en cantidades adecuadas, tienen la capacidad de promover la integridad intestinal en el organismo huésped, mediante la excreción de enzimas y moléculas bioactivas con características inmunomoduladoras (6).

Una de las propiedades más importantes de los probióticos es la capacidad bactericida frente a diferentes organismos patógenos, diversos estudios han demostrado la habilidad del género *Lactobacillus* sp para antagonizar contra varios patógenos: *Escherichia coli* entero-hemorrágica (7), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium Shigella dysenteriae*, entre otros (8, 9). Además estudios realizados en acuicultura han reportado que diferentes especies de *Bacillus* sp y de bacterias ácido lácticas han pre-

sentado actividad antagónica contra *Aeromonas* sp, *Pseudomonas* sp y *Vibrio* sp (10, 11).

En peces, una de las pérdidas en producción se origina a partir de las infecciones por *Aeromonas* sp, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* y *A. veronii*. Ellas son consideradas patógenos emergentes y tiene un rol importante en los desórdenes gastrointestinales. La patogenicidad del género *Aeromonas* es multifactorial y atribuido a factores como citotoxinas, aerolisinas, hemolisinas, adhesinas y sistemas secretorios. *A. veronii* por ejemplo, presenta una elevada actividad hemolítica, factor de virulencia que promueve las lesiones histológicas en el animal (12). Este factor se puede incrementar cuando los peces son sometidos a pésimas condiciones de manejo de cultivo, bajos niveles de oxígeno, variaciones en la temperatura o épocas reproductivas (13).

Otro grupo de microorganismos también reportado como patógenos especialmente en tilapia son los *Streptococcus* y en ellos especies como *S. iniae*, *S. agalactiae* (*S. difficile*), *S. parauberis*, *S. dysgalactiae*, *S. milleri*, *Lactococcus garviae* (*Enterococcus seriolicida*), y *Vagococcus salmoninarum* (14) considerados los causantes de las tasas de mortalidad más altas en tilapia en etapa juvenil, posiblemente por presentar altos volúmenes de producción y distribución con manejos no adecuados.

El *S. iniae* ha sido considerado una de las especies más importantes dentro del grupo de cocos, sin embargo, el *S. agalactiae* caracterizado inicialmente como *S. difficile*, se ha considerado un patógeno emergente con efectos letales en peces como tilapia (15).

Por el nivel de importancia que ha cobrado estos microorganismos en los procesos infecciosos de tilapia y la búsqueda de alternativas más limpias para su control se planteó este trabajo con el objeto de evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de bacterias probióticas como *Lactococcus lactis* y *Bacillus megaterium* aislados de intestino de tilapia frente a dos cepas patógenas de tilapia *Aeromonas veronii* y *Streptococcus agalactiae*, determinando algunos de los metabolitos producidos por los microorganismos

probióticos por cromatografía HPLC y cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista. Las cepas de *Bacillus megaterium* y *Lactococcus lactis* fueron aisladas directamente del intestino de tilapia roja (*Oreochromis* sp) en estado juvenil identificadas molecularmente y caracterizadas como probióticas por pruebas de resistencia a sales 0,3% p/v, NaCl 2% p/v y pH 2,5 y a enzimas proteolíticas como tripsina y lisozima 0,5UI.

### Pruebas de actividad bactericida

Para la preparación de los extractos de los microorganismos, se emplearon caldo nutritivo y caldo MRS (Man Rogosa y Sharpe, Merck), el primero se enriqueció con 0,2% p/v de extracto de levadura, 0,05% p/v de peptona y 0,05% p/v de NaCl, el *Bacillus megaterium* creció de forma independiente en 10 mL de este medio, a 37°C y aeróticamente, por 48 horas. El *Lactococcus lactis* creció en caldo MRS en condiciones anaeróbicas a 37°C por 48 horas. Al cabo de este tiempo, los cultivos se sometieron a centrifugación, a 6000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C, para remover las células y solo obtener el sobrenadante.

En el ensayo de difusión en pozos, se emplearon cajas de Petri servidas con agar nutritivo para el extracto obtenido de *B. megaterium* y en agar MRS para el ensayo con el extracto de *Lactococcus lactis*. Se realizaron 4 pozos en cada medio de cultivo capacitados para contener 100 uL del extracto previamente obtenido. Una vez se adicionaron los extractos en cada pozo, se procedió al ensayo doble capa, el cual consistía en mezclar 10 mL del medio Müller Hinton (0,8% p/v agar/agar) con  $1 \times 10^6$  microorganismos/mL del microorganismo patógeno *Aeromonas veronii* aislado directamente de lesiones en piel de tilapia (*Oreochromis* sp). Esta mezcla se adicionaba encima del medio que contenía los extractos, se dejaba solidificar y se incubaban a 37°C durante 24 horas de manera aeróbica, el mismo ensayo se realizó con *Streptococcus agalactiae*, proporcionado por el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Sede Medellín. El control empleado para estas pruebas fueron sensibilizadores de antibióticos.

Los resultados se leyeron como el diámetro de inhibición del crecimiento de la bacteria patógena

en Müller-Hinton, mostrando un halo transparente alrededor del pozo que contenía el extracto de los microorganismos. El diseño empleado para las pruebas fue diseño por bloques completamente aleatorizado y para los análisis estadísticos se empleó una prueba de comparación de medias con un nivel de confianza del 95%, usando el programa Statgraphics Centurión con licencia para la Corporación Universitaria Lasallista.

Los extractos generados por los microorganismos fueron centrifugados, filtrados y enviados al laboratorio de Instrumentación de la Universidad Nacional, para ser evaluados por cromatografía líquida HPLC para *Lactococcus lactis* y por cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS para el extracto de *Bacillus megaterium*. Los análisis HPLC se realizaron en el equipo Agilent Modelo: 1100 series Detector: UV/VIS, 2  $\mu$ L, Flujo: 0,5 ml/min Fase móvil: Solución de ácido ortofosfórico 0.05% p/v. Columna: SUPELCOGELTH H, ref.:59304-U, 30 cm x 7.8 mm ID.

## RESULTADOS

Se encontró que en los ensayos de difusión en pozos, *A. veronii* fue sensible al efecto de los extractos del *B. megaterium* y del *L. lactis* con halos de inhibición hasta de 35 mm, Figura 1, siendo el extracto del *L. lactis* el que presentó mayor acción sobre las dos bacterias blancas estudiadas, *A. veronii* y *S. agalactiae*. Estos resultados se muestran en la Figura 2.

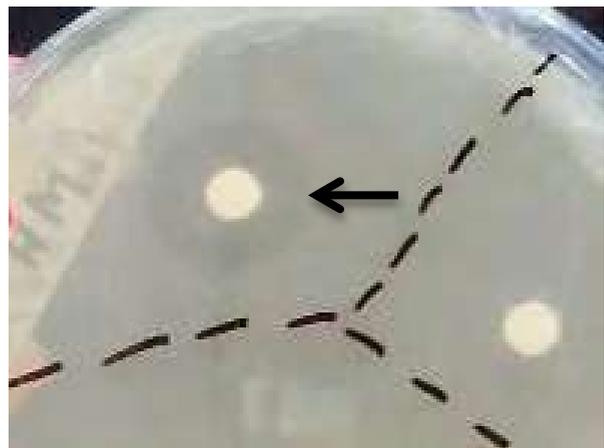
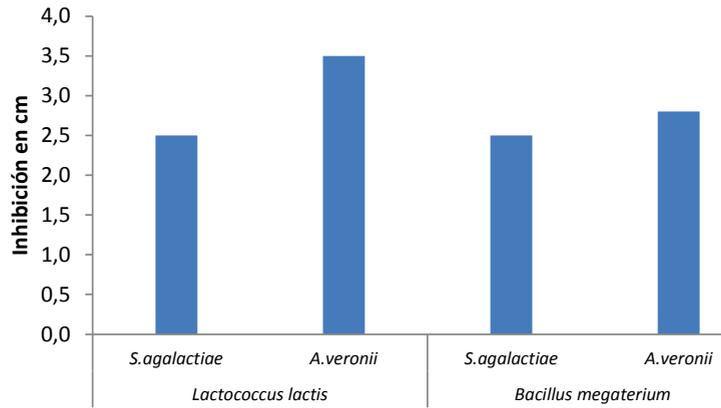


Figura 1. Zona de inhibición del extracto de *L. lactis* frente a *A. veronii*.



**Figura 2.** Zonas de inhibición producidas por los extractos de probióticos frente a *S. agalactiae* y *A. veronii*.

Los análisis de varianza, no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre la actividad bactericida del extracto de *L. lactis* y *B. megaterium*, frente a cada uno de los patógenos estudiados.

El perfil mostrado por cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS evidencia que el extracto de *Bacillus megaterium* genera en su mayoría ácidos orgánicos, mostrando la presencia de ácido n-hexadecanoico, ácido octadecenoico y producción de imidazoles. Por cromatografía líquida HPLC, se comprobó la presencia de ácido láctico confirmando el carácter homofermentador del *Lactococcus lactis*.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de inhibición se encontró un efecto positivo de los extractos de *L. lactis* y *B. megaterium* frente a las cepas patógenas de *A. veronii* y *S. agalactiae*, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En investigaciones realizadas con el ensayo de difusión se encontró que *A. hydrophila*, disminuyó su crecimiento ante la presencia de tres tipos de probióticos (16, 17). Estos resultados soportan los encontrados en esta investigación.

Hallazgos similares fueron encontrados en estudios realizados por Kumar y colaboradores (17, 18), los cuales mostraron el poder inhibitorio de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus plantarum*, frente a *A. veronii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Investigaciones realizadas por Hatje y colaboradores en 2014 (19), confirmaron el control que ejercen las bacterias lácticas cuando se sometieron conjuntamente con *A. veronii* en las líneas celulares Caco2, disminuyendo notablemente la adhesión de estos microorganismos a las líneas celulares y generando lisis en ellas.

Muñoz y colaboradores (15), encontraron un amplio espectro de inhibición para bacterias Gram negativas y Gram positivas patógenas de peces usando bacterias ácido lácticas, determinando que la actividad de estas bacterias se deba probablemente a la producción de bacteriocinas. Para el presente estudio el efecto inhibitorio del crecimiento en *A. veronii* y *S. agalactiae*, posiblemente se deba a la producción de ácido láctico por *L. lactis*, como fue determinado por HPLC.

En el presente estudio se encontró que los extractos de *L. lactis* y *B. megaterium*, limitaron el crecimiento de *S. agalactiae*. Similares hallazgos fueron encontrados por Serna y Colaboradores (20), quienes evaluando la actividad microbiana *in vitro* de *Weissella confusa*, comprobaron la inhibición de los patógenos *S. aureus* y *S. agalactiae*, los cuales no solo causan efectos deletéreos en peces sino también en otros monogástricos (20,21). Adineh y colaboradores (22), probaron en células Caco, el efecto de las bacterias lácticas, *Aeromona veronii* y *Aeromona hydrophila*, encontrando que las bacterias lácticas compitieron por los sitios de adhesión a las células y disminuyó considerablemente la viabilidad de las bacterias patógenas, estos hallazgos concuerdan con los resultados del presente estudio, donde los extractos de bacterias lácticas inhibieron considerablemente el crecimiento de *A. veronii*, *in vitro* (10).

Dentro del género *Bacillus* sp, la especie *Bacillus licheniformis* ha demostrado ser un potente antifúngico mediante la secreción de antibióticos, tales como, bacilomicina, licheniformina, proticina y bacitracina principalmente, además de imidazol (23). En especies como *Bacillus circulans* también se ha detectado la producción de ciertos metabolitos de origen antibiótico tales como la butirósina, circuli-

na, polipeptina, xilosantina, entre otras, explicando su amplio uso como bioprotector. Estos resultados soportan los encontrados en el análisis de masas realizado al extracto de *Bacillus megaterium*, en donde se obtuvo imidazol, compuestos con actividad antifúngica ampliamente usados para el control de crecimientos de mohos y levaduras (24). Así mismo Kumar y colaboradores (17), revelaron actividad inhibitoria *in vitro* del extracto de *Bacillus* sp, frente a patógenos del suelo como *Sclerotinia sclerotiorum*. El cultivo filtrado inhibió también *Fusarium oxysporum* y *Macrophomina phaseolina*, también comprometidos en la inhibición de estos patógenos. Estos hallazgos concuerdan con los reportados en el análisis de masas de esta investigación, donde se reveló la presencia de estos componentes en el extracto libre de células del bacilo esporulado.

## CONCLUSION

Los resultados obtenidos en esta investigación evidenciaron que los extractos de los microorganismos probióticos controlaron de forma efectiva el crecimiento de patógenos como *A. veronii* y *S. agalactia*. En el extracto de *L. lactis* se evidenció la producción de ácido láctico y en el extracto de *B. megaterium*, la producción de ácido palmítico, ácido esteárico e imidazol. Estos resultados soportan la importancia de emplear probióticos de bacilos esporulados y de bacterias lácticas como promotores de crecimiento en la industria acuícola.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Fondo Nacional de Regalías, dentro del convenio 4600000982, entre la Gobernación de Antioquia y la Corporación Universitaria Lasallista, y al laboratorio de Instrumentación y Microbiología de la Universidad Nacional.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Todos los autores participaron tanto en la producción experimental como en la escritura del manuscrito.

## REFERENCIAS

1. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. FAO. 2014 [Internet]. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf>
2. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:28-52. [Internet]. Available from: <http://jac.oxfordjournals.org/content/53/1/28.full.pdf>
3. Pérez T, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuola I, Halailh N, Vendrell D, de Blas I, Múzquiz JL. Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunol.* 2010;3:355-360. [Internet]. Available from: <http://www.nature.com/mi/journal/vaop/ncurrent/pdf/mi201012a.pdf>
4. Lategan MJ, Torpy FR, Gibson LF. Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas* media strain A199. *Aquaculture.* 2004;240(1-4):19-27.
5. Satish kumar R, Ragu Varman D, Kanmani P, Yuvaraj N, Paari K, Pattukumar V A V. Isolation, Characterization and Identification of a Potential Probiotic from South Indian Fermented Foods and Its Use as Biopreservative. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2009;2(3):145-151.
6. Sánchez B, Urdaci MC, Margolles A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology.* 2010;156:3232-3242.
7. Hugo AA, Kakisu E, De Antoni GL, Pérez PF. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* *in vitro*. *Lett Appl Microbiol.* 2008;46(6):613-619. [Internet]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2008.02363.x/epdf>
8. Moorthy G, Murali MR, Devarj SN. Lactobacilli facilitate maintenance of intestinal membrane integrity during *Shigella dysenteriae* 1 infection in rats. *Nutrition.* 2009;25(3):350-358. [Internet]. Available from: [http://www.researchgate.net/profile/Malliga\\_Raman\\_Murali/publication/23500377\\_Lactobacilli\\_facilitate\\_maintenance\\_of\\_intestinal\\_membrane\\_integrity\\_during\\_Shigella\\_dysenteriae\\_1\\_infection\\_in\\_rats/links/00b7d53495a858deb1000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Malliga_Raman_Murali/publication/23500377_Lactobacilli_facilitate_maintenance_of_intestinal_membrane_integrity_during_Shigella_dysenteriae_1_infection_in_rats/links/00b7d53495a858deb1000000.pdf)
9. Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J Fish Dis.* 2004;27(6):319-326.
10. Watson AK, Heinrich K, Lategan MJ, Gibson L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture.* 2008;274:1-14.
11. Del'Duca A, Evangelista Cesar D, Galuppo Diniz C CAP. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescentin situ hybridization technique. *Aquaculture.* 2013;388:115-121.
12. Zhang Y, Zhou Z, Liu Y, Cao Y, He S, Huo F, Qin C, Yao B, Ringø E. High-yield production of a chitinase from *Aeromonas veronii* B565 as a potential feed supplement for warm-water aquaculture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(4):1651-1662.
13. Harikrishnan R, Balasundaram C. Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. *Rev Fish Sci.* 2005;13:281-320.
14. Akhlaghi M, Munday BWR. Comparison of passive and native immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *J Fish Dis.* 1996;19:251-258.
15. Muñoz-Atienza E, Gómez-Sala B, Araújo C, Campanero C, Del Campo R, Hernández PE, Cintas LM. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.* 2013;13(1):15. [Internet]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/15>
16. Das BK, Neha Nidhi RG, Roy P, Muduli AK, Swain P, Mishra SS, Jayasankar P. Antagonistic activity of cellular components

- of *Bacillus subtilis* AN11 against bacterial pathogens. *Int J Curr Microbiol App Sci* (2014;3(5):795-809.
17. Kumar A, Saini S, Wray V, Nimtz M, Prakash A, Johri BN. Characterization of an antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A5F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Basic Microbiol*. 2012;52(6):670-678.
  18. Kumar M, Kumar AK, Ghosh M, Ganguli A. Characterization and Optimization of an Anti-Aeromonas Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* Isolated from Hukuti Maas an Indigenous Fermented Fish Product. *J Food Process Preserv*. 2014;38(3):935-947.
  19. Hatje E, Neuman C, Katouli M. Interaction of *Aeromonas* strains with lactic acid bacteria via Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Jan 15 [cited 2015 Jul 6];80(2):681-686. [Internet]. Available from: <http://aem.asm.org/cgi/content/long/80/2/681>
  20. Jiufeng S, Wei F, Bixia K, Dongmei He, Yuheng L, Dan N, Hailing T, Hualin P, Yunxin W, Yazhou M, Changwen K, Xiaoling D. Inapparent *Streptococcus agalactiae* infection in adult/commercial tilapia. *Sci Rep*. 2016;6(1):26319. [Internet]. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep26319>
  21. Obaidat MM, Salman AE, Lafi SQ. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in Imported Fish and Correlations between Antibiotic Resistance and Enterotoxigenicity. *J Food Prot*. 2015;78(11):1999-2005. [Internet]. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L610926292%5Cnhttp://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-104%5Cnhttp://rui.on.worldcat.org/atoztitles/link/?sid=EMBASE&issn=19449097&id=doi:10.4315%2F0362-028X.JFP-15-104&atitle=Prevalence>
  22. Adineh H, Jafaryan H, Sahandi J, Alizadeh M. Effect of *Bacillus* spp. probiotic on growth and feeding performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* larvae. *Bulg J Vet Med*. 2013;(1):29-36.
  23. Bacon C, Hinton D, Hinton A. Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* y other biocontrol *Bacillus* species. *J Appl Microb*. 2006;100(1):185-194. [Internet]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02770.x/pdf>
  24. Chen XH, Scholz R, Borriss M, Junge H, Mögel G, Kunz S, Borriss R. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotechnol*. 2009;140(1-2):38-44. [Internet]. Available from: [http://www.bio-protect.de/fileadmin/bioprotect-zwei/images/PDF\\_Feuerbrand/2009\\_Chen2009b\\_BIOTEC5116.pdf](http://www.bio-protect.de/fileadmin/bioprotect-zwei/images/PDF_Feuerbrand/2009_Chen2009b_BIOTEC5116.pdf)