

## Ensayo de inhibición en medio líquido con placa multipocillo de bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguay contra *Listeria monocytogenes*

### Liquid medium inhibition assay with microplates of lactic acid bacteria isolated from raw milk and Paraguay cheese against *Listeria monocytogenes*

Matías Policani<sup>1,2</sup>, Camila Ayala<sup>1,2</sup>, Sandra Álvarez<sup>1</sup>, Yadira Parra<sup>1</sup>, Gabriela Ulke<sup>3</sup>, Danilo Fernández<sup>1</sup> & Tomás López<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Iniciación Científica, San Lorenzo, Paraguay.

<sup>3</sup>Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Instituto Nacional de Alimentación y Nutrición, Asunción, Paraguay.

\*Autor correspondiente: [lopez@facen.una.py](mailto:lopez@facen.una.py).

**Resumen:** Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos generalmente considerados como seguros y poseen una gran capacidad para la bioconservación. Como agentes bioconservantes, las BAL pueden aplicarse como cultivos viables para la producción de compuestos antimicrobianos o explotando agentes químicos. Las BAL son conocidas por la producción de una variedad de compuestos antagonistas, entre ellos la bacteriocinas, y su potencial antimicrobiano está definido por la acción combinada de los metabolitos sobre bacterias no deseadas. En este trabajo se evalúa la actividad antimicrobiana de 7 cepas de BAL aisladas de leche cruda y queso Paraguay: *Enterococcus faecium* (M6A y M6B), *Lactobacillus fermentum* (M16A y M17A), *Lactobacillus rhamnosus* (M17B) y *Lactobacillus plantarum* (M18 y M21) frente a *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

**Palabras clave:** BAL, lácteos, bioconservación, antimicrobianos, bacteriocinas, patógenos.

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) are generally regarded as safe microorganisms with great potential for biopreservation. As biopreservative agents, LAB can be applied as viable cultures for the production of antimicrobial compounds or exploiting chemical agents. LAB are known for the production of a variety of antagonistic compounds, among them bacteriocins, and their antimicrobial potential is defined by the combined action of metabolites on non-desired bacteria. This work evaluates the antimicrobial activity of 7 strains of LAB isolated from raw milk and Paraguay cheese: *Enterococcus faecium* (M6A y M6B), *Lactobacillus fermentum* (M16A y M17A), *Lactobacillus rhamnosus* (M17B) and *Lactobacillus plantarum* (M18 y M21) against *E. coli*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

**Keywords:** LAB, dairy, biopreservation, antimicrobials, bacteriocins, pathogens.

## Introducción

Las bacterias ácido láctica (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas, anaerobias, no esporuladoras, que pueden ser cocos o bacilos y que producen ácido láctico como principal producto durante el proceso de fermentación y poseen un gran potencial biotecnológico en la industria de alimentos (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Sabatini, 2010). Como cualquier BAL que participe en un proceso de fermentación puede producir una variedad de compuestos inhibidores, el potencial antimicrobiano de estas bacterias está dado por la acción combinada de sus metabolitos en bacterias indeseadas (Salomskiene et al., 2019). Sin embargo,

recientemente se les está dando una atención especial a las bacteriocinas, por sus posibles aplicaciones para la conservación de alimentos (Devlieghere et al., 2004; Field et al., 2018; Gálvez et al., 2007, 2010; Woraprayote et al., 2016).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente que son activos contra otras bacterias, pueden o no poseer modificaciones postraduccionales y son secretadas al medio extracelular (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Cotter et al., 2005; Field et al., 2018). Sus principales ventajas en comparación con otros compuestos antimicrobianos de naturaleza peptídica son su alta tolerancia al estrés térmico, su capacidad de permanecer activas

Editor responsable: Nery López Acosta\*<sup>1</sup>

Recibido: 27/01/2020

Aceptado: 22/05/2024

\*Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.



2078-399X/2024 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.  
Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).

dentro de un amplio rango de pH y su efectividad incluso a bajas concentraciones (Woraprayote et al., 2016).

Si bien otras bacterias pueden producir bacteriocinas, las bacteriocinas producidas por BAL poseen la ventaja de que la mayoría de los cultivos iniciales de BAL para alimentos son considerados como seguros por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos, por lo que las bacteriocinas provenientes de estas también poseen este estatus (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Field et al., 2018). Además, las bacteriocinas provenientes de BAL son bastante potentes contra patógenos de alimentos y microorganismos que causan el deterioro de los alimentos sin alterar las cualidades sensoriales de los mismos y no presentan toxicidad para células eucariotas (Field et al., 2018).

El fin de este trabajo es identificar cepas de BAL aisladas de productos lácteos que posean potencial antimicrobiano contra *L. monocytogenes*, considerado como la bacteria patógena gram positiva de mayor preocupación debido a su capacidad de desarrollarse en una gran variedad de alimentos y condiciones ambientales (Gálvez et al., 2010).

## Materiales y Métodos

### Obtención de cepas

Se utilizaron 4 cepas previamente aisladas de BAL, pertenecientes al cepario del Departamento de Biotecnología de la FACEN-UNA las cuales fueron identificadas mediante MALDI-TOF y métodos moleculares para determinar el género y especie (Dušková et al., 2012) de las que se obtuvo las siguientes bacterias: *Enterococcus faecium* (M6A), *Lactobacillus fermentum* (M16A) y *Lactobacillus plantarum* (M18 y M21). Y para el patógeno se utilizó *Listeria monocytogenes*, donado por el Dr. Esteban Riera (Laboratorios Riera, Asunción, PY).

### Prueba de inhibición en medio líquido contra *Listeria monocytogenes*

#### Preparación de sobrenadantes y patógeno

Se cultivaron las cepas de BAL en medio MRSB por 24 h a 37 °C y *L. monocytogenes* en medio LB por 24 hs a 37 °C, ambas en una incubadora de

CO2 serie 3 water-jacketed (Thermo Scientific™), con una atmósfera de CO2 de 0,1%. Se centrifugó el cultivo de *L. monocytogenes* a 4500 rpm por 10 min a 10 °C en una centrífuga refrigerada TGL-16M (Boyn™), se desechó el sobrenadante y se resuspendió en PBS (1X). Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm buscando llegar a una absorbancia equivalente a  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL. Luego, se hicieron dos diluciones seriadas 1:10. Por otra parte, se centrifugaron los cultivos de BAL a 6000 g (7600 rpm) por 20 minutos a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Luego se filtraron los sobrenadante con filtros de 0.22 µm (Sartorius) y se neutralizaron con hidróxido de sodio hasta un pH de 6~7 (Gellert et al., 1999; Zimina et al., 2016).

Finalmente, se incubó en una placa multipocillo (×96) a 37 °C por 24 h en un Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™), acorde a los tratamientos presentados en la Tabla 1. Se midió la densidad óptica a 620 nm cada 30 min por espectrofotometría durante la incubación (Gellert et al., 1999; Zimina et al., 2016). Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado; como control positivo se utilizó una solución estéril de nisina 0,25% y como controles negativos se utilizaron: medio LB y agua estéril (Control 1) y medio MRSB y medio LB (Control 2), ambas inoculadas con 15 µL de *L. monocytogenes* ( $1,5 \times 10^5$  UFC/mL).

### Cálculo del porcentaje de inhibición

Para el cálculo del porcentaje de inhibición se procedió a utilizar la absorbancia a las 24 hs y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Donde: } I = \frac{Abs_t - Abs_c}{Abs_c} \times 100$$

I = Porcentaje de inhibición.

$Abs_t$  = Absorbancia máxima del tratamiento.

$Abs_c$  = Absorbancia máxima del control.

## Resultados y discusión

La importancia de las pruebas de enfrentamiento radica en tener resultados sobre actividad antimicrobiana de las BAL aisladas frente a patógenos comúnmente encontrados en los alimentos y que

**Tabla 1.** Tratamientos utilizados en la prueba de inhibición en medio líquido.

Tratamientos		Componentes (240 µL)
1	Medio estéril	200 µL de medio LB + 40 µL de agua estéril
2	Control 1	185 µL de agua estéril + 40 µL de medio LB + 15 µL de <i>L. monocytogenes</i> (1,5×10 <sup>5</sup> UFC/mL)
3	Control 2	185 µL de medio MRSB + 40 µL de medio LB + 15 µL de <i>L. monocytogenes</i> (1,5×10 <sup>5</sup> UFC/mL)
4	Medio + Agua	185 µL de medio MRSB + 40 µL de medio LB + 15 µL de agua estéril
5	Blanco	40 µL de medio LB + 185 µL de sobrenadante + 15 µL de agua estéril
6	Ensayos	40 µL de medio LB + 185 µL de sobrenadante + 15 µL de <i>L. monocytogenes</i> (1,5×10 <sup>5</sup> UFC/mL)
7	Control +	40 µL de medio LB + 185 µL de nisina + 15 µL de <i>L. monocytogenes</i> (1,5×10 <sup>5</sup> UFC/mL)

producen su deterioro o enfermedades transmitidas por los alimentos; para los cuales deben actuar como bacteriostáticos o bactericidas.

### Porcentajes de inhibición

En la Tabla 2 se observan los porcentajes de inhibición obtenidos para cada cepa.

#### *Enterococcus faecium*

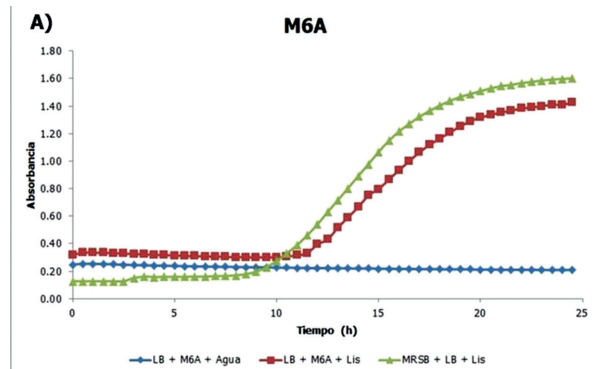
En la Fig. 1 se observa el crecimiento de *L. monocytogenes* frente al sobrenadante de *E. faecium* (M6A) en términos de tiempo (h) vs. absorbancia.

Este organismo presentó un bajo valor de inhibición, 10,27%, siendo este el más bajo de todo el ensayo.

Algunas bacterias del género *Enterococcus*, incluyendo *E. faecium*, producen bacteriocinas de-

**Tabla 2.** Porcentajes de inhibición producidos por cada cepa.

Muestra	Organismo	Porcentaje de Inhibición
M6A	<i>E. faecium</i>	-11,01%
M16A	<i>L. fermentum</i>	-56,11%
M18	<i>L. plantarum</i>	-30,88%
M21	<i>L. plantarum</i>	-19,90%
Control	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	-78,12%
Nisina	N/A	-93,26%

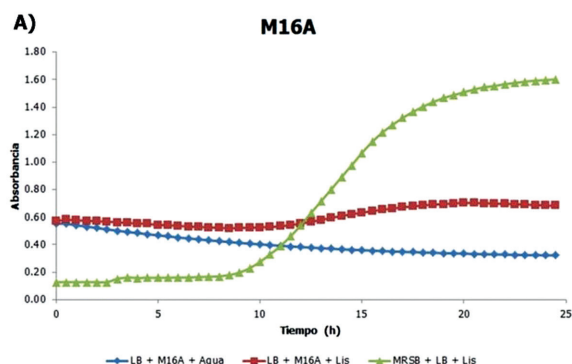
**Figura 1.** Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* frente al sobrenadante de *E. faecium*. Azul: blanco, Rojo: tratamiento y Verde: control negativo.

nominadas enterocinas, las cuales han demostrado poseer actividades contra *Listeria monocytogenes* (Aymerich et al., 1996; Casaus et al., 1997; Cintas et al., 1997; Cintas et al., 1998; Khan et al., 2010). Por lo que es probable que estas cepas no sean productoras de bacteriocinas y, por lo tanto, no inhiban el crecimiento de *L. monocytogenes*.

#### *Lactobacillus fermentum*

En la Fig. 2 se observa el crecimiento de *L. monocytogenes* frente al sobrenadante de *L. fermentum* (M16A) en términos de tiempo (h) vs. absorbancia.

Nuestros resultados muestran que esta cepa produjo una inhibición superior al 50%. El valor medido fue de 56,11%. Por lo que esta cepa estudia-



**Figura 2.** Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* frente al sobrenadante de *L. fermentum*. Azul: blanco, Rojo: tratamiento y Verde: control negativo.

da de *L. fermentum* podría ser una cepa productora de bacteriocinas con base en que posee el mayor porcentaje de inhibición del ensayo.

La producción de bacteriocinas por *L. fermentum* ha sido registrada previamente, siendo estas efectivas principalmente contra bacterias gram-positivas, incluyendo *L. monocytogenes* (Pascual et al., 2008; Sabia et al., 2014; Yan & Lee, 1997).

### *Lactobacillus plantarum*

En la Fig. 3 se observa el crecimiento de *L. monocytogenes* frente a los sobrenadante de las cepas M18 y M21 de *L. plantarum* en términos de tiempo (h) vs. absorbancia.

Probablemente, *L. plantarum* sea la especie más estudiada y mejor caracterizada para la producción de bacteriocinas. A pesar de esto, estas

cepas presentaron rendimientos relativamente bajos, con porcentajes de inhibición de 30,88% (M18) y 19,90% (M21). Sería interesante realizar análisis moleculares para determinar la cepa a la que corresponde cada una y analizar la diferencia de resultados entre organismos de una misma especie.

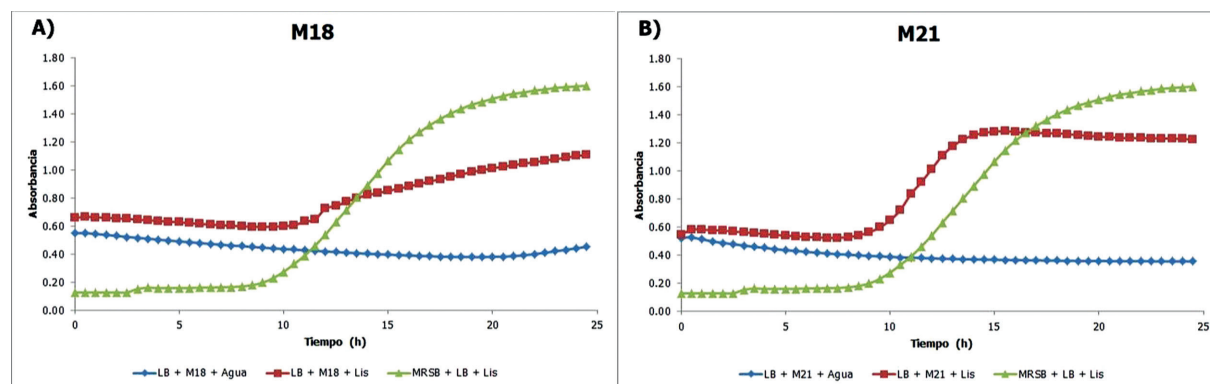
Se bien se ha reportado la producción de bacteriocinas de esta especie a partir de varias matrices de comida y se ha evaluado su actividad contra un gran número de microorganismos (Borrero et al., 2018; da Silva Sabo et al., 2014; Fernandes et al., 2017; Todorov et al., 2016; Wen et al., 2016; Zacharof & Lovitt, 2012; Zhang et al., 2018), estas cepas no presentan una gran actividad contra *L. monocytogenes*.

### Controles positivos

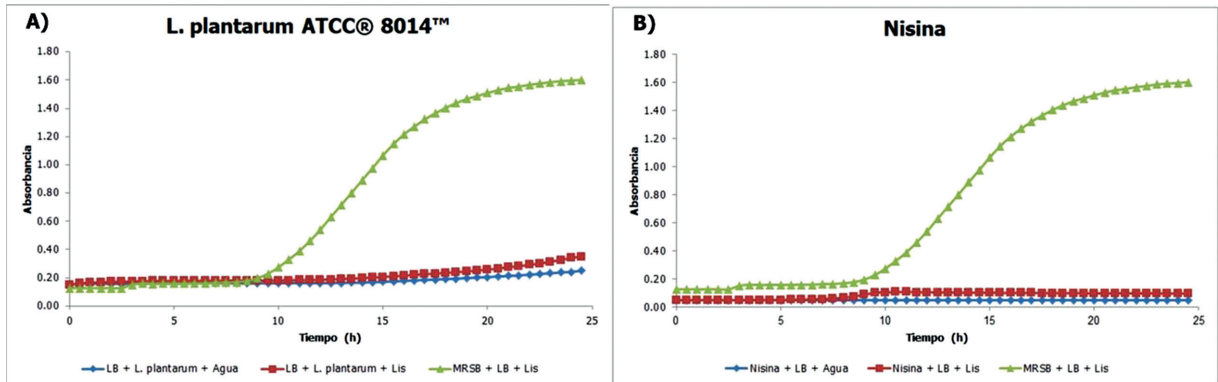
En la Fig. 4 se observa el crecimiento de *L. monocytogenes* frente a los sobrenadante de la cepa control *L. plantarum* ATCC® 8014™ y nisina, una bacteriocina bien estudiada y caracterizada, en términos de tiempo (h) vs. absorbancia.

Los resultados de los controles fueron acorde a los esperados, presentando un alto porcentaje de inhibición, 78,12% (*Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™) y 93,26% (nisina).

Se utilizó *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™ como control, pues es una cepa en la que se ha comprobado la producción de bacteriocinas (Lash et al., 2005; Ming et al., 2015), con 78,12% de inhibición. Y la nisina, la única bacteriocina aproba-



**Figura 3.** Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* frente a sobrenadantes de *L. plantarum*. Azul: blanco, Rojo: tratamiento y Verde: control negativo.



**Figura 4.** Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* frente a sobrenadante de *L. plantarum* ATCC® 8014™ y nisina. Azul: blanco, Rojo: tratamiento y Verde: control negativo.

da por la FDA, cuya efectividad contra *Listeria* ha sido comprobada anteriormente (Delves-Broughton et al., 1996), coincidiendo con nuestros resultados donde la nisina produjo una inhibición de > 90%.

### Conclusión

Se observó inhibición de crecimiento para todas las cepas aisladas a partir de leche cruda y queso Paraguay, demostrando que poseen potencial antimicrobiano contra *L. monocytogenes*. La cepa de *E. faecium* tuvo un resultado de apenas del 10%, mientras que ambas cepas de *L. plantarum* produjeron inhibiciones entre 20% y 30%. La cepa que presentó los mejores resultados fue *L. fermentum*, con porcentajes de inhibición promedio de 56,11%. No obstante, estos porcentajes fueron inferiores a las observadas en los controles positivos de *L. plantarum* ATCC® 8014™ (~80%) y nisina (>95%). Nuestro estudio demostró que *E. faecium* no posee grandes cualidades de inhibición. Mientras que las cepas con mayor actividad de inhibición corresponden a *L. fermentum*, por lo que es necesario estudiar estas cepas a mayor profundidad para evaluar la producción de compuestos antimicrobianos así como su capacidad como productoras de bacteriocinas.

En casi todos los estudios previos se mencionan que las BAL tienen varios compuestos con propiedades inhibitorias frente a bacterias patógenas y deteriorantes de alimentos. Por lo que a partir de este estudio donde se aislaron bacterias acidolácti-

cas locales, es crucial proseguir con los ensayos de inhibición, determinando las fuentes de actividad inhibitoria como ácidos orgánicos, peróxidos de hidrógeno y bacteriófagos.

### Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron de manera equitativa en la elaboración de este artículo.

### Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés

### Financiamiento

El trabajo se realizó en el marco del proyecto “Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos aisladas de productos lácteos (PINV15-681)” financiado por el CONACYT a través de su programa PROCENCIA.

### Literatura citada

- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. & Kuipers, O.P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7): 2939–2951.
- Aymerich, T., Holo, H., Håvarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. & Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 62(5): 1676–1682.
- Borrero, J., Kelly, E., O'Connor, P.M., Kelleher, P., Scully, C., Cotter, P.D., Mahony, J. & Sinderen, D. van. (2018). Plantaricyclin: a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* NI326: Purification, Characterization, and Heterologous Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1)e01801-17: 1–10.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernández, P.E. & Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143(7): 2287–2294.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. & Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11): 4321–4330.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F. & Håvarstein, L.S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 180(8): 1988–1994.
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10): 777–788.
- da Silva Sabo, S., Vítolo, M., González, J.M.D. & Oliveira, R.P.S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64: 527–536.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J. & Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(2): 193–202.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. & Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4): 273–285.
- Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z. & Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2): 107–114.
- Fernandes, P., Loureiro, D., Monteiro, V., Ramos, C., Nero, L.A., Todorov, S.D. & Guerreiro, J.S. (2017). *Lactobacillus plantarum* isolated from cheese: production and partial characterization of bacteriocin B391. *Annals of Microbiology*, 67(6): 433–442.
- Field, D., Ross, R.P. & Hill, C. (2018). Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*, 20: 1–6.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Benomar, N. & Lucas, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2): 142–148.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. & Omar, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1): 51–70.
- Gellert, G., Stommel, A. & Trujillano, A.B. (1999). Development of an optimal bacterial medium based on the growth inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 39(3): 467–476.
- Khan, H., Flint, S. & Yu, P.L. (2010). Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1): 1–10.
- Lash, B.W., Mysliwiec, T.H. & Gourama, H. (2005). Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology*, 22(2): 199–204.
- Ming, L., Zhang, Q., Yang, L. & Huang, J.A. (2015). Comparison of antibacterial effects between antimicrobial peptide and bacteriocins isolated from *Lactobacillus plantarum* on three common pathogenic bacteria. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(4): 5806–5811.
- Pascual, L.M., Daniele, M.B., Giordano, W., Pájaro,

- M.C. & Barberis, I.L. (2008). Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology*, 56(4): 397–402.
- Sabatini, N. (2010). A Comparison of the volatile compounds, in Spanish-style, Greek-style and Castelvetro-style Green Olives of the Nocellara del Belice Cultivar. Pp. 219–231, in Preedy, V.R. & Watson, R.R. (Eds.). *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Amsterdam: Elsevier. xxxix + 1479 pp.
- Sabia, C., Anacarso, I., Bergonzini, A., Gargiulo, R., Sarti, M., Condò, C., Messi, P., de Niederhausen, S., Iseppi, R. & Bondi, M. (2014). Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolated from human vaginal secretions. *Anaerobe*, 26: 41–45.
- Salomskiene, J., Jonkuvienė, D., Macioniene, I., Abraitienė, A., Zeime, J., Repeckienė, J. & Vaiciulyte-Funk, L. (2019). Differences in the occurrence and efficiency of antimicrobial compounds produced by lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*, 245(3): 569–579.
- Todorov, S.D., Holzapfel, W. & Nero, L.A. (2016). Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and some aspects of its mode of action. *Annals of Microbiology*, 66(3): 949–962.
- Wen, L.S., Philip, K., & Ajam, N. (2016). Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control*, 60: 430–439.
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S. & Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120: 118–132.
- Yan, T.R. & Lee, C.S. (1997). Characterization of a partially purified bacteriocin, Fermentcin B, from *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnology Letters*, 19(8): 741–744.
- Zacharof, M.P. & Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2: 50–56.
- Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., Han, X. & Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from chinese traditional fermented milk. *Frontiers in Microbiology*, 9(2165): 1–7.
- Zimina, M.I., Sukhih, S.A., Babich, O.O., Noskova, S. Yu., Abrashina, A.A. & Prosekov, A.Y. (2016). Investigating antibiotic activity of the genus *Bacillus* strains and properties of their bacteriocins in order to develop next generation pharmaceuticals. *Food and Raw Materials*, 4(2): 92–100.