

Growth ability, microbial activity and susceptibility to antimicrobials of two strains of *Pediococcus pentosaceus*, candidates to probiotic

Capacidad de crecimiento, actividad antimicrobiana y susceptibilidad a antimicrobianos de dos cepas de *Pediococcus pentosaceus*, candidatas a probiótico

Yaneisy García-Hernández¹, Tania Pérez-Sánchez², Yanelys García-Curbelo¹, Dailyn Sosa-Cossio¹ and Jacques R. Nicoli³

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

³Instituto de Ciência Biológica (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Email: yaneisyg@ica.co.cu

The objective of this study was to evaluate growth ability, antimicrobial activity and susceptibility to antimicrobials of two strains of *Pediococcus pentosaceus* (LB-12 and LB-25), candidates to probiotic. Four trials were performed with randomized designs and three repetitions. Strain growth in a MRS medium at 37 °C had a similar performance, and from 6h of culture, they reached the stationary stage. Their growth speeds were around 0.5 h⁻¹ and duplication times were 1.3 h. Both were able to grow and decrease pH of a medium where fructans of *Agave fourcroydes* were used as energy source, although its concentration decreased regarding the MRS medium. In addition, strains inhibited the growth of evaluated pathogenic bacteria, with a high antimicrobial action of LB-25 against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 and *Listeria monocytogenes* ATCC 1531. Candidates to probiotic were sensitive to G penicillin, florfenicol, chloramphenicol, amoxicillin clavulanic acid and doxycycline. At the same time, were resistant to trimethoprine-sulfamethoxazole, cephalixin, tetracycline, vancomycin, nalidixic acid, oxalonic acid, enrofloxacin and flumequine, streptomycin, kanamycin and gentamicin. It can be concluded that *P. pentosaceus* LB-12 and LB-25, *in vitro*, have an antimicrobial activity against pathogens, are susceptible to antimicrobials and have a proper growth ability in a MRS medium, and when fructans are used as energy source, which favors their inclusion in symbiotic and probiotic formulations for animal production.

Key words: *lactic bacteria*, *additives*, *microbial growth*

Lactic acid bacteria, mainly those of *Lactobacillus* genus, are among the microorganisms that are more studied and used as probiotic candidates or

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de crecimiento, actividad antimicrobiana y susceptibilidad a antimicrobianos de dos cepas de *Pediococcus pentosaceus* (LB-12 y LB-25) candidatas a probiótico. Se realizaron cuatro ensayos con diseños aleatorizados y tres repeticiones. El crecimiento de las cepas en caldo MRS a 37 °C tuvo un comportamiento similar y a partir de las 6 h de cultivo alcanzaron la fase estacionaria. Sus velocidades de crecimiento fueron aproximadamente de 0.5 h⁻¹ y los tiempos de duplicación de 1,3 h. Ambas fueron capaces de crecer y disminuir el pH de un medio de cultivo donde se empleó fructanos de *Agave fourcroydes* como fuente energética, aunque su concentración disminuyó con respecto al medio MRS. También, las cepas inhibieron el crecimiento de las bacterias patógenas evaluadas, con mayor acción antimicrobiana de LB-25 frente *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes* ATCC 1531. Las candidatas a probiótico fueron sensibles a penicilina G, florfenicol, cloranfenicol, amoxicilina ácido clavulánico y doxiciclina. A su vez, fueron resistentes al trimetoprina-sulfametoxazol, cefalexina, tetraciclina, vancomicina, ácido nalidíxico, ácido oxalínico, enrofloxacin y flumequine, estreptomycin, kanamicina y gentamicina. Se concluye que *P. pentosaceus* LB-12 y LB-25, *in vitro*, ejercen actividad antimicrobiana contra patógenos, son susceptibles a antimicrobianos y poseen adecuada capacidad de crecimiento en medio MRS y cuando se emplean fructanos como fuente energética, lo que posibilitaría su inclusión en formulaciones probióticas y simbióticas para la producción animal.

Palabras clave: *bacterias lácticas*, *aditivos*, *crecimiento microbiano*

Las bacterias ácido lácticas, fundamentalmente las del género *Lactobacillus*, se encuentran entre los microorganismos que más se estudian y utilizan como

are included in probiotic products and functional feeds (Saura-Calixto and Goñi 2005 and Boyle *et al.* 2006). Strains of *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Escherichia coli* (non-pathogenic strains), *Aspergillus* and yeasts (Bajagai *et al.* 2016) are also used.

García-Hernández *et al.* (2016) isolated, identified and characterized lactic bacteria, of bird origin, as probiotic candidate. These authors found that *Lactobacillus pentosus* LB-31 was the most promising strain and evaluated its potentialities in an essay with broilers. However, other identified strains in the study, like *Pediococcus pentosaceus* (LB-12 and LB-25), could be evaluated or included in multispecies probiotics, that encourage the beneficial effects of cultures of individual strains, as well as symbiotic formulations (Bomba *et al.* 2002 and Bajagai *et al.* 2016).

Bacteria of *Pediococcus* genus are presented in the shape of coccus (tetrads) and are anaerobic, Gram positive, not mobile, non-sporulated, facultative and negative catalase (Porto *et al.* 2017). According to these authors, *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* are the main species used in probiotic supplements for animals and humans, as well as in the production of bacteriocins (pediocin) and inoculum in fermentative processes to avoid contaminations. Nevertheless, to be considered as probiotics, they must fulfill the requirements published by FAO and WHO (2002), as well as demonstrate their efficiency, which depends on the strain or strains used, among other factors (Yang *et al.* 2009 and Endo and Gueimonde 2016).

Among the *in vitro* characteristics to be evaluated, generally, for selecting probiotic strains, are the tolerance to low pH, high concentrations of biliary salts, growth ability of candidates, antimicrobial activity and susceptibility to antimicrobials. Determination of these last characteristics is the objective of this study, with the evaluation of two strains of *Pediococcus pentosaceus* (LB-12 y LB-25) and their growth ability with the use of fructans of *Agave fourcroydes* (García-Curbelo *et al.* 2015a, 2015b) as energy source in a cultivation medium, which could favor the generation of symbiotic futures.

Materials and Methods

Four trials were conducted for studying growth dynamics of lactic bacteria strains in a MRS (Man, Rogosa and Sharpe) medium, their growth ability in the presence of fructans of *Agave fourcroydes* (FRUCTOICA) as energy source of the medium and their antimicrobial activity and susceptibility to antimicrobials.

Bacteria characteristics. Strains used belonged to *Pediococcus pentosaceus* LB-12 and LB-25, of bird origin, from the Banco de Microorganismos para la

candidatos probióticos o se incluyen en productos probióticos y alimentos funcionales (Saura-Calixto y Goñi 2005 y Boyle *et al.* 2006). También se emplean cepas de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Escherichia coli* (cepas no patógenas), *Aspergillus* y levaduras (Bajagai *et al.* 2016).

García-Hernández *et al.* (2016) aislaron, identificaron y caracterizaron bacterias lácticas, de origen aviar, como candidatas a probiótico. Estos autores encontraron que *Lactobacillus pentosus* LB-31 fue la cepa más promisoría y evaluaron sus potencialidades en un ensayo con pollos de ceba. Sin embargo, otras cepas identificadas en el estudio, como *Pediococcus pentosaceus* (LB-12 y LB-25), se pudieran evaluar o incluir en probióticos multispecies, que potencien los efectos benéficos de cultivos de cepas individuales, así como en formulaciones simbióticas (Bomba *et al.* 2002 y Bajagai *et al.* 2016).

Las bacterias del género *Pediococcus* se presentan en forma de cocos (tétradas) y son anaerobias Gram positivas, no móviles, no esporuladas, catalasa negativa y facultativas (Porto *et al.* 2017). Según estos autores, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici* son las principales especies utilizadas en suplementos probióticos para animales y humanos, así como en la producción de bacteriocinas (pediocina) e inóculo en los procesos fermentativos para evitar contaminaciones. No obstante, para ser considerados como probióticos deben cumplir con los requisitos publicados por FAO y WHO (2002), así como demostrar su eficacia, que depende de la cepa o cepas que se empleen, entre otros factores (Yang *et al.* 2009 y Endo y Gueimonde 2016).

Entre las características *in vitro* que se evalúan, generalmente, para seleccionar cepas probióticas se encuentran la tolerancia a bajos pH, altas concentraciones de sales biliares, capacidad de crecimiento de los candidatos, actividad antimicrobiana y susceptibilidad a antimicrobianos. La determinación de estas últimas características constituye el objetivo de este trabajo al estudiar dos cepas de *Pediococcus pentosaceus* (LB-12 y LB-25) y evaluar su capacidad de crecimiento con la utilización de fructanos de *Agave fourcroydes* (García-Curbelo *et al.* 2015a, 2015b) como fuente de energía en un medio de cultivo, que posibilitaría la generación de futuros simbióticos.

Materiales y Métodos

Se realizaron cuatro ensayos para estudiar la dinámica de crecimiento de las cepas de bacterias lácticas en el medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe), su capacidad de crecimiento en presencia de fructanos de *Agave fourcroydes* (FRUCTOICA) como fuente energética del medio de cultivo y su actividad antimicrobiana y susceptibilidad a antimicrobianos.

Características de las bacterias. Las cepas utilizadas fueron *Pediococcus pentosaceus* LB-12 y LB-25, de origen aviar, pertenecientes al Banco de Microorganismos

Producción Animal (BAMIPA) of the Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba). These strains were identified by sequencing of ribosomal RNA 16S gen and its sequences are located in the GenBank (Access number: FR717460 and FR717465). In addition, they were previously characterized as probiotic candidates according to their growth ability at 24 h, lactic acid production, tolerance to acid pH and high concentrations of biliary salts (García-Hernández *et al.* 2016). In this study, both strains of lactic bacteria, preserved in a MRS medium with glycerol at 15 % (v/v) and freezing at -80 °C, were activated with two sub-cultures in MRS medium (Oxoid, UK) at 37 °C from 18 to 24 h. From the active culture, a suspension of each strain (LB-12 and LB-25) was prepared in a MRS medium (pH 6.20±0.2) with optical density (OD) at 600 nm of 0.125 equivalent to 10^7 cfu·mL⁻¹. Inocula concentration was verified through culture in agar MRS plates (Oxoid, UK).

Growth dynamics of P. pentosaceus in MRS medium. An amount of 20 µL of each suspension were inoculated in cells of the microplate, that contained MRS medium (1/10, v/v). Growth was monitored in a Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 (Molecular Devices, USA). Each cell was considered an experimental unit. Optical density (OD) at 600 nm was measured every 30 min. per 12 h of incubation at 37 °C. It was verified the failure in the fulfillment of normality assumption by Shapiro and Wilk (1965) test for this variable, which distribution was fitted to Gamma. Therefore, a mixed generalized linear model was used, through GLIMMIX procedure of the statistical package SAS version 9.3 (SAS Institute Inc. 2013) and function of Log link for the analysis of variance according to the design with means repeated in the time. The model considered time as fixed effect, intercept as random effect and repetitions as subject. Components of variance (CV) was the variance-covariance structure of the best fit. The comparison of means at $P < 0.05$ was performed with the test of fixed range Tukey-Kramer (Kramer 1956). From the results of OD in the exponential stage of the culture, in each repetition, the ln OD was calculated. With these values, maximum growth speeds of strains were determined by linear regression and time of duplication (td) was calculated according to the equation $t(d) = \ln 2 / \mu$ (Prescott *et al.* 2003). Statistics of mean and standard deviation were determined to these data.

Growth of P. pentosaceus in a culture medium with FRUCTOICA as an energy source. A completely randomized design was used with a 2x2 factorial arrangement and three repetitions per treatment. Factors were lactic strains (LB-12 and B-25) and culture media (2). MRS (Oxoid, UK, pH 6.31 ± 0.02) medium was used as control cultivation medium and MRS medium. Glucose was replaced by prebiotic FRUCTOICA (pH 5.74 ± 0.02). It was sterilized by filtration and

para la Producción Animal (BAMIPA) del Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba). Estas cepas se identificaron por secuenciación del gen 16S ARN ribosomal y sus secuencias se encuentran depositadas en el GenBank (números de acceso: FR717460 y FR717465). Además, se caracterizaron previamente como candidatas a probiótico según su capacidad de crecimiento a las 24 h, producción de ácido láctico y tolerancia a pH ácidos y altas concentraciones de sales biliares (García-Hernández *et al.* 2016). En este estudio, ambas cepas de bacterias lácticas, conservadas en caldo MRS con glicerol al 15 % (v/v) y congelación a -80 °C, se activaron con dos sub-cultivos en caldo MRS (Oxoid, UK) a 37 °C de 18-24 h. A partir del cultivo activo, se preparó una suspensión de cada cepa (LB-12 y LB-25) en caldo MRS (pH 6.20±0.2) con densidad óptica (DO) a 600 nm de 0.125 equivalente a 10^7 ufc·mL⁻¹. La concentración de los inóculos se comprobó mediante la siembra en placas de agar MRS (Oxoid, UK).

Dinámica de crecimiento de P. pentosaceus en medio MRS. Se inocularon 20 µL de cada suspensión en celdas de una microplaca, que contenían caldo MRS (1/10, v/v). El crecimiento se monitoreó en un Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 (Molecular Devices, USA). Cada celda se consideró una unidad experimental. La densidad óptica (DO) a 600 nm se midió cada 30 min. por 12 h de incubación a 37 °C. Se constató el no cumplimiento del supuesto de normalidad por la dócima Shapiro y Wilk (1965) para esta variable, cuya distribución se ajustó a la Gamma. Por esto se empleó un modelo lineal generalizado mixto mediante el procedimiento GLIMMIX del paquete estadístico SAS version 9.3 (SAS Institute Inc. 2013) y función de enlace Log para el análisis de varianza según diseño con medidas repetidas en el tiempo. El modelo consideró el tiempo como efecto fijo, el intercepto como aleatorio y las repeticiones como "subject". La estructura de varianza-covarianza de mejor ajuste fue la de componentes de la varianza (CV). Se utilizó para la comparación de medias a $P < 0.05$ la dócima de rango fijo Tukey-Kramer (Kramer 1956). A partir de los resultados de DO en la fase exponencial del cultivo, en cada repetición, se calculó el ln DO. Con estos valores se determinaron las velocidades máximas de crecimiento de las cepas por regresión lineal y se calculó el tiempo de duplicación (td) según la ecuación $t(d) = \ln 2 / \mu$ (Prescott *et al.* 2003). A estos datos se les determinaron los estadígrafos media y desviación estándar.

Crecimiento de P. pentosaceus en un medio de cultivo con FRUCTOICA como fuente energética. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2 x 2 y tres repeticiones por tratamiento. Los factores fueron las cepas lácticas (LB-12 y B-25) y los medios de cultivo (2). Se utilizó caldo MRS (Oxoid, UK, pH 6.31 ± 0.02) como medio de cultivo control y caldo MRS. Se sustituyó la glucosa por el prebiótico FRUCTOICA (pH 5.74 ± 0.02). Este se esterilizó por

later added to the sterilization of culture media, at a concentration of $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. As experimental units, tubes with culture media were used according to experimental treatments. They were inoculated with bacterial suspensions at a rate of 1/10 (v/v) to obtain an initial concentration of $10^6 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, which was confirmed through a culture in agar MRS plates. Tubes were incubated at 37°C for 24 h. After this time, 1 mL was taken from each repetition to determine growth ability ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$) and pH of the remaining culture was measured with a digital pH meter Professional Meter-PP-25 (precision ± 0.01 units). Concentration of viable microorganisms ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$) was determined by visual counting of colonies in agar MRS. For this, samples were dissolved consecutively in a saline solution (0.85 %, w/v) and it was cultivated in agar MRS plates, which were later incubated at 37°C from 24 to 72 h.

Antimicrobial activity. Antimicrobial activity of lactic bacteria (producers) was determined by triplicate, according to the double layer method (Tagg *et al.* 1976). Pathogenic bacteria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Shigella sonnei* ATCC 11060, *Escherichia coli* ATCC 4238, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 and *Shigella flexneri* (clinical isolate belonging to LEFM/ICB/UFMG) were used as indicators. For the assay, 5 μL of each active culture was deposited on MRS agar plates and incubated at 37°C for 24 h. After incubation, the producing bacteria were exposed to chloroform for 20-30 min. Residual chloroform was let to evaporate and plates were covered with the pathogenic cultures. These indicator bacteria were also activated with two subcultures in 5 mL of BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, UK) medium, incubated at 37°C for 24 h. An amount of 10 μL of pathogenic cultures were added in tubes with 3.5 mL of semi-solid BHI (0.75 % agar, w/v), homogenized and poured into the plates treated with chloroform. After solidification, plates were incubated at 37°C for 24 h and the presence or absence of inhibition halos was observed. Inhibition halos indicated antimicrobial activity of strains and their reading was performed with a digital vernier caliper (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japan). The diameter of bacteria culture was subtracted from the value of halos and differences among means were determined.

Data of microbial growth in a medium with FRUCTOICA and the assay of antimicrobial activity were processed with the statistical package InfoStat version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). The multiple comparison test of Duncan (1955) and the t-student were used, when necessary, to determine differences among means at $P < 0.05$. In the case of microorganism counting, data did not follow the normal distribution, so they were transformed according to $\log X$.

Susceptibility to antimicrobials. Susceptibility

filtración y se adicionó posterior a la esterilización de los medios de cultivo, a concentración de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Como unidades experimentales se utilizaron tubos con los medios de cultivo según los tratamientos experimentales. Estos se inocularon con las suspensiones bacterianas a razón de 1/10 (v/v) para obtener una concentración inicial de $10^6 \text{ ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$, que se comprobó mediante la siembra en placas de agar MRS. Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 h. Después de este tiempo, se tomó 1 mL de cada repetición para determinar la capacidad de crecimiento ($\text{ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se midió el pH del cultivo restante en pHmetro digital Sartorius Profesional Meter-PP-25 (precisión ± 0.01 unidades). La concentración de microorganismos viables ($\text{ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$) se determinó por conteo visual de colonias en agar MRS. Para esto, las muestras se diluyeron de forma seriada en solución salina (0.85 %, p/v) y se sembraron en placas de agar MRS, que posteriormente se incubaron a 37°C de 24 a 72 h.

Actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (productoras) se determinó por triplicado, según el método de doble capa (Tagg *et al.* 1976). Se utilizaron como indicadoras las bacterias patógenas *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Shigella sonnei* ATCC 11060, *Escherichia coli* ATCC 4238, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 y *Shigella flexneri* (aislado clínico perteneciente a LEFM/ICB/UFMG). Para el ensayo, se depositaron 5 μL de cada cultivo activo en placas de agar MRS y se incubaron a 37°C por 24 h. Después de la incubación, las bacterias productoras se expusieron a cloroformo por 20-30 min. El cloroformo residual se dejó evaporar y las placas se cubrieron con los cultivos patógenos. Estas bacterias indicadoras, también, se activaron con dos subcultivos en 5 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, UK), incubados a 37°C por 24 h. Se adicionaron 10 μL de los cultivos patógenos en tubos con 3,5 mL de BHI semisólido (0,75 % de agar, p/v), se homogenizaron y se vertieron en las placas tratadas con cloroformo. Después de su solidificación, las placas se incubaron a 37°C por 24 h y se observó la presencia o no de halos de inhibición. Los halos de inhibición indicaron la actividad antimicrobiana de las cepas y su lectura se realizó con un pie de rey digital (Mitutoyo Corporation, Kawasaki, Japón). Al valor de los halos se le restó el diámetro del cultivo de las bacterias y se determinaron las diferencias entre medias.

Los datos del crecimiento microbiano en un medio con FRUCTOICA y del ensayo de actividad antimicrobiana se procesaron con el paquete estadístico InfoStat versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). La dócima de comparación múltiple de Duncan (1955) y la t-student se utilizaron, en los casos necesarios, para discriminar diferencias entre medias a $P < 0.05$. En el caso de los conteos de microorganismos, los datos no siguieron la distribución normal por lo que se transformaron según $\log X$.

Susceptibilidad a antimicrobianos. La susceptibilidad

was determined by the agar diffusion method with the use of antimicrobial discs, according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). The antimicrobials Ampicillin (10 µg), Chloramphenicol (30 µg), Clindamycin (2 µg), Erythromycin (15 µg), Gentamicin (10 µg), Kanamycin (30 µg), Nalidixic acid (30 µg), Streptomycin (10 µg), Tetracycline (30 µg), Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg) and Vancomycin (30 µg), were evaluated, which were selected according to the recommendations of the European Food Safety Authority (FEEDAP 2012). Active strains were cultivated in MRS medium incubated at 37 °C from 18 to 24 h. The test was carried out by duplicate and other lactic bacteria of *Lactococcus* and *Lactobacillus* genus, previously isolated and characterized, were used as controls (Pérez-Sánchez *et al.* 2011 and García-Hernández *et al.* 2016). The presence or absence of inhibition halos was considered as sensitivity or resistance, respectively.

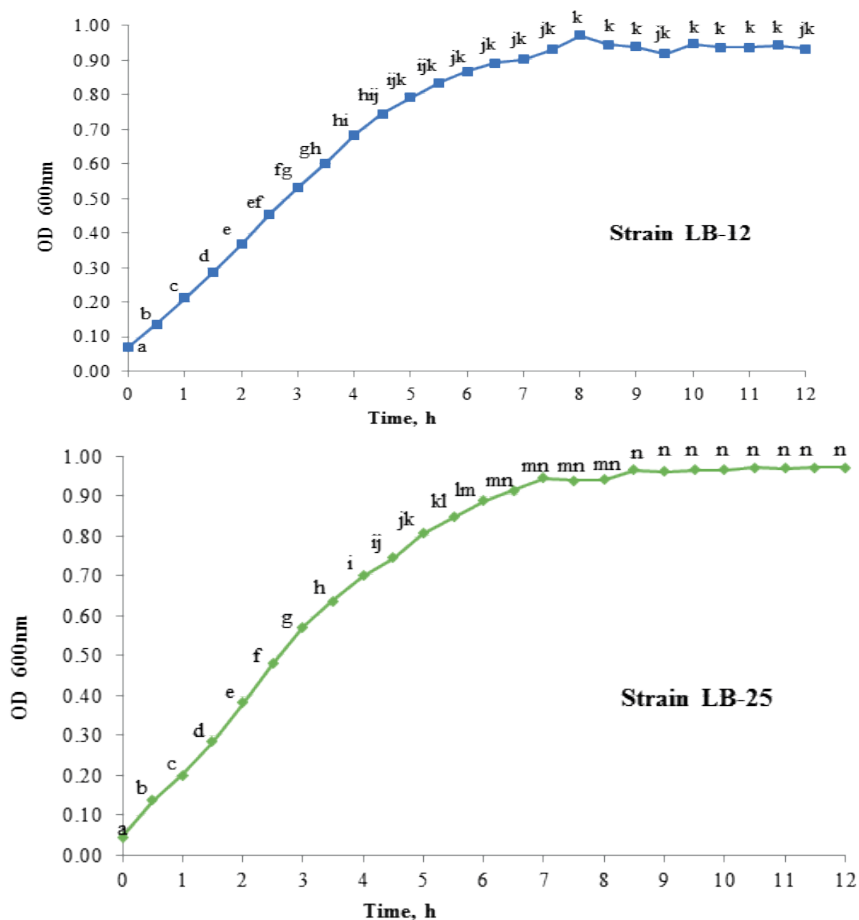
Results and Discussion

Growth dynamics of *P. pentosaceus* (LB-12 and LB-25) in MRS medium at 37 °C are shown in figure 1. Both strains had a similar performance and apparently, their adaptation phases are inferior to 0.5 h. From this time until approximately 4.0 h, the exponential stage was observed. Later, a deceleration phase and after

se determinó por el método de difusión en agar con el uso de discos de antimicrobianos, según la guía del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2012). Se evaluaron los antimicrobianos Ampicilina (10 µg), Cloranfenicol (30 µg), Clindamicina (2 µg), Eritromicina (15 µg), Gentamicina (10 µg), Kanamicina (30 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Estreptomycin (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) y Vancomicina (30 µg), que se seleccionaron de acuerdo con las recomendaciones de European Food Safety Authority (FEEDAP 2012). Las cepas activas se cultivaron en caldo MRS incubados a 37 °C de 18 a 24 h. El ensayo se realizó por duplicado y otras bacterias lácticas de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*, aisladas y caracterizadas previamente se utilizaron como controles (Pérez-Sánchez *et al.* 2011 y García-Hernández *et al.* 2016). La presencia o ausencia de halos de inhibición se consideró como sensibilidad o resistencia, respectivamente.

Resultados y Discusión

Las dinámicas de crecimiento de *P. pentosaceus* (LB-12 y LB-25) en caldo MRS a 37 °C se muestran en la figura 1. Ambas cepas tuvieron un comportamiento similar y al parecer sus fases de adaptación son inferiores a 0.5 h. A partir de este tiempo hasta aproximadamente las 4.0 h se observó la fase exponencial, posteriormente una fase de desaceleración y después de las 6 h de cultivo



a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n Means with different letters in each time differ at P < 0.05 (Kramer 1956)

Figure 1. Growth dynamics of *P. pentosaceus*, strains LB-12 (A) and LB-25 (B), in MRS medium at 37 °C.

6 h of cultivation, they reached the stationary stage. Table 1 shows growth characteristics of bacteria. The maximum growth speeds of strains were 0.5 h^{-1} and duplication times of 1.3 h, which is in correspondence with reports for lactic acid bacteria (Schepers *et al.* 2002).

alcanzaron la fase estacionaria. Las características del crecimiento de las bacterias se presentan en la tabla 1. Las velocidades máximas de crecimiento de las cepas fueron de 0.5 h^{-1} y los tiempos de duplicación de 1.3 h, lo que está en correspondencia con lo informado para las bacterias lácticas (Schepers *et al.* 2002).

Table 1. Growth characteristics of strains LB-12 and LB-25 in MRS medium at 37 °C.

Growth characteristics	Strains	
	LB-12	LB-25
Maximum speed of growth, h^{-1}	0.54 (0.12)	0.53 (0.02)
Duplication time, h	1.32 (0.32)	1.31 (0.04)
R ²	0.99	0.99

() Standard deviation values

Table 2 shows microbial concentration and pH values at 24 h of fermentation at 37 °C in MRS media and in MRS with FRUCTOICA (MRS-F) as energy source. There was interaction for these two indicators and it was observed that the two strains grew in the culture medium where glucose was replaced by fructans of *A. fourcroydes* up to concentrations of 10^7 and $10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$, with values lower than the control. The lowest concentration was obtained for strain LB-25 in the medium with fructans. Apparently, both strains are able to synthesize the enzymatic complex fructosyltransferase, which allows it to use the energy source, although they showed different performances in the presence of fructans. These variations could be associated to physiological characteristics of each strain under study despite coming from the same microbial species. In addition, it must be taken into account that these fructans have complex structures (García-Curbelo *et al.* 2015b) that are more difficult to degrade, so perhaps *Pediococci* would need better fermentation

En la tabla 2 se presenta la concentración microbiana y los valores de pH a las 24 h de fermentación a 37 °C en los medios MRS y MRS con FRUCTOICA (MRS-F) como fuente energética. Hubo interacción para estos dos indicadores y se observa que las dos cepas crecieron en el medio de cultivo donde se sustituyó la glucosa por fructanos de *A. fourcroydes* hasta concentraciones de 10^7 y $10^8 \text{ ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$, con valores inferiores al control. La menor concentración se obtuvo para la cepa LB-25 en el medio con fructanos. Al parecer ambas cepas son capaces de sintetizar el complejo enzimático fructosiltransferasa, lo que le permite utilizar la fuente energética, aunque presentaron comportamientos diferentes en presencia de los fructanos. Estas variaciones pudieran estar asociadas a las características fisiológicas de cada cepa en estudio a pesar de ser de la misma especie microbiana. Además, se debe tener en cuenta que estos fructanos tienen estructuras complejas (García-Curbelo *et al.* 2015b) que son más difíciles de degradar, por lo que quizás los *pediococos* necesitarían mejores condiciones de

Table 2. Microbial concentration and pH values at 24 h of fermentation at 37 °C in MRS medium and MRS with FRUCTOICA (MRS-F) as energy source

Strains	Culture media	*log $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)	pH
LB-12	MRS	8.37 ^c (2.35×10^8)	3.93 ^a
	MRS-F	8.13 ^b (1.35×10^8)	4.39 ^b
LB-25	MRS	8.42 ^c (2.66×10^8)	3.93 ^a
	MRS-F	7.98 ^a (9.67×10^7)	4.45 ^c
SE±. Sign		0.02 P=0.0008	0.01 P=0.0021

^{a,b,c,d} Means with different letters in each column differ at $P < 0.05$ (Duncan 1955) *Data were transformed according to $\log_{10}(X)$ because they do not follow a normal distribution

() means of the colony forming units per milliliters ($\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$)

conditions to achieve the results obtained with the control medium, especially strain LB-25. These aspects should be confirmed in further studies.

Table 2 shows that both strains of *Pediococcus* decreased the pH of the MRS medium in more than two units, without differences between strains. However, in the medium with fructans, the decrease was lower, despite the pH value of this medium before inoculation (5.74 ± 0.02) was lower than control medium (6.31 ± 0.02). This performance depended on the strain, because LB-25 had a lower variation of pH, which should be related to its growth ability in this medium with fructans and the concentration of fermentation metabolites. In addition, it is known that the metabolic profile of lactic acid bacteria may vary when different sources of nutrients or culture conditions are used (Papagianni 2012).

Nevertheless, it should be noted that the fact that both *Pediococcus* grow and produce metabolites of interest, when fructans of *A. fourcroydes* are used, it would be possible to include them in symbiotic formulations. In turn, symbiotics when added to the diet can exert synergistic effects by improving the survival, implantation and persistence of probiotic candidates in the gastrointestinal tract (Anadón *et al.* 2016) and, consequently, decrease the populations of pathogens.

Inhibitory activity of the candidate strains to probiotics have an important function in the competition with other microorganisms in the gastrointestinal tract, for their protection against pathogens (Abbasiliasi *et al.*, 2017). Table 3 shows that *P. pentosaceus* (LB-12 and LB-25) inhibited the growth of pathogenic bacteria populations used as indicators (*E. coli*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *S. flexneri*, *E. faecalis*, *S. sonnei* and *L. monocytogenes*). The activity against these last two pathogens differed among strains and was higher with LB-25. In all cases, except for LB-12 against *E. faecalis*, the inhibition halos were superior to 15 mm. Results indicate that inhibition or suppression of pathogenic microorganisms could be one of the action mechanisms of the candidates under study. This, in turn, could be related to their ability to produce lactic acid (13.35 and $11.83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively), previously determined by García-Hernández *et al.* (2016), which consequently would contribute to the improvement of intestinal health of the host. In addition, it is known that several strains of this species produce antimicrobial substances that could inhibit the growth of pathogenic bacteria (Martino *et al.* 2013 and Yasutake *et al.* 2016). This subject will be the subject of further research with strains LB-12 and LB-25.

Candidate bacteria to probiotic were sensitive to penicillin G, florfenicol, chloramphenicol, amoxicillin clavulanic acid and doxycycline. Likewise, they were resistant to Trimethoprine-Sulfamethoxazole,

fermentación para alcanzar los resultados obtenidos con el medio control, especialmente la cepa LB-25. Estos aspectos se deben corroborar en estudios posteriores.

En la tabla 2 se observa que ambas cepas de *Pediococcus* disminuyeron en más de dos unidades el pH del caldo MRS, sin diferencias entre cepas. Sin embargo, en el medio con fructanos la disminución fue menor, a pesar de que el valor de pH de este medio antes de la inoculación (5.74 ± 0.02) era inferior al medio control (6.31 ± 0.02). Este comportamiento dependió de la cepa, pues LB-25 varió menos el pH, lo que debe estar relacionado con su capacidad de crecimiento en este medio con fructanos y la concentración de metabolitos de la fermentación. Además, se conoce que el perfil metabólico de las bacterias ácido lácticas puede variar cuando se emplean diferentes fuentes de nutrientes o condiciones de cultivo (Papagianni 2012).

No obstante a lo anterior, se debe resaltar que el hecho de que ambos *Pediococcus* crezcan y produzcan metabolitos de interés, cuando se empleen los fructanos de *A. fourcroydes*, se posibilitaría su inclusión en formulaciones simbióticas. A su vez, los simbióticos al adicionarlos en la dieta pueden ejercer efectos sinérgicos al mejorar la supervivencia, implantación y persistencia de los candidatos probióticos en el tracto gastrointestinal (Anadón *et al.* 2016) y, consecuentemente, disminuir las poblaciones de patógenos.

La actividad inhibitoria de las cepas candidatas a probióticos desempeña una función importante en la competencia con otros microorganismos en el tracto gastrointestinal para su protección frente a patógenos (Abbasiliasi *et al.* 2017). En la tabla 3 se muestra que *P. pentosaceus* (LB-12 y LB-25) inhibió el crecimiento de las poblaciones de las bacterias patógenas empleadas como indicadoras (*E. coli*, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *S. flexneri*, *E. faecalis*, *S. sonnei* y *L. monocytogenes*). La actividad frente a estos dos últimos patógenos difirió entre cepas y fue mayor con LB-25. En todos los casos, excepto para LB-12 frente a *E. faecalis*, los halos de inhibición fueron mayores a 15 mm. Los resultados indican que la inhibición o supresión de microorganismos patógenos podría ser uno de los mecanismos de acción de las candidatas en estudio. Esto, a su vez, pudiera estar relacionado con su capacidad para producir ácido láctico ($13,35$ y $11,83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente), previamente determinada por García-Hernández *et al.* (2016), lo que consecuentemente contribuiría a la mejora de la salud intestinal del hospedero. Además, se conoce que varias cepas de esta especie producen sustancias antimicrobianas que pudieran inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas (Martino *et al.* 2013 y Yasutake *et al.* 2016). Este tema será objeto de investigaciones futuras con las cepas LB-12 y LB-25.

Las bacterias candidatas a probiótico fueron sensibles a penicilina G, florfenicol, cloranfenicol, amoxicilina ácido clavulánico y doxiciclina. A su vez, fueron resistentes al Trimetoprina-Sulfametoxazol, Cefalexina, Tetraciclina,

Cephalexin, Tetracycline, Vancomycin and the evaluated antibiotics of quinolone group (Nalidixic acid, Oxalinic acid, Enrofloxacin and Flumequine) and aminoglycosides (Streptomycin, Kanamycin and Gentamicin). This study is considered as very important according to Ocaña *et al.* (2006) and it is recommended to expand it in order to find resistance genes (FAO and WHO 2002). In addition, due to the importance of guaranteeing the safety of the use of *Pediococcus* strains in probiotic formulations, researches should be carried out to demonstrate their status of security, absence of resistance to acquired antibiotics and virulence factors, as well as cell viability in the products (Porto *et al.* 2017). These aspects will also be taken into account in subsequent researches.

Vancomicina y a los antibióticos evaluados del grupo de las quinolonas (Acido nalidíxico, Acido oxalínico, Enrofloxacina y Flumequine) y los aminoglucósidos (Estreptomicina, Kanamicina y Gentamicina). Este estudio se considera de gran importancia según Ocaña *et al.* (2006) y se recomienda ampliarlo para hallar genes de resistencia (FAO y WHO 2002). Además, debido a la importancia de garantizar la seguridad del uso de cepas de *Pediococcus* en formulaciones probióticas se deben realizar investigaciones que demuestren su estatus de inocuidad, ausencia de resistencia a antibióticos adquirida y factores de virulencia, así como la viabilidad celular en los productos (Porto *et al.* 2017). Estos aspectos también se tendrán en cuenta en investigaciones posteriores.

Table 3. Antimicrobial activity of *P. pentosaceus* LB-12 and LB-25 in front of pathogenic bacteria

Pathogenic bacteria	Lactic bacteria	Antimicrobial activity, mm	SE	P Value
<i>E. coli</i> ATCC 4238	LB-12	21.72	1.15	0.7268
	LB-25	21.11		
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	LB-12	29.14	0.54	0.0547
	LB-25	31.19		
<i>S. flexneri</i> LEFM	LB-12	27.28	1.14	0.4495
	LB-25	28.63		
<i>S. sonnei</i> ATCC 11060	LB-12	15.26	1.89	0.0211
	LB-25	25.09		
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	LB-12	26.37	1.29	0.0045
	LB-25	36.86		
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	LB-12	13.31	2.44	0.5811
	LB-25	15.38		

It is concluded that *P. pentosaceus* (LB-12 and LB-25) strains show, *in vitro*, potential as candidates for probiotic for their use in probiotic and symbiotic formulations intended for animal production.

Se concluye que las cepas *P. pentosaceus* (LB-12 y LB-25) presentan, *in vitro*, potencialidades como candidatas a probiótico para su uso en formulaciones probióticas y simbióticas destinadas a la producción animal.

Acknowledgements

Thanks to the financing of the Ministry of Science, Technology and Environment (CITMA) and the Ministry of Higher Education (MES) of Cuba. Also to the Spanish Agency of International Cooperation for Development (AECID) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES No. 664/2008). Gratitude is also expressed to the technical assistance of Nereyda Albelo, Odalys Núñez and MC Uriel and the collaboration of the Group of Mathematics of ICA in the processing of the experimental data.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA) y Ministerio de Educación Superior (MES) de Cuba. También a la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) y a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES No. 664/2008). Se expresa gratitud a la asistencia técnica de Nereyda Albelo, Odalys Núñez y MC Uriel y la colaboración del Grupo de Matemática del ICA en el procesamiento de los datos experimentales.

References

- Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Bashokouh, F., Ibrahim, T. A. T., Mustafa, S., Vakhshiteh, F., Sivasambo, S. & Ariff, A. B. 2017. "In vitro assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry". BMC Microbiology, 17: 121–131, ISSN: 1471-2180, DOI: 10.1186/s12866-017-1000-z, Available: <<https://doi.org/10.1186/s12866-017-1000-z>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Arés, I. & Martínez, M. A. 2016. "Prebiotics and Probiotics: An Assessment of Their

- Safety and Health Benefits”. In: Watson, R. R. & Preedy, V. R. (eds.), Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics, Academic Press, pp. 3–23, ISBN: 978-0-12-802189-7, DOI: 10.1016/B978-0-12-802189-7.00001-0, Available: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021897000010>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J. & Bryden, W. L. 2016. Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation. Makkar, H. P. S. (ed.), Rome, Italy: FAO, 179 p., ISBN: 978-92-5-09333-7, Available: <<http://www.fao.org/3/a-i5933e.pdf>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Bomba, A., Nemicová, R., Mudroňová, D. & Guba, P. 2002. “The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics”. Trends in Food Science & Technology, 13(4): 121–126, ISSN: 0924-2244, DOI: 10.1016/S0924-2244(02)00129-2, Available: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402001292>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Boyle, R. J., Robins-Browne, R. M. & Tang, M. L. 2006. “Probiotic use in clinical practice: what are the risks?”. The American Journal of Clinical Nutrition, 83(6): 1256–1264, ISSN: 0002-9165, 1938-3207, Available: <<http://ajcn.nutrition.org/content/83/6/1256>>, [Consulted: January 15, 2018].
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Second Informational Supplement. (ser. CLSI Document, no. ser. M100-MS19), Wayne, PA: CLSI, Available: <<http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-M100S22-susceptibility%20testing-2012-original.pdf>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Di Rienzo, J. A., Balzarini, M. G., Casanoves, F., González, L. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat. version 2012, [Windows], Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Duncan, D. B. 1955. “Multiple Range and Multiple F Tests”. Biometrics, 11(1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478, Available: <<http://www.jstor.org/stable/3001478>>, [Consulted: April 4, 2015].
- Endo, A. & Gueimonde, M. 2016. “Isolation, identification and characterisation of potential new probiotics”. In: Foerst, P. & Santivarangkna, C. (eds.), Advances in Probiotic Technology, Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp. 3–25, ISBN: 978-1-4987-3453-0.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) & WHO (World Health Organization) 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canada: FAO - WHO, 11 p., Available: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>, [Consulted: January 25, 2009].
- FEEDAP (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed) 2012. “Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance”. EFSA Journal, 10(6): 1–10, ISSN: 1831-4732, Available: <<http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/120323.pdf>>, [Consulted: January 15, 2018].
- García-Curbelo, Y., Bocourt, R., Savón, L. L., García-Vieyra, M. I. & López, M. G. 2015a. “Prebiotic effect of *Agave fourcroydes* fructans: an animal model”. Food & Function, 6(9): 3177–3182, ISSN: 2042-650X, DOI: 10.1039/C5FO00653H, Available: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/fo/c5fo00653h>>, [Consulted: January 15, 2018].
- García-Curbelo, Y., López, M. G., Bocourt, R., Collado, E., Albelo, N. & Nuñez, O. 2015b. “Structural characterization of fructans from *Agave fourcroydes* (Lem.) with potential as prebiotic”. Cuban Journal of Agricultural Science, 49(1): 75–80, ISSN: 2079-3480, Available: <<http://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/551>>, [Consulted: January 15, 2018].
- García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L., Nicolí, J. R., Moreira-Silva, J., Rodríguez, Z., Fuertes, H., Nuñez, O., Albelo, N. & Halaihel, N. 2016. “Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production”. Research in Veterinary Science, 108: 125–132, ISSN: 0034-5288, DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.08.009, Available: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528816302211>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Kramer, C. Y. 1956. “Extension of Multiple Range Tests to Group Means with Unequal Numbers of Replications”. Biometrics, 12(3): 307–310, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001469, Available: <<http://www.jstor.org/stable/3001469>>, [Consulted: December 24, 2017].
- Martino, M. E., Maifreni, M., Marino, M., Bartolomeoli, I., Carraro, L., Fasolato, L. & Cardazzo, B. 2013. “Genotypic and phenotypic diversity of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from food matrices and characterisation of the penicillin operon”. Antonie van Leeuwenhoek, 103(5): 1149–1163, ISSN: 0003-6072, 1572-9699, DOI: 10.1007/s10482-013-9897-1, Available: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-013-9897-1>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Ocaña, V., Silva, C. & Nader-Macias, M. E. 2006. “Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Vaginal Lactobacilli”. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology, 2006: 1–6, ISSN: 1064-7449, 1098-0997, DOI: 10.1155/IDOG/2006/18182, Available: <<http://www.hindawi.com/journals/idog/2006/018182/abs/>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Papagianni, M. 2012. “Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds”. Computational and Structural Biotechnology Journal, 3(4): e201210003, ISSN: 2001-0370, DOI: 10.5936/csbj.201210003, Available: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037014600593>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., García, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., Merrifield, D. L. & Ruiz-Zarzuola, I. 2011. “Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*”. Journal of Fish Diseases, 34(7): 499–507, ISSN: 1365-2761, DOI: 10.1111/j.1365-2761.2011.01260.x, Available: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2761.2011.01260.x/abstract>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M. & Oliveira, R. P. S. 2017. “*Pediococcus spp.*: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers”. Biotechnology Advances, 35(3): 361–374, ISSN: 0734-9750, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2017.03.004, Available: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975017300228>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. 2003. Microbiología. 4th ed., Madrid, España: McGraw-Hill, Interamericana, ISBN: 978-84-486-0261-1.

- SAS Institute Inc. 2013. Statistical Analysis Software SAS/STAT®. version 9.1.3, Cary, N.C., USA, Available: <http://www.sas.com/en_us/software/analytics/stat.html#>.
- Saura-Calixto, F. & Goñi, I. 2005. “Fibra dietética y antioxidantes en la dieta española y en alimentos funcionales”. In: Juárez, I. M., Olano, A. & Morais, F.-S. F., Alimentos funcionales, Madrid, España: Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, p. 310, ISBN: 978-84-689-4204-9.
- Schepers, A., Thibault, J. & Lacroix, C. 2002. “*Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis”. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2): 176–186, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00465-3, Available: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022901004653>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. 1965. “An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)”. *Biometrika*, 52(3/4): 591–611, ISSN: 0006-3444, DOI: 10.2307/2333709, Available: <<http://www.jstor.org/stable/2333709>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Tagg, J. R., Dajani, A. S. & Wannamaker, L. W. 1976. “Bacteriocins of gram-positive bacteria”. *Bacteriological Reviews*, 40(3): 722–756, ISSN: 0005-3678, Available: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413978/>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Yang, Y., Iji, P. A. & Choct, M. 2009. “Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics”. *World’s Poultry Science Journal*, 65(1): 97–114, ISSN: 1743-4777, 0043-9339, DOI: 10.1017/S0043933909000087, Available: <<https://www.cambridge.org/core/journals/world-s-poultry-science-journal/article/dietary-modulation-of-gut-microflora-in-broiler-chickens-a-review-of-the-role-of-six-kinds-of-alternatives-to-in-feed-antibiotics/7B00044BC5510B50273DCD20ABE16661>>, [Consulted: January 15, 2018].
- Yasutake, T., Kumagai, T., Inoue, A., Kobayashi, K., Noda, M., Orikawa, A., Matoba, Y. & Sugiyama, M. 2016. “Characterization of the LP28 strain-specific exopolysaccharide biosynthetic gene cluster found in the whole circular genome of *Pediococcus pentosaceus*”. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5: 266–271, ISSN: 2405-5808, DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.01.004, Available: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580816000054>>, [Consulted: January 15, 2018].

Received: October 11, 2017