

TRABAJO DE DIPLOMA



*Evaluación in vitro del potencial antimicrobiano del
PROBIOLACTIL® frente a microorganismos patógenos
causantes de la mastitis bovina.*

AUTOR: Daniela Estacholi Caraballo

TUTORES: Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. C. Aymara Luisa Valdivia Ávila.

Matanzas, 2023



UNIVERSIDAD DE MATANZAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA



TRABAJO DE DIPLOMA

**Evaluación *in vitro* del potencial antimicrobiano del
PROBIOLACTIL® frente a microorganismos patógenos
causantes de la mastitis bovina.**

AUTOR: Daniela Estacholi Caraballo.

TUTORES: Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo.

Dr. C. Aymara Valdivia Ávila.

Matanzas, 2023

PENSAMIENTO

La educación empieza con la vida, y no acaba sino con la muerte... la mente cambia sin cesar, y se enriquece y perfecciona con los años.

José Martí.

DECLARACIÓN DE AUTORIDAD

Declaro yo, Daniela Estacholi Caraballo, soy el único autor de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas para hacer uso del mismo con la finalidad que estime pertinente.

Firma.

DEDICATORIA

Primero que todo quiero dedicarle este trabajo de diploma a mis padres Loida Caraballo Jenks y Rafael Estacholi García que se han dedicado durante estos 4 años de carrera a apoyarme incondicionalmente en cada momento.

A mis tutoras Ana Julia Rondón y Aymara Valdivia Ávila por toda su paciencia y dedicación para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por su apoyo durante los 4 años de carrera.

A mis tutoras Ana Julia Rondón Castillo, Aymara Valdivia Ávila por la paciencia y el tiempo dedicado a la asesoría y revisión de este trabajo.

Al resto de los profesores de Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Matanzas.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

A mis compañeros de aula.

OPINIÓN DEL TUTOR:

La estudiante Daniela Estacholi Caraballo realizó el presente trabajo titulado Evaluación in vitro del potencial antimicrobiano del PROBIOLACTIL® frente a microorganismos patógenos causantes de la mastitis bovina. El mismo tiene gran novedad, ya que es la primera vez que este biopreparado se enfrenta a bacterias patógenas causantes de la mastitis. Los resultados de esta investigación son muy promisorios, ya que es la antesala de la evaluación del efecto del mismo como sellante del pezón de vacas en ordeño. Por otra parte, realizó la actualización de la ficha de costo del aditivo a escala de laboratorio con vista a realizar la transferencia de tecnología a la empresa LABIOFAM, Matanzas.

Durante todo este tiempo la estudiante ha manifestado gran interés, disciplina, dedicación e independencia en el desarrollo de toda la parte experimental. Se inició en el mismo como integrante o miembro del proyecto “Contribución al mejoramiento de la calidad de la leche en la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas”, del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas.

Durante este tiempo ha profundizado en sus conocimientos en diferentes ciencias como Microbiología, Zootecnia, Aditivos para la alimentación animal, Bioestadística y diseño experimental, así como aspectos de Economía agropecuaria. También ha adquirido habilidades en el trabajo de laboratorio y en la redacción de textos científicos con el uso de la información científico técnica y el empleo de la informática.

La estudiante ha mostrado mucha perseverancia para realizar el trabajo, algo que la caracteriza. Por este motivo le ofrecemos a este tribunal, todos los elementos para su evaluación satisfactoria.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del aditivo PROBIOLACTIL® frente a microorganismos patógenos causantes de la mastitis. Para ello se utilizaron las cepas patógenas aisladas de vacas con mastitis subclínica *Staphylococcus aureus* C1, *Staphylococcus* coagulasa negativo C7, *Corynebacterium spp.* C11 y *Escherichia coli*. Se desarrollaron dos ensayos con el empleo de las técnicas de difusión de sustancias en el agar y el establecimiento de cocultivos. Se actualizó además el costo estimado para la producción del biopreparado a escala de laboratorio. El biopreparado PROBIOLACTIL® inhibió a todas las cepas indicadoras. El microorganismo con mayor halo de inhibición fue *Staphylococcus* coagulasa negativo C7 (19,66 mm), el que fue utilizado para realizar los cocultivos. Consecutivamente se realizó un experimento con diseño completamente aleatorizado para la evaluación del efecto de este biopreparado en cultivos asociados. Se emplearon tres tratamientos 1. PROBIOLACTIL® (Control), 2. *Staphylococcus* coagulasa negativo (Control) 3. PROBIOLACTIL® + *Staphylococcus* coagulasa negativo. A partir de estos resultados se constató que el biopreparado probiótico impidió el crecimiento de la cepa patógena en el medio desde la hora 0 y se produjo la reducción de la población consecutivamente a las 24 horas. Se concluye que el biopreparado probiótico PROBIOLACTIL inhibe el crecimiento de cepas patógenas causantes de mastitis, por lo que resulta promisorio su evaluación como sellante del pezón en vacas en ordeño como alternativa al control de esta enfermedad. El costo de producción a escala de producción de 1 L del aditivo se estimó en 149,44 CUP.

ABSTRACT

The objective of this work was the in vitro evaluation of the antimicrobial activity of the additive PROBIOLACTIL[®] against pathogenic microorganisms that cause mastitis. For this purpose, pathogenic strains isolated from cows with subclinical mastitis were used: *Staphylococcus aureus* C1, coagulase-negative *Staphylococcus* C7, *Corynebacterium* spp. C11 and *Escherichia coli*. Two trials were developed using techniques of diffusion of substances in agar and the establishment of cocultures. The estimated cost for the production of the biopreparation on a laboratory scale was also updated. The PROBIOLACTIL[®] biopreparation inhibited all indicator strains. The microorganism with the largest zone of inhibition was coagulase-negative *Staphylococcus* C7 (19.66 mm), which was used to perform the cocultures. Consecutively, an experiment with a completely randomized design was carried out to evaluate the effect of this biopreparation on associated crops. Three treatments were used: 1. PROBIOLACTIL[®] (Control), 2. *Staphylococcus* coagulase negative (Control) 3. PROBIOLACTIL[®] + *Staphylococcus* coagulase negative. From these results, it was confirmed that the probiotic biopreparation prevented the growth of the pathogenic strain in the medium from hour 0 and the population reduction occurred consecutively at 24 hours. It is concluded that the probiotic biopreparation PROBIOLACTIL[®] inhibits the growth of pathogenic strains that cause mastitis, so its evaluation as a teat sealant in milking cows as an alternative to the control of this disease is promising. The cost of production on a scale production of 1 L of the additive was estimated at 149,44 CUP.

ABREVIATURAS Y SIGLAS.

MIC	Concentración Inhibitoria Mínima.
CCS	Conteo de Células Somáticas.
CMT	California Mastitis Test
ISAPP	Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos.
GOS	Galactooligosacáridos
FOS	Fructooligosacáridos
EC	Exclusión Competitiva
Ca	Calcio
Mg	Magnesio
Fe	Hierro
CEBIO	Centro de Estudios Biotecnológicos
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
FAO	Food and Agriculture Organization
OMS	Organización Mundial de la Salud.
CENLAC	Laboratorios de Ensayos para la Calidad de los Alimentos, CENSA
pH	Potencial de hidrógeno
UFC	Unidades formadoras de colonias
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
VC	Varianza compuesta
SC	Simetría compuesta
AR	Autoregresiva
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo
ARN	Ácido ribonucleico.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
TGI	Tracto genital inferior
ATP	Adenosín Trifosfato

Índice

INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
I.1 Mastitis. Concepto	4
I.2 Tipos de mastitis.....	4
I.3 Principales microorganismos productores de mastitis	6
I.4 Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis	7
I.5 Diagnóstico de la mastitis	8
I.6 Uso de nuevas alternativas para el control de la mastitis sin en el empleo de antibióticos.	9
I.7 Aditivos zootécnicos. Probióticos, prebióticos y simbióticos.....	10
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
II. 1 Elaboración del biopreparado	20
II. 2 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del probiótico PROBIOLACTIL® a partir del método de difusión de sustancias en el agar.....	22
II. 2.1 Tratamiento de las cepas indicadoras.....	22
II. 2.2 Desarrollo de la técnica de difusión en el agar	22
II.3 Determinación la acción antibacteriana del PROBIOLACTIL® frente a patógenos causantes de la mastitis por medio de cocultivos o cultivos asociados	22
II. 3 Determinación del costo de producción del biopreparado a escala de laboratorio.....	23
II.4 Análisis estadístico	23
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
III. 1 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana del biopreparado PROBIOLACTIL® frente a patógenos productores de mastitis bovina.....	24
III. 2 Efecto antimicrobiano de <i>L. salivarius</i> C65 por el método de cocultivo	29
III.3 Actualización del costo del biopreparado PROBIOLACTIL a escala de laboratorio	33
IV. CONCLUSIONES	35
V. RECOMENDACIONES.....	36
V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	37

Introducción

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina se define como la inflamación de la glándula mamaria caracterizada por cambios físicos y químicos en la leche y es causada por lesiones físicas, agentes químicos y por microorganismos, principalmente por varios tipos de bacterias, algunos hongos y micoplasmas; que provocan cambios patológicos en el tejido de la ubre de la vaca (Córdova *et al.*, 2018). Los microbios de la mastitis pueden clasificarse como patógenos mayores y menores, entre los que se incluyen *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* (Aguilar *et al.*, 2019).

Ashraf (2022); Imran (2022) plantean que los investigadores estudian continuamente ideas o métodos adecuados para el control de la mastitis. Las estrategias se centran principalmente en la prevención de enfermedades mediante el manejo de la granja, lo que incluye una higiene adecuada, personal capacitado para monitorear cambios menores en la ubre o la leche y el uso de métodos de prevención o diagnóstico para la aplicación de tratamiento.

Se considera que la mastitis es la enfermedad más cara en el ganado bovino a nivel mundial y afecta considerablemente la producción lechera. Se estima que dicha enfermedad representa el 70% de los gastos totales de la producción de leche, lo cual constituye una pérdida elevada cada año (Azooz *et al.*, 2020; González *et al.*, 2021).

González *et al.* (2021) mencionan que de todas las pérdidas atribuidas a la mastitis, la que más destaca y mayor rango tiene es la disminución de la producción de leche por la infección subclínica, ya que puede variar entre un 70 y 80% de pérdidas.

.Los estudios realizados en Cuba antes de 1990, indicaron pérdidas de 164 pesos/vaca/lactancia y reducción del 13% en la producción de leche (Ruiz *et al.*, 2016). Novoa *et al.* (2004) calcularon las pérdidas económicas y reportaron como principal causa, la reducción de la producción por la alta prevalencia de infecciones subclínicas; su estimado total fue de 454.44 pesos y 40.68 pesos en moneda libremente convertible por día.

Como problemática frecuente se encuentra la utilización de los antibióticos para el control de la mastitis, varios investigadores comprobaron que los microorganismos patógenos muestran resistencia a los mismos, de manera que en estos momentos se buscan nuevas alternativas más naturales para prevenir a estos gérmenes a través de productos naturales (El-Sayed *et al.*, 2021).

En Cuba actualmente se utiliza la PROPOLINA (solución hidroalcohólica de propóleo con acción antimicrobiana), sustancia empleada para el sellaje del pezón como paso final a la hora de ordeño; pero con el paso del tiempo, se comprobó que esta sustancia disminuyó su efectividad, pues los casos de mastitis siguen produciéndose continuamente. Se considera por numerosos especialistas la posibilidad de que los microorganismos infecciosos debieron adaptarse a la PROPOLINA, lo que contribuyó a la reducción de la sensibilidad de las bacterias patógenas a la acción bactericida de esta sustancia

En la literatura consultada se presentan trabajos del uso de otros productos naturales que podrían tener mayor estabilidad en su efecto, tal es el caso de los probióticos. Los probióticos son productos alternativos constituidos por microorganismos vivos que mejoran el equilibrio microbiano, el metabolismo y la integridad intestinal. En dosis adecuadas inhiben la colonización de microorganismos patógenos y estimulan las respuestas inmunológicas (Tellez *et al.*, 2023), Entre los microorganismos más utilizados como probióticos se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL) de los géneros *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium spp.* (Tellez *et al.*, 2023).

El Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas desarrolló un proyecto titulado “Contribución al mejoramiento de la calidad de la leche en la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas”. Dentro de sus tareas estaba la evaluación de diferentes biopreparados probióticos para emplearlos como sellante del pezón, pues se conoce que las bacterias que los conforman demostraron actividad antimicrobiana *in vitro* frente a diferentes microorganismos patógenos (Milián, 2009; Rondón, 2009). Entre estos aditivos zootécnicos se encuentra PROBIOLACTIL® (contiene la cepa *Lactobacillus salivarius* C65), el que se aplicó a diferentes animales de interés zootécnico, evidenciándose su potencial antimicrobiano al reducir a bacterias patógenas del tracto gastrointestinal

En la actualidad una de las tareas priorizadas por el CEBIO es la transferencia tecnológica de los aditivos probióticos a la Empresa LABIOFAM, por lo que se hace necesaria la actualización de la ficha de costo de PROBIOLACTIL® a partir del reordenamiento monetario realizado en el país, donde se refleje el precio actual de cada componente. De ahí que los resultados de este trabajo serían prometedores si se lograra aplicar este biopreparado como sellante del pezón para prevenir la mastitis y a la vez, sea un producto de bajo costo en la actualidad.

Problema:

La mastitis es una enfermedad causada por la presencia de microorganismos patógenos en la glándula mamaria de las vacas en ordeño, lo que provoca grandes pérdidas económicas; sin embargo, no se cuenta en el país con ningún producto natural eficaz que controle esta enfermedad en los animales.

Hipótesis

La evaluación *in vitro* del potencial antimicrobiano del PROBIOLACTIL® frente a microorganismos patógenos causantes de la mastitis bovina comprobará el potencial antibacteriano de este aditivo para utilizarse como sellante del pezón.

Objetivo general

Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de PROBIOLACTIL® frente a microorganismos patógenos causantes de la mastitis.

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antimicrobiana del PROBIOLACTIL® frente a microorganismos patógenos a través de la técnica de difusión de sustancias en el agar.
2. Determinar la acción antibacteriana del PROBIOLACTIL® frente a patógenos causantes de la mastitis por medio de cocultivos o cultivos asociados.
3. Actualizar la ficha de costo del biopreparado PROBIOLACTIL®.

Revisión Bibliográfica

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Mastitis. Concepto

La mastitis se conoce como una enfermedad multifactorial, su incidencia depende de la presencia de patógenos, de los mecanismos de defensa de la ubre y de la acción de factores ambientales. Se define como una inflamación de la glándula mamaria causada por muchas cepas de bacterias diferentes (cerca de 150 especies microbianas), así como por hongos como *Candida* spp. y algas como *Prototheca*. (Tomanić *et al.*, 2023).

Esta enfermedad frecuentemente tiene un origen infeccioso. Se considera un problema importante de salud pública que provoca disminución de la cantidad y calidad de la leche producida. (Valdivia *et al.*, 2022). Su presencia puede repercutir en todo el organismo debido a las alteraciones propias que provoca una infección- inflamación. (Aguilar *et al.*, 2019).

I.2 Tipos de mastitis

Kour *et al.* (2023) plantean que la mastitis se puede clasificar en diferentes categorías de acuerdo a los siguientes aspectos: duración, síntomas y agente patógeno.

Sin embargo, Córdova *et al.* (2018) sugieren que la mastitis de acuerdo a su curso clínico puede presentarse de dos formas; clínica y subclínica. La forma clínica se caracteriza por la presencia de síntomas como el aumento de volumen, cambio de color (enrojecimiento), aumento de la temperatura y dolor de la glándula mamaria y en ocasiones este cuadro clínico puede ir acompañado de algunos signos como falta de apetito, fiebre y decaimiento. Esta forma de mastitis tiene como característica que siempre está acompañada de cambios en la calidad de la leche, algunos pueden verse a simple vista y otros no. Entre los que se pueden observar a simple vista se encuentran la presencia de grumos y cambios de coloración; entre los que no se pueden apreciar se mencionan el aumento del contenido de bacterias, incremento de sal y plasmína, la cual es una enzima resistente a la pasterización y destruye a la proteína de la leche (caseína); así como disminución del contenido de lactosa y grasa, reduciendo de esta manera la calidad de la leche. La forma subclínica, se caracteriza porque no se presentan cambios aparentes en la ubre ni en la leche producida, no se observan signos del padecimiento, pero los agentes patógenos pueden estar

presentes en la leche provocando una alteración en su composición y el aumento del Conteo de Células Somáticas. En la figura 1 se muestran los tipos de mastitis, los principales microorganismos patógenos que inciden en esta infección, y las causas de esta enfermedad.

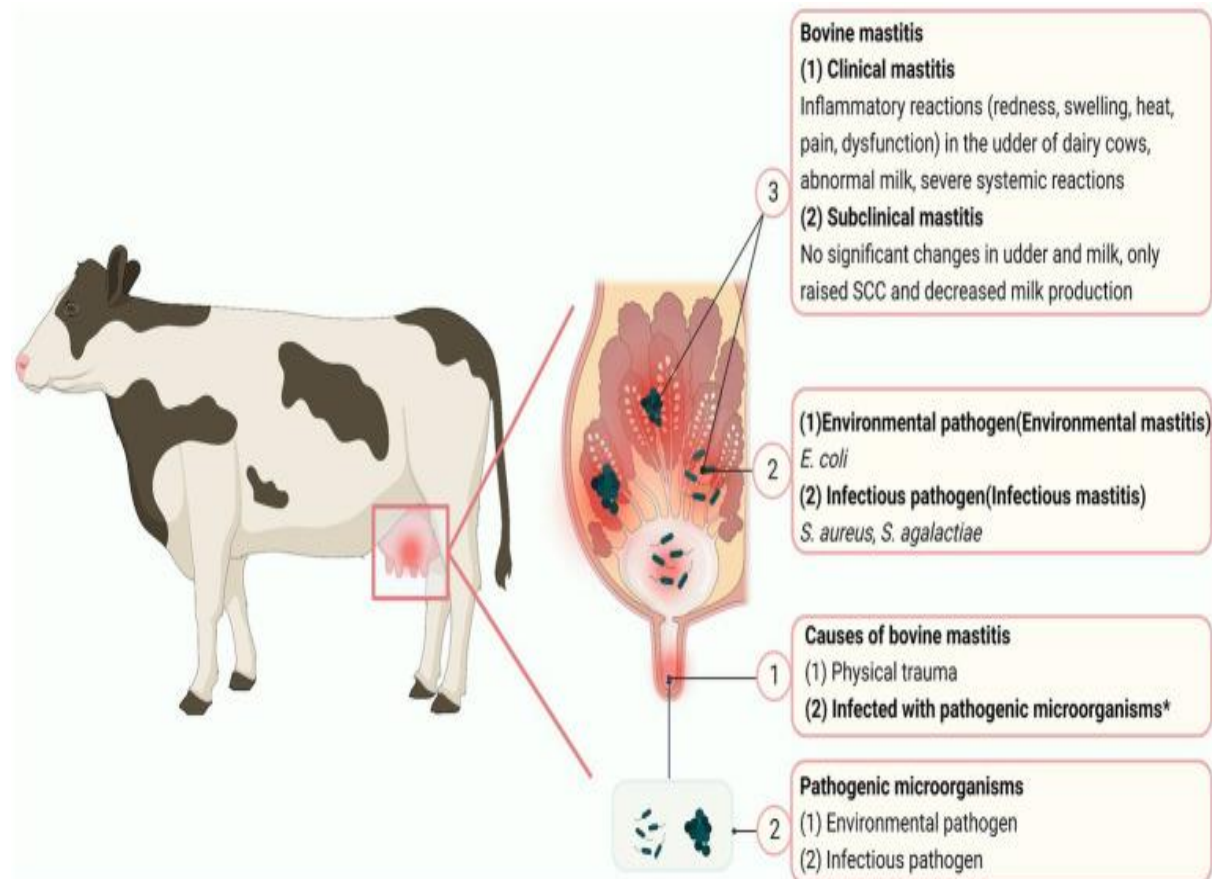


Figura 1. Principales tipos de mastitis, causas y microorganismos patógenos involucrados a esta enfermedad (Li *et al.*, 2023).

Varios trabajos se refieren a la presencia de numerosos factores de riesgo que favorecen la presentación de la mastitis bovina clínica y subclínica. Ruiz *et al.* (2016) hacen referencia a los trabajos de Soca *et al.* (2005) y Alfonso *et al.* (2008), quienes mencionaron entre los factores de riesgo para esta enfermedad; la incorrecta realización del despunte, no secar las ubras, la existencia de variación en el orden cronológico de las acciones de la rutina de ordeño, no desinfectar los pezones después del ordeño, que las vacas con mastitis subclínica no pasen al final del ordeño y el mal estado de las pezoneras (porosas, agrietadas y dilatadas). Mencionan también otros

factores como la presencia de patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (90 y 70%, respectivamente) en los hisopajes de las manos de los ordeñadores y las pezoneras.

I.3 Principales microorganismos productores de mastitis

Los microorganismos causantes de la mastitis subclínica más frecuentes son *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) y *Streptococcus* spp. Por lo tanto la presencia de animales que padecen mastitis subclínica y que se comportan como portadores de patógenos favorece la propagación de estos microorganismos a las ubres sanas dentro del rebaño y dificulta la prevención de la enfermedad (Kour *et al.*, 2023).

Kour *et al.* (2023) plantean que la mayoría de los casos de mastitis en todo el mundo tienen un origen bacteriano y son causados por especies como *S. aureus*, *Streptococcus dysagalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli* (*E. coli*). Los microorganismos que causan la mastitis, como *S. aureus*, *Strp. Agalactiae* y *Mycoplasma* spp, se propagan desde las ubres con mastitis a vacas sanas, principalmente a través de las manos de los ordeñadores y del equipo del ordeño. El ordeño mecánico actúa como reservorio y es una fuente de bacterias patógenas. La tabla 1 muestra los principales microorganismos patógenos contagiosos y ambientales que producen mastitis bovina, según Mera *et. al.* (2017).

Tabla 1. Patógenos contagiosos y ambientales productores de mastitis bovina. (Mera *et al.*, 2017).

Patógenos contagiosos	Patógenos ambientales
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Esherichia coli</i>
<i>Staphylococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
<i>Corynebacterium spp</i>	<i>Streptococcus dysagalactiae</i>
<i>Mycoplasma spp.</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
<i>Cándida albicans</i>	
<i>Prototheca zopfii</i>	

I.4 Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis

La mastitis es una enfermedad de alto incidencia en el ganado lechero que tiene su mayor impacto en la industria láctea, ya que influye en la calidad de este producto. Se considera que económicamente es un factor determinante para la rentabilidad de las granjas (González *et al.*, 2021).

Económicamente la mastitis subclínica es considerablemente más importante que la clínica por los siguientes motivos (González *et al.*, 2021).

1. Es más prevalente. En todo rebaño se manifiestan de 20 a 50 veces más casos de mastitis subclínica que clínica.
2. Su carácter inadvertido convierte a las vacas con mastitis subclínica en fuente de contagio desconocido, esto puede repercutir en el aumento del nivel de infección en el rebaño.
3. La respuesta inflamatoria de los cuartos afectados provoca un aumento del recuento de células somáticas (RCS) en la leche, lo que penaliza su precio e incluso puede imposibilitar la comercialización de la leche de todo el rebaño.
4. Se considera que el 70-80% de las pérdidas atribuibles a mastitis se deben a mastitis subclínica y solo el 20-30% a la clínica.

Andrade *et al.* (2017) consideran que entre las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad se destacan el desecho de la leche cuando se utilizan antibióticos para su tratamiento. Además, se conoce que la leche obtenida de los animales que padecen mastitis posee un elevado porcentaje de células somáticas, reduciendo su valor para la industria de manufactura del queso, yogur y otros derivados.

Según Guimaraes *et al.* (2017) en este análisis se deben tener en cuenta otros gastos en los que se incurren durante la presentación de la enfermedad como: los gastos para adquirir medicamentos utilizados en el tratamiento de los casos clínicos y los costos laborales relacionados con la aplicación de estas terapias, así como la disminución en el precio de venta de la leche y el posible sacrificio de vacas cuando sea necesario. Otro aspecto de gran importancia social a considerar está asociado a que los altos recuentos bacterianos que se encuentran en la leche de los animales que padecen esta enfermedad pueden poner en riesgo la salud de las personas si consumen leche no pasteurizada (Medrano *et al.*, 2021).

Investigadores han expuesto resultados sobre la pérdida en Cuba de producción ascendente a 33,2 L diarios en cuatro rebaños 192 animales en total y una media de producción de 3,5 L. (Ruiz *et al.*, 2016) menciona en su artículo que Relova, Armenteros y Capdevila (2008) calcularon pérdidas anuales ascendentes a \$11 059,5, para rebaño de 20 vacas, mediante Conteo de Células Somáticas (CCS) por microscopía óptica y basados en las mermas por leche dejada de producir.

I.5 Diagnóstico de la mastitis

La mastitis clínica se diagnostica cuando la respuesta inflamatoria del cuerpo es suficiente para cambiar la apariencia de la leche, la glándula mamaria o la de la vaca. La leche cruda tendrá un color marrón, negro o rojo y/o exhibirá una coagulación extensa, lo que la hará no apta para la venta y el consumo. En casos subclínicos, es posible que los cambios en la composición o apariencia de la leche no se detecten fácilmente, pero se puede incrementar el recuento de células somáticas lo que indica la presencia de una infección (Thompson *et al.*, 2023).

El incremento del número de células somáticas se encuentra estrechamente relacionado con la disminución de los contenidos de caseína, lactosa y grasa en la leche, el aumento de la actividad enzimática, el bajo rendimiento de la leche al elaborarse subproductos y su mala calidad. El incremento del número de células somáticas en la leche, se relaciona con el grado de severidad de la infección. El recuento de células somáticas se considera uno de los parámetros más importantes que permite determinar el estado sanitario de la glándula mamaria y la calidad de la leche producida (Morales, 2021). Se ha comprobado experimentalmente que los resultados de este parámetro tienen una alta relación con los resultados de la Prueba de California (Remón *et al.*, 2019).

Uno de los métodos más eficaces para el diagnóstico de la mastitis es el CMT (California Mastitis Test) (Maldonado *et al.*, 2022). Se recomienda su aplicación por ser un método sencillo y de fácil empleo en condiciones de campo (Valdivia *et al.*, 2021). Según Thompson *et al.*, (2023) esta técnica se usa comúnmente para la detección de mastitis subclínica en vacas. El reactivo CMT lisa los leucocitos, provocando la liberación de ADN que forma un gel. La cantidad de gelificación se corresponde con la cantidad de leucocitos dentro de la muestra de leche. Existen cinco

resultados para el CMT: negativo (aproximadamente 0 a 200 000 SCC), traza (150 000 a 500 000 SCC), + (400 000 a 1 millón de SCC), +2 (800 000 a 5 millones de SCC) y +3 (>5 millones de SCC).

Thompson *et al.* (2023) exponen que actualmente el diagnóstico de mastitis clínica incluye técnicas básicas como la palpación de ubres y pezones y la visualización de sangre, coágulos o escamas en la leche. En el caso de la mastitis subclínica se emplean técnicas más avanzadas que incluyen la utilización de métodos de cultivo en placa, determinaciones de pH, conductividad eléctrica, actividad enzimática, herramientas de diagnóstico molecular y biosensores.

En un intento por mejorar el diagnóstico de la enfermedad se usan técnicas moleculares (métodos genotípicos) para identificar el ADN bacteriano de muestras de leche. Se considera que la identificación de cepas mediante pruebas genotípicas es más reproducible y discriminatoria en comparación con el uso de métodos fenotípicos. Los modernos métodos de biología molecular ofrecen buenas herramientas para estudiar los aspectos epidemiológicos y de virulencia de las bacterias, lo que puede contribuir a desarrollar estrategias específicas para el control de la mastitis en los rebaños lecheros (Aguilar *et al.*, 2019).

I.6 Uso de nuevas alternativas para el control de la mastitis sin en el empleo de antibióticos.

La prevención de la mastitis consiste de manera general en mantener una buena higiene en los establos y granjas. También se debe garantizar el aseo de las ubres y su alrededor para evitar la proliferación de bacterias. Es necesario lograr el control de los patógenos contagiosos que consiste en implementar prácticas de ordeño higiénico, desinfección de pezones post-ordeño y terapia de vaca secas, mantener el adecuado funcionamiento del equipo de ordeño, descartar los animales con infección crónica, emplear la vacunación y dietas adecuadas (González *et al.*, 2021).

Existen diversas opciones para la prevención de la mastitis entre las que se encuentran las alternativas naturales. Aguirre *et al.*, (2022) plantean que en un estudio realizado por Serunkuma *et al.*, (2020), fueron seleccionadas cuatro especies de plantas (*Acacia nilotica* (corteza y hojas), *Aloe arborescens* (hojas), *Tetradenia riparia* (flores hojas) y *Crassula multicaeva* (planta entera), con el objetivo de evaluar su actividad

antimicrobiana contra un grupo de microorganismos causantes de mastitis. Con este fin se realizó un ensayo de microdilución en serie para evaluar los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada uno de los extractos vegetales que se prepararon. Se concluyó, que los extractos de *A. arborescens* y *C. multicava* no tuvieron una actividad antimicrobiana satisfactoria contra las especies bacterianas estudiadas, pero *A. nilotica* y *T. riparia* demostraron una actividad prometedora.

Kovacević *et al.* (2021) reconocen a los aceites esenciales (AE) como una posible sustitución o adición a la terapia con antibióticos convencional debido a su seguridad y características farmacológicas. Numerosos estudios han demostrado los efectos antimicrobianos *in vitro* de los AE contra los patógenos comunes de la mastitis. Además, se han realizado experimentos *in vivo* que muestran la eficacia de estos productos en el tratamiento de la mastitis al mejorar la condición de la ubre, reducir el número de células somáticas y eliminar la infección intramamaria.

En otra investigación se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes concentraciones de quitosana frente a bacterias causantes de mastitis subclínica. Comprobándose que la cepa de *Staphylococcus aureus* empleada para este estudio resultó sumamente sensible a una de las concentraciones aplicadas (Díaz, 2022).

Fernández-León (2022) consideran que el empleo de soluciones de propóleo para combatir microorganismos permite contar con productos naturales e inocuos que podrían emplearse para combatir bacterias resistentes a los antibióticos. Recientemente se demostró la efectividad *in vitro* de varias concentraciones de Propolina frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas causantes de mastitis. Las soluciones de este producto mostraron una mayor actividad contra las bacterias gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus* sp. Coagulasa negativa (Valdivia *et al.*, 2022).

I.7 Aditivos zootécnicos. Probióticos, prebióticos y simbióticos. Conceptos

Los aditivos zootécnicos se han utilizado principalmente para mejorar el rendimiento productivo de los animales y disminuir los costos de producción. En esta clasificación se incluyen los probióticos, prebióticos, los extractos vegetales y los preparados enzimáticos (Valdivia *et al.*, 2019).

Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, son beneficiosos para la salud del hospedero. Los *Lactobacilos*, junto con las especies de *Bifidobacterium*, han sido históricamente utilizados como probióticos comunes. En este análisis se debe tener en cuenta que en el año 2020 se revisó la clasificación taxonómica de *Lactobacillus* como resultado de la misma se definieron 23 nuevos, algunos con especies probióticas bien estudiadas (Guarner *et al.*, 2023). En la tabla 2 se recogen los nuevos nombres para algunas antiguas especies probióticas de *Lactobacillus*.

Según la definición emitida en el 2002 por los expertos del grupo de trabajo de la FAO y la OMS se establece como probióticos a las cepas vivas de microorganismos estrictamente seleccionados que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para el hospedador. Esta definición fue refrendada en 2013 por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), considerando que el termino probiótico está reservado para fórmulas o productos que cumplen con criterios estrictamente definidos. (Markoswiak *et al.*, 2019).

Tabla 2. Nuevos nombres para algunas antiguas especies probióticas de *Lactobacillus* (Guarner *et al.*, 2023).

Nombre anterior	Nuevo nombre
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus rahmnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rahmnosus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lacticaseibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lacticaseibacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lacticaseibacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lacticaseibacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Lacticaseibacillus reuteri</i>

Prebióticos

Son sustancias no digeribles por enzimas digestivas siendo fermentadas selectivamente por los probióticos, incluyendo ciertos microorganismos en la microbiota, favoreciendo así el crecimiento de bacterias beneficiosas. Esto origina cambios específicos en la composición y/o actividad de la misma, generando beneficios al huésped (Manivel *et al.*, 2020).

Ahora, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos ha introducido una nueva definición de prebióticos como “un sustrato que es fermentado selectivamente por la microflora intestinal y otorga beneficios para la salud del huésped” (Roy *et al.*, 2023).

(Manivel *et al.*, 2020) mencionan que los prebióticos más conocidos son:

- Oligosacáridos (fructooligosacáridos, FOS).
- Inulina.
- Galactooligosacáridos (GOS).
- Lactulosa.
- Oligosacáridos de la leche materna (oligosacáridos de la leche humana).

Simbióticos

Son productos que contienen tanto probióticos como prebióticos. El prebiótico favorece el crecimiento del probiótico, asegurando su viabilidad y potencializando sus propiedades. Un simbiótico debe reunir las siguientes características: ser de origen natural, aislados y purificados por métodos no desnaturalizantes, demostrar un efecto beneficioso superior al de sus componentes de forma individual, mejorar una o más funciones fisiológicas y actuar de forma preventiva/o curativa (Manivel *et al.*, 2020).

Bacardi, (2020) menciona que en el 2020 se actualizó la definición de simbióticos, refiriéndose a los mismos como una mezcla de microorganismos y sustratos selectivamente utilizados por los microorganismos, que confiere beneficios saludables al huésped. Esta definición incluye a los simbióticos en dos grupos: autóctonos (residentes o colonizadores del cuerpo) y microorganismos alóctonos (externamente aplicados, como los probióticos).

De acuerdo a Borges (2021) se distinguen dos tipos de simbióticos (figura 2).

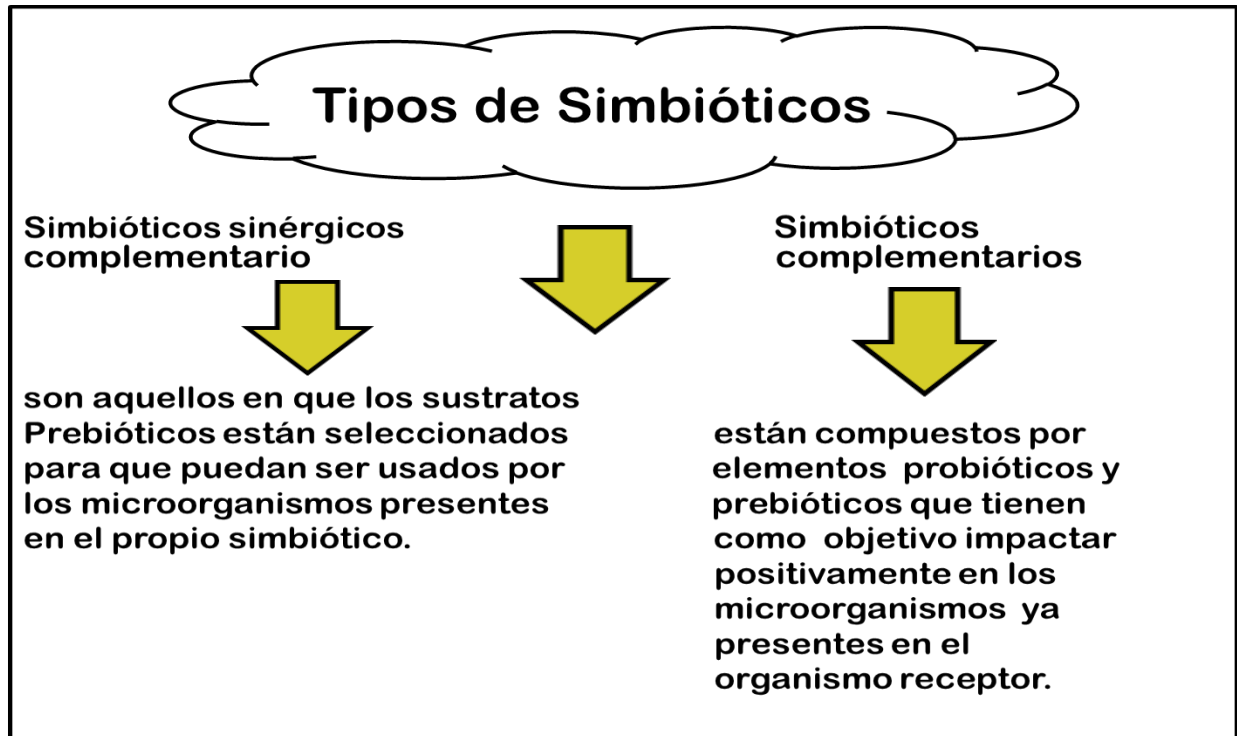


Figura 2. Tipos de simbióticos y sus características (Borges, 2021).

Modo de acción de los probióticos:

Los modos de acción de los probióticos pueden variar en función del microorganismo utilizado (género, especie y cepa). Entre los numerosos modos de acción de los probióticos se encuentran: regulación de la microbiota, barrera contra microorganismos patógenos/oportunistas, antagonismo frente a patógenos, fortalecimiento de la barrera intestinal y aumento de producción de mucosa intestinal. (Manivel *et al.*, 2020).

Bloquear los efectos patógenos de las bacterias: Los probióticos inhiben o disminuyen el crecimiento de otras bacterias mediante la exclusión competitiva (EC), modificación del ambiente bacteriano y secreción de bacteriocinas. La EC consiste en que las bacterias deben competir por los receptores ubicados en la célula del intestino del huésped para adherirse a la mucosa y atenuar la colonización de bacterias patógenas. También cambian el medio ambiente produciendo ácido láctico y ácido acético, lo que disminuye el pH intracelular del enterocito. (Camacho *et al.*, 2023).

Camacho *et al.* (2023) consideraron además que existe otras forma para que los probióticos bloqueen los efectos de los patógenos que consisten en: la producción de bacteriocinas, péptidos antibacterianos sintetizados en el ribosoma, que inhiben el crecimiento de los patógenos entéricos mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática de la bacteria y agregación de péptidos, además de la disminución de la síntesis de la pared celular.

Otro mecanismo de acción de los probióticos es el mantenimiento de un equilibrio saludable de bacterias en el intestino por exclusión competitiva, es decir, en un proceso mediante el cual las bacterias beneficiosas excluyen a las bacterias potenciales a través de la competencia vía sitios de adherencia en los intestinos y los nutrientes (Tellez *et al.*, 2023).

Pérez *et al.* (2020) en su trabajo plantea que los probióticos influyen en el ecosistema intestinal al afectar los mecanismos inmunológicos de la mucosa, interactuando con microorganismos comensales o potencialmente patógenos, generando productos metabólicos finales, como ácidos grasos de cadena corta, y comunicándose con las células del huésped utilizando señales químicas.

Los probióticos participan en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas agudas digestivas, actúan sobre la función inmune del huésped y la homeostasis intestinal, y pueden modular la microbiota intestinal (Pérez *et al.*, 2020).

Modo de acción de los prebióticos

Los modos de acción de los prebióticos se definieron por (Tellez *et al.*, 2023)

1. Los prebióticos pueden ayudar a las bifidobacterias y los lactobacilos a proliferar en el intestino, mejorando el equilibrio microbiano del huésped.
2. La microbiota intestinal saludable puede aumentar la absorción, el metabolismo de las proteínas, el metabolismo energético, la digestión de la fibra.
3. Efectos metabólicos: producen ácidos grasos de cadena corta, absorben iones (Ca, Fe, Mg).
4. Mejoran la inmunidad del hospedero.

Estos afectan a las bacterias intestinales aumentando el número o las actividades de las bacterias beneficiosas, que tiene como resultado la disminución de la población de microorganismos potencialmente patógenos o la reducción de las actividades

metabólicas perjudiciales de la microbiota del hospedero. Los prebióticos también pueden influir en la función inmunitaria (Guarner *et al.*, 2023).

Otros autores plantan que los AGC producidos por los prebióticos aceleran el proceso de regeneración y curación de la célula epitelial intestinal; aumentan la producción de moco, mantienen el pH correcto en el intestino, incluso inhiben la unión de microbios patógenos a los enterocitos. Un ejemplo de ello es el acetato que se usa comúnmente como combustible celular para desarrollar músculo y tejido colónico, por otro lado el butirato mejora el metabolismo y promueve acciones antiinflamatorias (Roy *et al.*, 2023).

Modo de acción de los simbióticos

Acción mediante la mejora de la viabilidad de los microorganismos probióticos

Los simbióticos desencadenan una reducción de la concentración de metabolitos indeseables, así como una inactivación de nitrosaminas y sustancias cancerígenas. El uso de estos productos permite un aumento significativo de los niveles de ácidos grasos de cadena corta, cetonas, disulfuros de carbono y acetatos de metilo, lo que puede tener un efecto positivo en la salud del huésped (Cucalón *et al.*, 2020).

Algunos autores como Gao *et al.* (2020) combinaron la acción de *Lactobacillus* con levaduras, las que presentan oligosacáridos de glucano y manano en sus paredes para estimular el sistema de vacas con mastitis. Según el análisis de muestras de leche, la suplementación del simbiótico disminuyó la abundancia de *Enterococcus* y *Streptococcus*, identificados como patógenos causantes de mastitis. Los resultados sugirieron el potencial de las BAL (probióticos) y paredes celulares de levaduras (prebióticos) para prevenir la mastitis al aliviar la inflamación de la glándula mamaria y regular los microorganismos de la leche.

de la Cruz & Gilleard (2020) evaluaron la influencia de un agregado con características probióticas y prebióticas (simbiótico) sobre la glándula mamaria en vacas lecheras, a partir del recuento de células somáticas. Estos autores concluyeron que el empleo de estos simbióticos influye positivamente en el control de la mastitis en vacas lecheras de alta producción, ya que representó un impacto positivo en los cambios del recuento de células somáticas y una mejoría en la calidad de la leche.

I. 9 PROBIOLACTIL, biopreparado probiótico con acción antimicrobiana

El biopreparado PROBIOLACTIL® está constituido por *Lactobacillus salivarius* C-65, una bacteria en forma de bacilo gran positivo, anaeróbica facultativa (Rondón, 2009). Es un microorganismo con la capacidad de regula la microflora intestinal y modula el sistema inmunológico, además puede actuar como un probiótico potencial para mejorar el rendimiento, la microbiota fecal, la capacidad antioxidante y las respuestas inmunológicas de los animales (Liu *et al.*, 2023). En la figura 3 se muestran las características morfológicas de esta cepa.

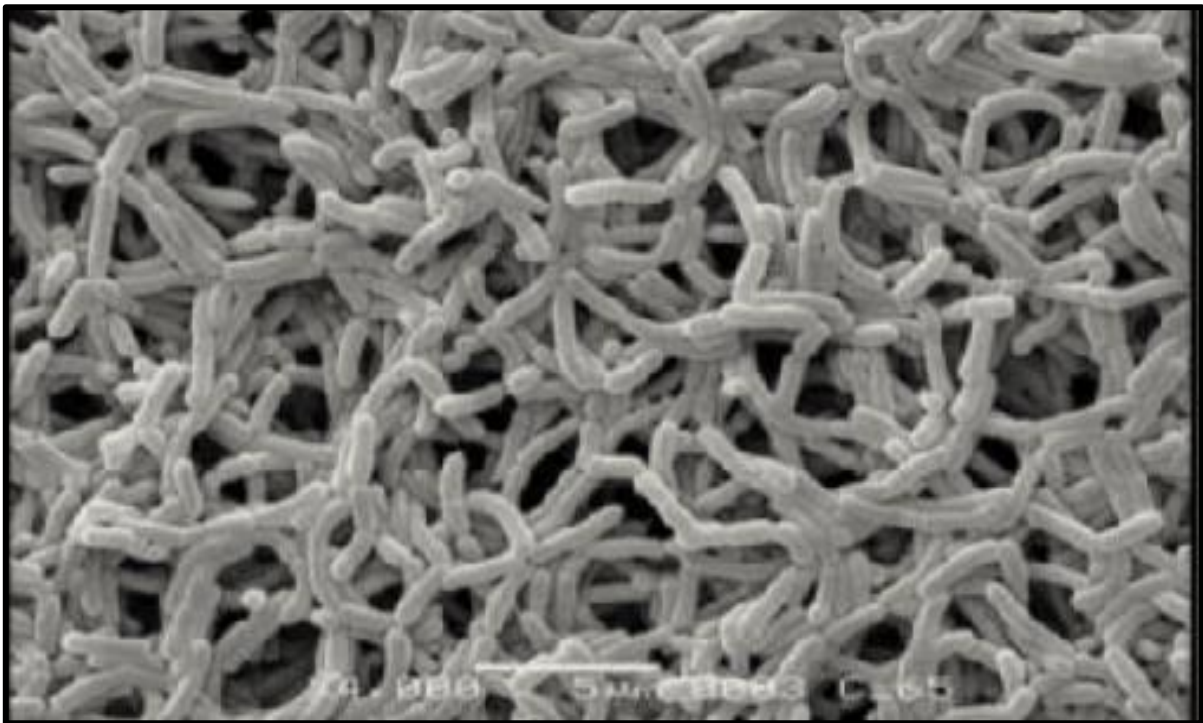


Figura 3 Microfotografía electrónica de la morfología bacteriana de la cepa *Lactobacillus salivarius* C65 (x4000). (Fuente: Rondón, 2009).

Lactobacillus salivarius, es capaz de colonizar el tracto digestivo del hombre y los animales, resiste las barreras gástricas de pH ácido orgánicos y bacteriocinas que inhiben diferentes microorganismos patógenos. Esta bacteria se adhiere a las células epiteliales y estimula el sistema inmune. Por estas razones, son diversas las investigaciones que se realizan con el propósito de evaluar su efecto en monocultivos

o multicepas, en indicadores microbiológicos, fisiológicos, productivos y de salud en animales de interés zootécnico (Rondón *et al.*, 2020).

González *et al.* (2019) expresa que según Riboulet *et al.* (2012) la especie *Lactobacillus salivarius* es un organismo homofermentativo (solo produce un subproducto del metabolismo-ácido láctico) que se encuentra naturalmente en las cavidades orales de los humanos y animales, los intestinos y la vagina. Se considera no patógena y se utiliza a veces para producir ácido láctico en los alimentos fermentados.

Rondón *et al.* (2020) plantean en su artículo que Flores (2015) evaluó el efecto de un probiótico en indicadores productivos y de salud en terneros lactantes de la raza Mambí en Cuba. El aditivo (PROBIOLACTIL®) se elaboró con la cepa *Lactobacillus salivarius* y se emplearon terneros entre 7 y 9 de nacidos. Los terneros que consumieron el biopreparado manifestaron menor incidencia de diarreas y enfermedades parasitarias. Además, se observaron mejoras ($P \leq 0,05$) en el incremento de peso vivo con respecto al grupo control.

En otro artículo del mismo año Rondón *et al.* (2020) evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* C-65 y su efecto en indicadores productivos y de salud de terneros lactantes. Para ello se determinó a nivel de laboratorio la fermentación de carbohidratos y la producción de enzimas específicas mediante las galerías API 50 CH y API 50 CHL y API-ZYM y se valoró la capacidad de crecimiento y la actividad fermentativa de esta cepa en el lactoreemplazante RALTEC Milk 17-1 en 10 horas. Como consecuencia se observa que los terneros que consumieron dos dosis de PROBIOLACTIL® mostraron diferencias ($P < 0,05$) incremento en su peso (8 vs 16 kg) y la ganancia media (163 VS 326 g), por lo que se puede apreciar el efecto probiótico en los indicadores productivos y de salud.

Tello *et al.* (2021) plantean que Casey *et al.* (2007) informaron que al suministrar una mezcla de cepas de *L. murinus*, *L. salivarius*, *L. pentosus* y *Pediococcus pentosaceus* a lechones destetados produjo menor incidencia, severidad y duración de diarreas.

El biopreparado *L. salivarius* influyó en el incremento del peso vivo de los cerdos. Se conoce que los microorganismos que residen en el tracto gastrointestinal interactúan con el hospedero. Esta microbiota varía con la especie animal, el sitio del sistema

digestivo donde se aloja, la edad, la dieta que consume y el ambiente. (Tello *et al.*, 2021).

Liu *et al.* (2022) en su estudio expone los resultados de la investigación sobre los efectos del suplemento SNK-6 de *Lactobacillus salivarius* sobre el rendimiento de la postura, la expresión de genes relacionados con el sistema inmunológico en la amígdala cecal y la composición microbiana cecal de las gallinas ponedoras. Primero 384 gallinas comerciales negras Xinyang (55 semanas de edad) fueron asignadas aleatoriamente a tres grupos bajo los mismos regímenes de cría y dieta: dieta basal (Con), grupo bajo en *L. salivarius* (T1:1,0 x 10⁶ UFC/g), y el grupo SNK-6 alto de *L. salivarius* (T2:1,0⁷ UFC/g). Esta investigación demostró que las respuestas inmunes innatas mediadas por TLR (p. ej., TLR-6, MyD88, NF-KB, IL-1β, IL-10, IL-12) y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (p. ej., MHC-II, CD80, CD86, CD40, CD40L y CD28) se activaron significativamente en la amígdala cecal, lo que indica que una dosis más baja de *L. salivarius* podría activar las respuestas inmunitarias de la mucosa intestinal.

Otros investigadores realizaron trabajos para evaluar la calidad nutricional de las semillas de caupí (cv. Doljana- CSD) y el impacto de la sustitución parcial de la harina de soja por CSD, junto con la suplementación de *Lactobacillus salivarius* sobre el rendimiento del crecimiento, rasgos seleccionados de la canal, poblaciones microbianas en los ciegos y excrementos de pollos de engorde de 1 a 35 días. El diseño experimental presentó un arreglo de 2 x 2, con dos niveles de caupí (CSD0 y CSD15%) y la presencia (Si/No) de probiótico LS microencapsulado (0 y 1 g/kg de alimento). En cuanto a las características de la canal, el grupo CSD15 con suplementación con *Lactobacillus salivarius* exhibió mayores porcentajes de aderezo (70.69%) e hígado (2.47%) en comparación con otros grupos. Las bacterias beneficiosas, específicamente *Lactobacillus* spp., aumentaron significativamente en el contenido cecal de los grupos CSD0 (9.06 UFC/g y CSD15 (9.01 UFC/g) con LS en comparación con CSD0 (8.41 UFC/g y CSD15 (8.11 UFC/g) sin LS. Izquierdo *et al.*, 2023).

Babot *et al.* (2018) mencionan la utilización de *Lactobacillus salivarius* en formulaciones con probióticos multicepas. En su estudio mezclaron *Lactobacillus*

LET201, *Lactobacillus reuteri* LET210. *Enterococcus faecium* LET301 y *Bifidobacterium infantis* CRL1395 para su aplicación en pollos de engorde. Concluyeron que la combinación de estas cepas fue efectiva en la protección de las células epiteliales de la citotoxicidad procedente de la mezcla de aglutinina de soya, aglutinina de germen de trigo y concanavalina A.

Estudios realizados por Aleksandrzak- Piekarezyk (2019) inyectaron *in ovo* biopreparados de *Lactobacillus plantarum* IBB3036 y *Lactobacillus* IBB3154 en huevos fertilizados de gallinas Cobb500, y evaluaron la permanencia de estas bacterias en el TGI de los pollos mediante la técnica de PCR. Estos autores comprobaron que *L. salivarius* incrementó su población de forma significativa en el intestino de los pollos, mientras que *L. plantarum* decreció gradualmente en este ecosistema.

Rondón *et al.* (2019) utilizaron pulpa de henequén (rica en inulina) con la adición de miel final como fuente de azúcares reductores; hidrolizado de levaduras, como fuente de nitrógeno y PROBIOLACTIL[®], como inóculo para la suplementación de *Lactobacillus salivarius*. Este biopreparado simbiótico se suministró en terneros durante la etapa de destete en recría. Se demostró que la aplicación del aditivo mejoró los indicadores de peso y conservación alimentaria. De igual modo, el aditivo incidió en la salud de los animales al disminuir la ocurrencia de diarreas desde las primeras semanas del experimento. Estos resultados demuestran que esta bacteria, también se puede utilizar en el tratamiento de residuos agroindustriales para su uso como alimento animal, pues mejora la calidad nutricional, digestibilidad y conservación de los mismos. En un estudio realizado por Sureshkumar *et al.* (2021) se evaluó el efecto de la administración oral de *Lactobacillus salivarius* (*L. salivarius*) sobre el crecimiento, las respuestas inmunológicas, la flora microbiana fecal y la morfología de la mucosa intestinal en pollos, los cuales fueron alimentados con 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) de *L. salivarius* de tipo salvaje (WT) o solución salina de tamponada con fosfato (PBS) durante 5 semanas. El peso corporal de los pollos aumentó significativamente con la administración de *L. salivarius* a los grupos en comparación con el grupo de control.

Materiales y métodos

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. 1 Elaboración del biopreparado

A partir de la metodología descrita por Rondón (2009) para la producción del PROBIOLACTIL[®], se obtuvo el biopreparado, el que se conservó en refrigeración a 4°C hasta su utilización. En las figuras 4 y 5 se aprecian cada uno de los pasos a seguir para la preparación del inóculo y del biopreparado PROBIOLACTIL[®]. La cepa *Lactobacillus salivarius* C-65 que se empleó es procedente del cepario del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas.

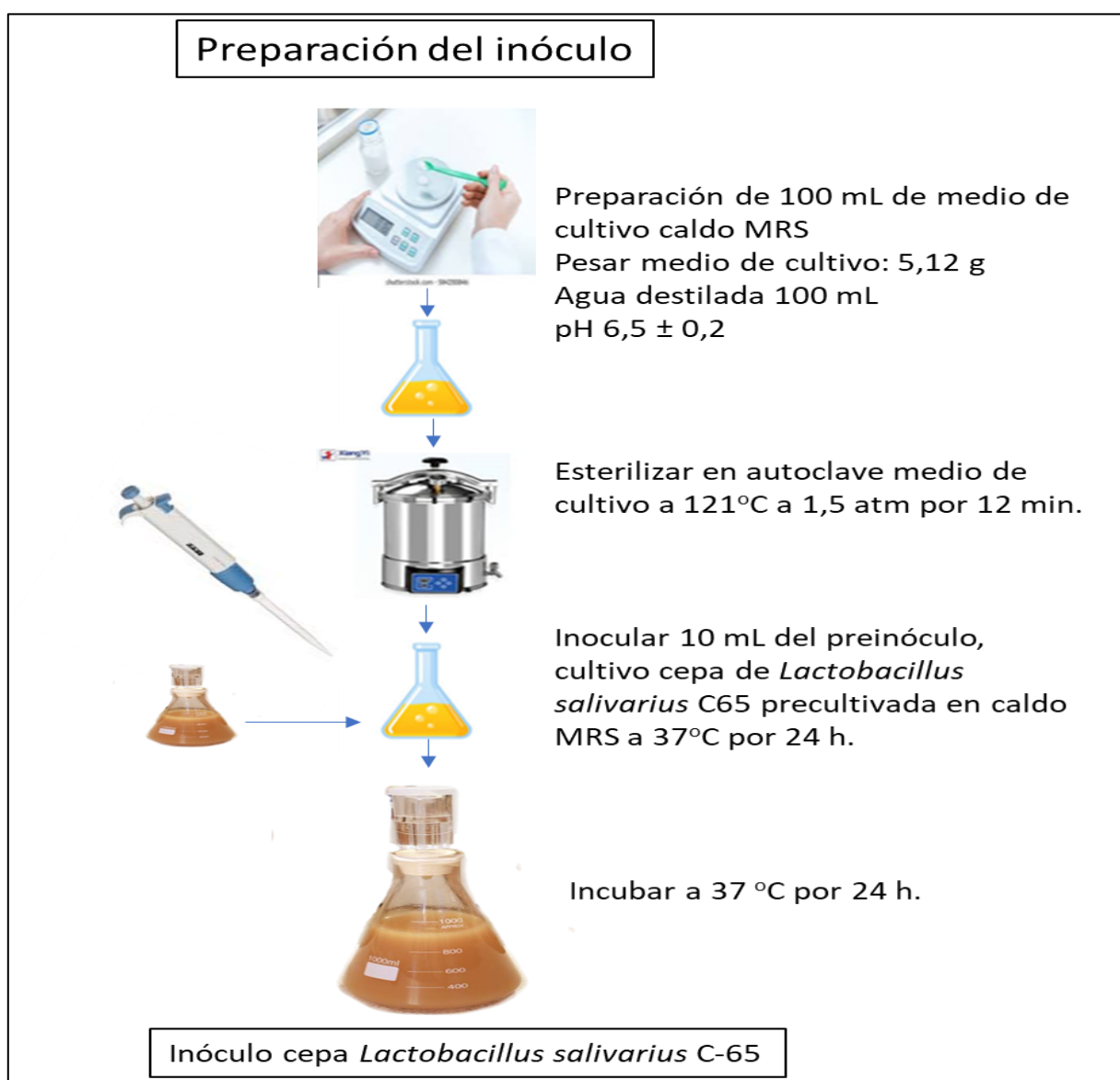


Figura 4. Preparación del inóculo con la cepa *Lactobacillus salivarius* C-65.

Elaboración del biopreparado

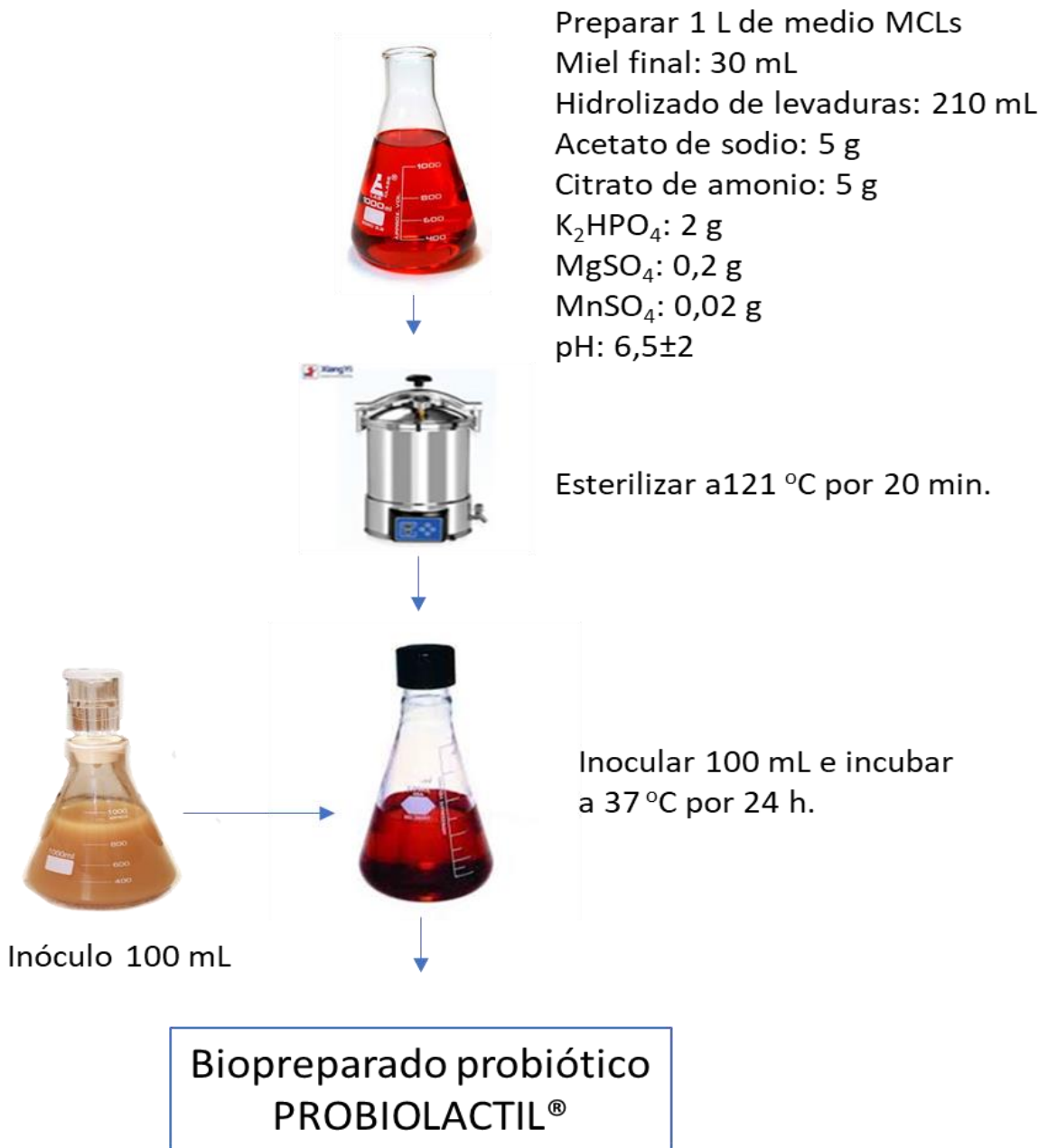


Figura 5. Procedimiento para la obtención del biopreparado probiótico PROBIOLACTIL®.

II. 2 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del probiótico PROBIOLACTIL® a partir del método de difusión de sustancias en el agar

Para evaluar la actividad antibacteriana del PROBIOLACTIL® se empleó la técnica de difusión de sustancias en agar, propuesta por Schillinger y Lucke (1989). Para ello se montó un experimento con diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos: 1. PROBIOLACTIL® + *Staphylococcus aureus*; 2. PROBIOLACTIL® + *Staphylococcus aureus* coagulasa negativa; 3. PROBIOLACTIL® + *Corynebacterium* spp. C11 y 4 PROBIOLACTIL® + *Escherichia coli*.

II. 2.1 Tratamiento de las cepas indicadoras

Como cepas indicadoras se utilizaron las cepas patógenas: *Staphylococcus aureus* C1, *Staphylococcus* coagulasa negativo C7, *Corynebacterium* spp. C11 y *Escherichia coli*, todas procedentes del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Matanzas. Las cepas mencionadas se aislaron por Garrote (2020) a partir de vacas con mastitis subclínica. Cada cepa se inoculó en caldo nutriente (BIOCEN) y se incubaron por 24 horas a 37°C en zaranda termostada (UNITRONIC 320 OR) a 110 rpm.

II. 2.2 Desarrollo de la técnica de difusión en el agar

Se preparó el medio específico para desarrollar el enfrentamiento del biopreparado frente a los microorganismos patógenos (agar Mueller Hinton), el cual se aplicó en placas Petri y posteriormente se realizó la siembra de las cepas según la escala 0,5 de MacFarland. Después se hicieron pocillos con ayuda de un sacabocado metálico estéril, con 5 mm de diámetro, donde se adicionó el biopreparado (100 µL) sin modificaciones con una micropipeta. Posteriormente las placas se incubaron por 24 h a una temperatura de 37°C hasta la observación de los halos de inhibición los que fueron medidos con una regla milimetrada. Cada tratamiento presentó tres réplicas.

II.3 Determinación la acción antibacteriana del PROBIOLACTIL® frente a patógenos causantes de la mastitis por medio de cocultivos o cultivos asociados

La actividad antagónica del PROBIOLACTIL® se estudió mediante cocultivos o cultivos asociados. El desarrollo del cultivo tuvo lugar en caldo leche, sustrato que simula el contenido que se encuentra en la ubre de la vaca. En cada erlenmeyer se adicionaron 100 mL de leche esterilizada por tindalización (100°C) por dos días. A continuación, se añadieron 5 mL de PROBIOLACTIL y 4 mL de un cultivo del microorganismo patógeno o

indicador (con una población de 10^{-6} UFC.mL⁻¹). Una vez mezclados, los cultivos se incubaron en condiciones estáticas durante 48 h a 37°C y se tomaron muestras a las 0, 4, 8, 12, 24, y 48 h. En cada muestreo se realizaron diluciones seriadas en caldo peptona (1%).y la siembra en placas en medios selectivos. Para *Staphylococcus aureus* C7 se utilizó el medio agar manitol salado y para *Lactobacillus salivarius* agar MRS. El experimento se realizó por triplicado.

II. 3 Determinación del costo de producción del biopreparado a escala de laboratorio.

Para determinar el costo de producción del biopreparado a escala de laboratorio se procedió a la búsqueda de la información económica necesaria para cada uno de los elementos o componentes que intervienen en el proceso.

II.4 Análisis estadístico

Para el análisis de los dos ensayos realizados se utilizó el modelo lineal generalizado mixto, con el procedimiento GLIMMIX presente en el SAS en: *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* coagulasa negativo, *E. coli* y *Corynebacterium* spp., por ser mediciones repetidas en la misma unidad experimental. Con los datos se estudiaron las matrices de estructura varianza y covarianza [Toeplitz (TOEP), Varianza compuesta (VC), Simetría compuesta (SC), Autoregresiva (AR [1]) y No estructurada (UN)], con los criterios de información [(AIC) Akaike, (AICC) Akaike corregido y (BIC) Bayesiano, para lo cual resultó la VC la de mejor ajuste, para las dos primeras y la SC para el resto de las variables. También se tuvo en cuenta la covariable repeticiones anidadas dentro de tratamientos, para controlar la influencia de estos efectos. Se trabajó con la dócima de Duncan (1955) para definir las diferencias entre las variables analizadas.

Resultados y discusión

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. 1 Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del biopreparado PROBIOLACTIL® frente a patógenos productores de mastitis bovina

En la tabla 3 se aprecian los resultados del efecto del biopreparado frente a cuatro cepas aisladas a partir de las glándulas mamarias de vacas con mastitis subclínica. Se observa que el PROBIOLACTIL® inhibió a todas las cepas, pero presentó mayor efecto ($P < 0,005$) frente a *Staphylococcus coagulasa negativo*.

Se comprobó que el aditivo zootécnico ejerció su mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas *Staphylococcus aureus* C1, *Staphylococcus coagulasa negativo* C7 y *Corynebacterium* C11, todas causantes de mastitis en vacas lecheras.

Tabla 3: Efecto del PROBIOLACTIL® frente a bacterias patógenas causantes de mastitis en vacas lecheras. Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos para un mismo microorganismo (Anexo 1 y 2).

Cepa patógena	PROBIOLACTIL®
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,67 ^b
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	19,66 ^a
<i>Corynebacterium spp.</i>	10,67 ^b
<i>Escherichia coli.</i>	12,00 ^b
P	0,0233
±EE	1,68

Letras diferentes en la misma columna difieren para $P \leq 0,05$.

Rondón *et al.* (2019) plantean que existen diferentes métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* frente a bacterias patógenas causantes de mastitis en vacas. Las cepas utilizadas fueron *Lactobacillus salivarius* C-65 y *L. brevis* 17 LP, procedentes del cepario del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas, Cuba y como cepas patógenas se utilizaron aislados de vacas con mastitis *Klebsiella spp.*, *S. epidermis*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Proteus*

spp y la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® del Laboratorio de Microbiología de la misma Universidad (cepa control de referencia).

El método empleado para la evaluación de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus* spp, fue la técnica difusión de las sustancias en el agar y el empleo de cocultivos. La cepa *L. salivarius* C-65. Inhibió el crecimiento de *E. coli* (13.67 cm), *S. aureus* (8.33 cm) y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (12.67) (Rondón *et al.*, 2019). A diferencia de los resultados del presente trabajo, la cepa patógena con mayor susceptibilidad fue *Staphylococcus aureus*, bacteria que constituye una de las principales especies causantes de mastitis en vacas en ordeño

Sánchez *et al.* (2016) evaluaron la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp contra patógenos productores de mastitis bovina. Se utilizaron como cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, además de las cepas aisladas de campo *Streptococcus agalactiae* 345, *Staphylococcus chromogenes* 18.1, *Staphylococcus chromogenes* 16.1 y *Staphylococcus hyicus* 14.1. Todas pertenecientes a la colección del CENLAC (Laboratorios de Ensayos para la Calidad de los Alimentos, CENSA, Cuba). Estos autores refieren que las seis cepas de *Lactobacillus* spp. produjeron, *in vitro*, metabolitos con efectos inhibitorios. Mencionan que la causa de inhibición del crecimiento, en estas cepas, es de naturaleza proteica; probablemente por bacteriocinas y péptidos de bajo peso molecular que ejercen su actividad antimicrobiana por diferentes mecanismos que incluyen desestabilización de membrana, lisis celular, degradación de macromoléculas como ácidos nucleicos e inhibición de procesos biológicos como síntesis de proteínas, ADN, ARN y péptidoglucano y/o peróxido de hidrogeno, que es una molécula con gran capacidad antagonista y que puede ejercer su acción sobre una gran variedad de microorganismos.

También las cepas de *Lactobacillus* spp. pueden inhibir a los microorganismos patógenos causantes de mastitis bovina debido a la producción de ácido láctico: Este ácido acidifica su entorno e inhibe el crecimiento de bacterias patógenas. Se conoce que un pH bajo afecta a las proteínas, ya que los cambios moderados en el pH pueden modificar la ionización de los grupos funcionales de los aminoácidos e interrumpir los enlaces de hidrógeno. Esto puede promover cambios en el plegamiento de las

proteínas, promoviendo su desnaturalización y destruyendo su actividad. Por otra parte, puede inhibir la producción de energía, ya que la fuerza motriz protónica responsable de la producción de ATP en la respiración celular depende del gradiente de concentración de H⁺ a través de la membrana plasmática. Si los iones H⁺ son neutralizados por iones hidróxido, el gradiente de concentración colapsa y perjudica la producción de energía de las células (Kamel *et al.*, 2021).

Estos factores contribuyen a la capacidad de las cepas de *Lactobacillus* para inhibir el crecimiento y la actividad de los microorganismos patógenos causantes de mastitis bovina. Sin embargo, es importante mencionar que la eficacia de la inhibición puede variar dependiendo de la cepa específica de *Lactobacillus* y del patógeno en cuestión. Arizaca *et al.*, (2022) plantean en su estudio que cepas de *Lactobacillus* aisladas de queso y yogur inhibieron a *E. coli* y a *S. aureus*. Estos autores manifestaron que *Lactobacillus* spp. presentó mayor actividad antimicrobiana sobre la cepa *S. aureus* y en relación a *E. coli*, resultados similares a los del presente trabajo.

Otros estudios de cepas de lactobacilos para determinar su actividad antimicrobiana contra algunas bacterias patógenas mediante el método de difusión en disco revelaron que el sobrenadante libre de células de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus*, en combinación, exhibió una inhibición promedio (15-35cm) en el crecimiento de los patógenos de prueba: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (Mohammed *et al.*, 2022). Estos resultados demuestran diversidad en el comportamiento de las cepas de *Lactobacillus salivarius* frente a diferentes cepas indicadoras, ya que la cepa C-65 demostró inhibición de *E. coli* en otros ensayos con *E. coli* enterotoxigénica (Rondón, 2009).

En un estudio realizado por Tsega *et al.* (2023) se aislaron y caracterizaron posibles cepas probióticas de *Lactobacillus* del contenido del tracto digestivo de pollos en Etiopía. De los 10 aislamientos, el aislado IS6 mostró la zona máxima de inhibición contra *Escherichia coli* (17.66 mm) y *Staphylococcus aureus* (16.00 mm). Recientemente en una investigación se aislaron un total de 2000 colonias de íleon y del contenido cecal de pollos. Los 200 aislados de BAL seleccionados pertenecían a cinco cepas, incluidas *L. acidophilus* (63 colonias), *L. ingluviei* (2 colonias), *L. reuteri* (58 colonias), *L. salivarius* (72 colonias) y *L. saerimneri* (5 colonias). Se concluyó que el *L.*

ingluviei y *L. salivarius* pueden aumentar la población de BAL, mientras se reduce el patógeno *E. coli* en el contenido cecal de pollos (Sirisopapong *et al.*, 2023).

Kang *et al.* (2017) realizaron un estudio con el objetivo de determinar si *Lactobacillus salivarius* era capaz de producir actividades bactericidas contra *S. aureus* y comprobar si la inhibición se debía a una reducción generalizada del pH o a productos secretados por esta bacteria. Estos autores observaron que se producía una reducción de 8,6 log₁₀ de la población y la disminución de 6,3 log₁₀ de biopelícula producida por *S. aureus*. La muerte de *S. aureus* dependió parcialmente del pH, pero fue independiente del agotamiento de nutrientes. Al sobrenadante libre de células le fue neutralizado el pH e inactivado por calor o tratado con proteinasa K, redujo significativamente la destrucción de *S. aureus* por *L. salivarius*. El análisis proteómico del secretoma de *L. salivarius* identificó un total de cinco proteínas secretadas, incluida una proteína de unión a peptidoglicano que contiene LysM y una proteína peptidasa M23B. Se concluyó que estas pueden representar nuevos agentes antiestafilocócicos potenciales que podrían ser eficaces contra las biopelículas de *S. aureus*.

El uso de probióticos productores de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) se considera una solución potencial para controlar las infecciones bacterianas y reducir el uso de antibióticos en la producción animal. En este estudio, se seleccionó *Ligilactobacillus salivarius* P1CEA3, aislado del tracto gastrointestinal (TGI) de cerdos, por su actividad antagonista contra patógenos Gram positivos de relevancia en la producción porcina. La secuenciación del genoma completo (WGS) de *L. salivarius* P1ACE3 reveló la existencia de dos grupos de genes implicados en la producción de bacteriocinas, uno con genes que codifican las bacteriocinas de clase II salivaricina B (SalB) y Abp118, y un segundo grupo que codifica una supuesta variante de nisina. Las determinaciones de colonia MALDI-TOF MS y una proteómica dirigida combinadas con un análisis masivo de péptidos (LC-MS/MS) codificados por *L. salivarius* P1CEA3 confirmaron la producción de una nueva variante de nisina de 3347 Da, denominada nisina S, pero no la producción de las bacteriocinas SalB y Abp118, en los sobrenadantes de la cepa productora. Este es el primer informe de una variante de nisina codificada y producida por *L. salivarius*, una especie bacteriana especialmente reconocida por su seguridad y potencia probiótica (Sevillano *et al.*, 2023).

Se sabe que las bacteriocinas inhiben diversas bacterias transmitidas por los alimentos y sus biopelículas; sin embargo, se han informado pocas bacteriocinas con actividad contra *Staphylococcus aureus* derivado de alimentos. Aquí, se obtuvo, purificó y caracterizó ampliamente una nueva bacteriocina (XJS01) de la cepa CGMCC2070 de *Lactobacillus salivarius*. La masa molecular y la composición de aminoácidos de XJS01 fueron 666,31 Da y F-S-G-L-A-G-D, respectivamente. XJS01 inhibió la cepa de *S. aureus* 2612:1606BL1486 (*S. aureus_26*), que se aisló originalmente de la carne de pollo. Además, XJS01 mostró buena resistencia al tratamiento térmico y sólo fue susceptible al tratamiento con pepsina. La concentración inhibidora mínima de XJS01 contra *S. aureus_26* fue de 9,85 µg/ml, que es inferior a los niveles informados anteriormente para la mayoría de las bacteriocinas descritas. Además, la exposición a XJS01 también disminuyó la viabilidad e inhibió significativamente ($p < 0,05$) las células planctónicas de *S. aureus_26*. La formación de biopelículas de *S. aureus_26* también se inhibió significativamente ($p < 0,05$). Los resultados de la microscopía electrónica mostraron que XJS01 alteró la permeabilidad de la membrana en *S. aureus_26*, provocó una fuga de contenido citoplasmático y provocó la deformación celular. En resumen, este estudio identifica a la bacteriocina XJS01 como un candidato potencial para el control de *S. aureus* en alimentos en estado planctónico o de biopelícula (Xiang *et al.*, 2022).

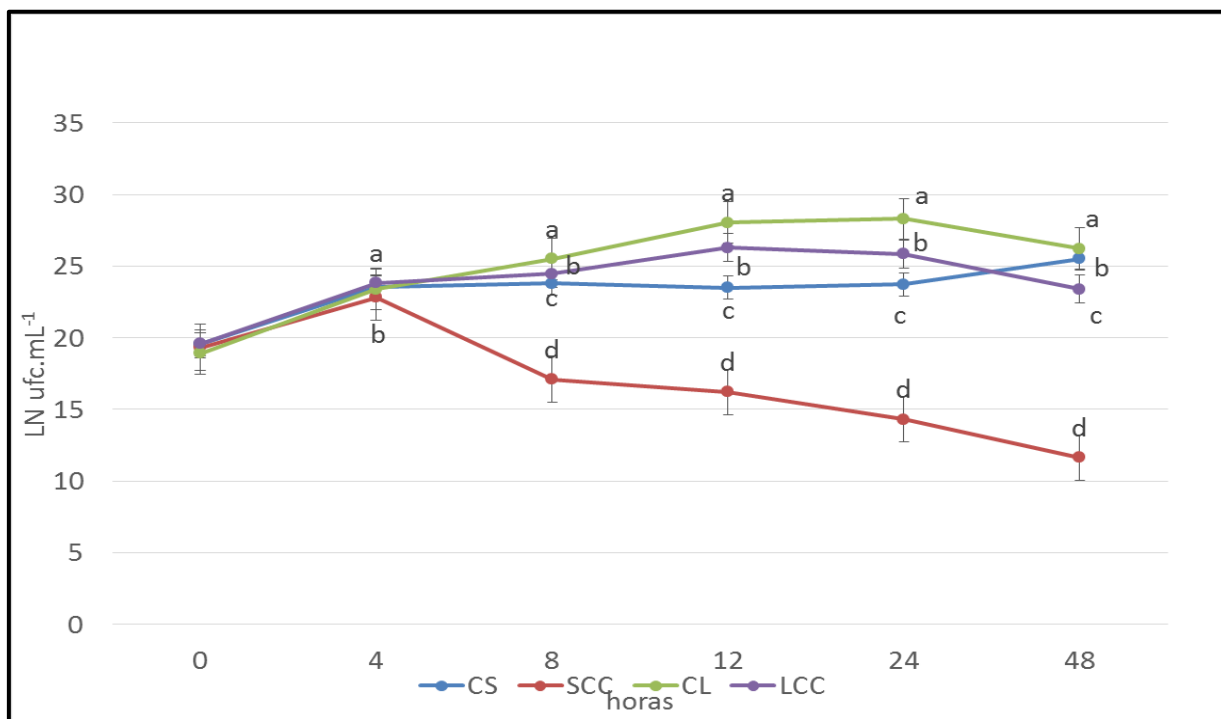
Otros trabajos demuestran la producción de bacteriocinas por parte de *L. salivarius*. Robredo & Torres (2000) detectaron actividad de bacteriocina en 11 de 18 (61%) aislados de *L. salivarius* analizados (todos ellos recuperados de cerdos), pero no entre las otras especies de BAL estudiadas. Los aislados de estas bacterias inhibieron fuertemente el crecimiento de tres aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, probados como indicadores (dos resistentes a la meticilina y uno susceptible a la meticilina).

Los resultados del presente trabajo son promisorios, ya que la inhibición de bacterias como *Staphylococcus aureus*, una de las principales causantes de la mastitis, servirá como base científica para el uso de estos aditivos microbianos como alternativa para controlar la mastitis en vacas en ordeño. Sin embargo, el desarrollo de cocultivos o cultivos asociados, pudiera demostrar el comportamiento del microorganismo indicador

ante la presencia y la actividad metabólica del microorganismo probiótico. Se conoce que cuando un microorganismo se encuentra en monocultivo la producción de sustancias se corresponde con la utilización de un determinado sustrato, pero si se enfrenta a un microorganismo de diferente especie en el mismo medio de cultivo se inducirá la producción de otras sustancias que pudieran inhibir o detener el crecimiento del microorganismo patógeno. De ahí la necesidad de realizar un cocultivo en caldo leche, que simula el sustrato que estas bacterias tendrán en la glándula mamaria.

III. 2 Efecto antimicrobiano de *L. salivarius* C65 por el método de cocultivo

En la figura 6 se presenta el crecimiento de *Lactobacillus salivarius* C-65 y *Staphylococcus* coagulasa negativo (CN) en caldo leche en monocultivos y en



cocultivos (Anexo 3).

Figura 6. Crecimiento de la población en los controles y el cocultivo del *Staphylococcus* coagulasa negativo y *Lactobacillus salivarius* C-65. Las barras representan el error estándar en cada momento de muestreo.

Hora 4: P=	0.0001; EE=0.01
Hora 8: P=	0.0001; EE= 0.007
Hora 12: P=	0.0001, EE= 0.008
Hora 24: P=	0.0001; EE = 0.009
Hora 48: P=	0.0001; EE = 0.009

En la figura 6. se muestra el LN de las UFC.mL⁻¹ en el cual se evidencia un incremento de la población por parte del *Lactobacillus salivarius*; pero a la vez disminuye el crecimiento del *Staphylococcus coagulasa* negativo a partir de las 4h. Esta reducción del crecimiento de la cepa patógena puede estar dada fundamentalmente por cambios del pH del medio o la producción de bacteriocinas o peróxido de hidrógeno.

Rondón *et al.* (2019) plantean que el *Staphylococcus coagulasa* negativo (SCN) es la causa más común de las infecciones intramamarias. Esta especie se describe como patógeno emergente de la mastitis bovina. Mientras que en los años sesenta la mastitis por estafilococos tenía una escasa importancia, actualmente se aísla esta bacteria en un 20% de las muestras bacteriológicamente positivas de cuartos mamarios afectados por esta enfermedad.

Jiang *et al.* (2021) explican que las bacteriocinas producidas por las cepas de BAL como *Lactobacillus salivarius* CGMCC20700, podrían inhibir eficazmente a *S. aureus* en un amplio rango de temperaturas y pH. En el mencionado estudio, se purificó y caracterizó ampliamente la nueva bacteriocina LSX01 de *Lactobacillus paracasei* LS-6, la cual inhibió significativamente la formación de biopelículas de *S. aureus* _45.

Las bacteriocinas bacterianas, como explica Jiang *et al.* (2021), es una clase de proteína macromolecular natural o péptido pequeño, bien conocida por la inhibición de bacterias patógenas. Se conoce que muchas bacteriocinas, especialmente las bacteriocinas de las bacterias del ácido láctico (LAB), son altamente seguras y tolerantes al calor, los ácidos y las bases.

Heredia *et al.* (2017) plantean que las bacteriocinas de las BAL contienen residuos de aminoácidos tales como lisina, arginina e histidina, los cuales les confieren un carácter catiónico (pH neutro), y también contienen residuos de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano, lo que les proporciona su naturaleza hidrofóbica. La mayoría de las bacteriocinas de las BAL inhiben el crecimiento

HORA 4: P=	0.0001; EE=0.01
HORA 8: P=	0.0001; EE= 0.007
HORA 12: P=	0.0001, EE= 0.008
HORA 24: P=	0.0001; EE = 0.009
HORA 48: P=	0.0001; EE = 0.009

de las bacterias mediante la formación de poros en la membrana celular, lo cual se inicia con la atracción de las bacteriocinas hacia la bacteria diana a través de fuerzas electrostáticas, debido a que están encargadas positivamente e interactúan con los fosfolípidos de la membrana de las bacterias que se encuentran cargados negativamente.

Además, la naturaleza anfipática de las bacteriocinas facilita aún más su distribución a lo largo de la superficie de la membrana celular de la bacteria.

Otro de los factores que puede haber incidido es la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico. *Lactobacillus salivarius* C-65 es una BAL homofermentativa, por lo que en presencia de la lactosa de la leche produce ácido láctico en mayor concentración. En la figura 7 se presenta el comportamiento del pH de los monocultivos y cocultivos. Se puede apreciar que a partir de las 4 horas de establecida la asociación microbiana se observan diferencias entre el tratamiento donde se estableció la cepa C-65 y los cultivos de *Staphylococcus aureus* y el cocultivo. Sin embargo, a las 8 horas se comprobó que el cocultivo manifestaba una disminución del pH similar al cocultivo de *L. salivarius*. Estos resultados se relacionan con la reducción de *Staphylococcus aureus* en el cocultivo a las 8 horas.

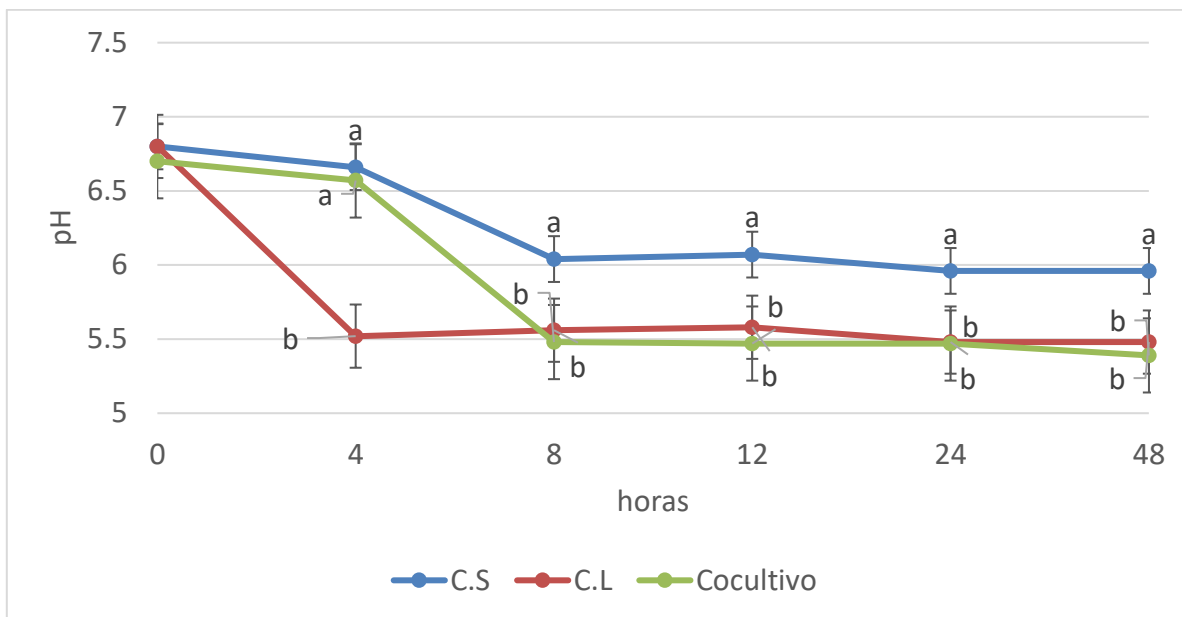


Figura 7. Comportamiento del pH en el cocultivo de *Lactobacillus salivarius* C-65 y *Staphylococcus aureus* CN. Las barras representan el error estándar.

Lactobacillus salivarius es un microorganismo que en la leche tiene la capacidad de producir ácido láctico (Heredia *et al.*, 2017). El ácido láctico, producido por estas bacterias tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Esta acción antimicrobiana se debe a la capacidad de acidificar el entorno, lo cual parece ser el principal efecto detrás de la inhibición de este patógeno. Christensen *et al.* (2021) realizaron ensayos de microdilución en caldo y mostraron una reducción significativa del crecimiento de *S. aureus* al usar hasta un 10% de sobrenadante libre de células producido por *Lactobacillus* spp. Esto subraya el uso de LAB específicos vivos o sus productos como posibles estrategias de tratamiento futuro para reducir la colonización de este patógeno.

Las BAL, como se expresa en el artículo de Sirisopapong *et al.* (2023), producen metabolitos como el ácido láctico, antioxidantes y compuestos antimicrobianos,

especialmente bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que contribuye a la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas.

El ácido láctico, producido por bacterias como *Lactobacillus*, tiene un efecto antimicrobiano sobre varias bacterias, incluyendo *Staphylococcus aureus*. Se debe en primer lugar a la reducción del pH: El ácido láctico puede reducir el pH del entorno, creando un ambiente ácido que es inhóspito para muchas bacterias. *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, prefiere un ambiente más neutro y su crecimiento puede ser inhibido en condiciones ácidas. Por otra parte el ácido láctico puede aumentar la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias, lo que lleva a la lisis celular y a la muerte de las células. También puede interferir con varios procesos metabólicos esenciales dentro de las bacterias, como la producción de energía y la síntesis de proteínas. Es importante mencionar que la efectividad del ácido láctico como agente antimicrobiano puede variar dependiendo de la concentración del ácido, el tiempo de exposición, la especie bacteriana y las condiciones ambientales (Christensen *et al.*, 2021).

III.3 Actualización del costo del biopreparado PROBIOLACTIL® a escala de laboratorio

En la tabla 4 se aprecia una actualización del costo de cada uno de los componentes del biopreparado PROBIOLACTIL®. De acuerdo con Rondón (2009) en el año 2009 este aditivo tenía un costo de 2,41 CUP por litro. Sin embargo, en la actualidad el biopreparado tiene un costo estimado de 149,44 CUP.

Tabla 4. Costo de producción del PROBIOLACTIL® a escala de laboratorio (1 L).

Elaboración del inóculo del biopreparado				
Componente	Unidad	Precio CU	Cantidad utilizar	Costo CU
Caldo MRS	500 g	149,37	5,12 g	1,52
Agua destilada	1000 L	17,50	0,1 L	0,00175
TOTAL				1,52
Elaboración del biopreparado				
Miel final	1000 L	1500,00	0,03 L	0,05
Hidrolizado enzimático de levaduras	1 L	28,72	0,210 L	6,03
K ₂ HPO ₄	100 g	27,90	2 g	0,56

Citrato de amonio	100 g	18,70	5 g	0,93
Acetato de sodio	250 mg	54,10	5000,0 mg	1,08
Sulfato de magnesio	500 g	47,30	0,2 g	0,02
Sulfato de manganeso	100 g	28,70	0,02 g	0,01
Elementos del proceso				
Energía	185,00	136,55	92,5	68,2
Salario	Salario Técnico 24 días	2960,00	Salario de Técnico en 1 d	71,04
Costo de 1 L de PROBIOLACTIL®				149,44

Como se puede apreciar, el medio de cultivo empleado incide en los costos de producción a escala de laboratorio. Se debe recordar que el MCLs se formula con miel final de caña de azúcar e hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como fuentes de carbono y nitrógeno. Con la inclusión de estos componentes se sustituye la glucosa, extracto de levadura, peptona y extracto de carne, que son productos más costosos y de menor disponibilidad. Es necesario considerar que en el año 2009 la miel final tenía un precio de 60 CUP la tonelada y en la actualidad este componente cuesta en el mercado nacional 1500 CUP. Con el reordenamiento monetario todos los precios aumentaron, de ahí que el costo del producto se incremente considerablemente. No obstante, se debe recordar que una vez que este aditivo se produzca a escala industrial el costo debe disminuir, pues con la misma cantidad de energía, salario de trabajadores se podrán obtener mayor cantidad de litros del biopreparado.

Conclusiones

IV. CONCLUSIONES

1. El aditivo zotécnico PROBIOLACTIL® mostró efecto antibacteriano *in vitro*, debido a que provocó la inhibición de 4 de los microorganismos patógenos aislados de animales con mastitis subclínica.
2. Las cepas identificadas como *Staphylococcus aureus* C1 y *Staphylococcus coagulasa negativo* C7 fueron las más sensibles a la presencia de sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus salivarius*.
3. El biopreparado probiótico PROBIOLACTIL® redujo la población de *Staphylococcus coagulasa positiva* a partir de las cuatro horas con el establecimiento de cocultivos.

Recomendaciones

V. RECOMENDACIONES

1. Determinar qué sustancias antimicrobianas son las que provocaron la disminución del *Staphylococcus* en el cocultivo
2. Utilizar los resultados de esta investigación en estudios de pregrado y posgrado
3. Evaluar el efecto de otros aditivos zotécnicos como sellantes del pezón en el control y prevención de la mastitis bovina.

Referencias Bibliográficas

V. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilar Gálvez, F. L.; Álvarez Díaz, C. A. 2019. Mastitis bovina. Universidad Técnica de Machala. Editorial UTMACH. 152p.
- Aguirre Borda, S. X.; Montenegro Flórez, S. A.; Álvarez Hernández, L. V. 2022. Revisión sistemática sobre alternativas de tratamiento de mastitis bovina, frente a la resistencia a antibióticos. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Proyecto de grado. Facultad de Ciencias de la Salud. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Bogotá. Proyecto de grado. 49p.
- Aleksandrak-Piekarczyk, T.; Puzia, W.; Zylińska, J.; Cieśla, J. Gulewicz, K.; Bardowski, J. K.; Górecki, R.K. 2019. Potential of *Lactobacillus salivarius* IBB3154 to persistence in chicken after *in ovo* delivery". *MicrobiologyOpen*, 8(1): e620-e632, ISSN: 2045-8827; DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.620>
- Andrade, M.; Muños, M.; Artieda, J. R.; Ortíz, P.; González, R.; Vega, V. 2017. Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. REDVET Revista electrónica Veterinaria. 18 (11): 1-16.
- Arizaca Condori, A. Y.; Estudio de la acción de *Lactobacillus* spp para inhibir el desarrollo de bacterias de interés clínico *Escherichia coli* ATCC 2592 y *Staphylococcus aureus* ATCC25923. 2022. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Facultad de Ciencias Biológicas Escuela Provincial de Biología. Perú. 70p.
- Ashraf, A.; Imran, M. 2020. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Anim Health Res Rev*. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>.
- Ashraf, A.; Imran, M. 2022. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animm Health Res Rev*.
- Azooz, M. F.; El-Wakeel, S. A.; & Yousef, H. M. 2020. Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms. *Veterinary world*, 13(9), 1750–1759. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1750-1759>.
- Babot, J. D.; Argañaraz- Martínez, E.; Saavedra, L.; Apella, M. C.; Chaia, A.P. 2018. Compatibility and safety of five lectinbinding putative probiotic strains for the

- development of a multi- strain protective culture for poultry”. *Beneficial Microbes*, 9(6): 927-935, ISSN: 1876-2883, DOI: <https://doi.org/10.3920/BM2017.0199>
- Bacardi-Sarmiento, E. 2020. Efectos de los probióticos, prebióticos y simbióticos sobre la microbiota intestinal. Universidad de Ciencias Médicas “Carlos J. Finlay”. Facultad de Medicina. Camagüey. Cuba. 7p.
- Borges, M. 2021. Simbióticos, el potencial de la unión de microorganismos y energía. *Microbiota Desde Cero*.
- Camacho Cruz, J.; Castañeda- Gutiérrez, L. D.; Mongui- Gutiérrez, D.; Ramírez- Martín. A.; Espinosa Orozco, A. M.; Castillo Chiquiza, J. S.; Valencia Hueras, L.; Cuesta Valencia, L.; Cuesta Valencia, J. F.; Avellaneda Martínez, J. S.; Gutiérrez Burgos, C. A.; Martín Ramírez, P. A.; Rincón González, C. A.; Romero Bernal, P. S. 2023. Probióticos; una mirada al mecanismo de acción y aplicación clínicas en Pediatría. Probiotics: a look into the mechanism of action and clinical application in Pediatrics. Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina. <https://doi.org/10.14482/sun.38.3.618.92>
- Christensen, I.B., Vedel, Ch., Clausen, M.L., Kjærulff, S., Agner, T., Nielsen, D.S. 2021. Targeted Screening of Lactic Acid Bacteria With Antibacterial Activity Toward *Staphylococcus aureus* Clonal Complex Type 1 Associated With Atopic Dermatitis. *Frontiers in Microbiology* 12, <https://doi.org/DOI=10.3389/fmicb.2021.733847>.
- Córdova Izquierdo, A.; Guerra Liera, J. E.; Iglesias Reyes, A. E.; Ruiz Lang, G.; Espinosa Cervantes, R.; Villa Mancera, E. A.; Huerta Espinosa, R.; Gómez Vázquez, A.; Cansino Arroyo, G. 2018. Prevención y tratamiento de mastitis en vacas altas productivas de leche. 6p.
- Cucalón Arenal, J. M.; Blay Cortes, M.G. 2020. Actualización en probióticos, prebióticos y simbióticos para el médico de familia (I). Grupo de Trabajo de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición de la SEMG. <http://dx.doi.org/10.24038/mgyf.2020.049>
- de la Cruz, P., Gilleard, A.D. 2020. Evaluación de la influencia de un agregado con características probióticas y prebióticas sobre la glándula mamaria en vacas lecheras, tomando en cuenta el recuento de células somáticas. Tesis para la obtención del grado de Doctor en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional

Pedro Henríquez Ureña. Santo Domingo, República Dominicana. Consultado en: <https://repositorio.unphu.edu.do/bitstream/handle/123456789/3310/Evaluaci%C3%B3n%20de%20la%20influencia%20de%20un%20agregado%20con%20caracter%C3%ADsticas%20probi%C3%B3ticas%20y%20prebi%C3%B3ticas%20sobre%20la%20gl%C3%A1ndula%20mamaria%20en%20vacas%20lecheras%2C%20tomando%20en%20cuenta%20el%20recuento%20de%20c%C3%A9lulas%20somm%C3%A1ticas.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Fecha de consulta: noviembre 2023.

Díaz, Daniela, 2022. Actividad antimicrobiana de la quitosana frente a microorganismos causantes de la mastitis subclínica. Trabajo de diploma en opción al título de Ingeniero agrónomo. Facultad de Ciencias agropecuarias. Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba.

Duncan, B. 1995. Multiple ranges and multiple F. Test Biometrics 11:1.

El-Sayed, A.; Kamel, M. 2021. Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. Trop Anim Health Prod. 53 (2):236. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02680-9>.

Fernández, K.J.; Rodríguez, J. A.; Reyes, L.; Duquesne, A.; Solenzal, Y.; Rives, A.; Hernández, J. C.; 2022. Comparison of in vitro anti-*Staphylococcus aureus* activity of eight antibiotics and fours dilution of prpolis. Journal of the selva Andina Research Society.13 (1):35-48.

Gao, J., Liu, Y. C., Wang, Y., Li, H., Wang, X. M., Wu, Y., Zhang, D. R., Gao, S., & Qi, Z. L. 2020. Impact of yeast and lactic acid bacteria on mastitis and milk microbiota composition of dairy cows. AMB Express, 10(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-0953-8>.

Garrote, M. 2020. Actividad antimicrobiana de PROPOLINA frente a microorganismos patógenos causantes de mastitis. Trabajo de Diploma en opción a Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Matanzas, Cuba.

González Salas, R.; Vidal del Río, M.M. 2021. Mastitis bovina y calidad de la leche, un desafío para la salud humana. Revista Universidad y Sociedad 13(51). 89-96p.

- Guarner, F.; Sanders, M. E.; Szajewska, H.; Cohen, H.; Eliakim, R.; Herrera, C.; Karakam, T.; Merenstein, D.; Piscocoya, A.; Ramakrishna, B.; Salminen, S. 2023 Probióticos y prebióticos.
- Guimaraes, J.L.; Brito, M.A.; Lange, C.C.; Silva, M.R.; Ribeiro, J.B.; Mendonca, J.F.; Souza, G.N. 2017. Estimación del impacto económico de la mastitis: un estudio de caso en un rebaño lechero de Holstein Condiciones Tropicales; 142(1) 46-50.
- Heredia Castro, P. Y.; Hernández Mendoza, A.; González Córdova A. F.; Vallejo Cordoba, B. 2017. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. Asociación Interciencia. Caracas, Venezuela. 340-346 pp.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12040683>.
- Izquierdo, N. A.; Gheorghe, A.; Habeanu, M.; Ciurescu, G.; Dumitru, M.; Untea, A. E.; Vlaicu, P. A. 2023. Evaluación de los efectos de la suplementación con *Lactobacillus salivarius* microencapsulado y semillas de caupí sobre el crecimiento y el estado de salud de los pollos de engorde. Ciencia veterinaria delantera. Doi: 10.3389/fvets.2023.1279819. PMID: PMC10600449 | PIMID: 37901100.
- Jiang, Y. H.; Gang Xin, W.; Yang, L. Y.; Lin, L. B.; Li, X. Z.; Lin Zhang, Q. 2021. Una nueva bacteriocina contra *Staphylococcus aureus* de *Lactobacillus paracasei* aislada del yogur fermentado tradicional de Yunnan: purificación, caracterización antibacteriana y actividad antibiopelícula. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21126>
- Kamel, H.M.; Armanious, W.; Morgan, S.; Ebtsam, E.Z. Kotb. 2021. Exploring antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. (probiotics) isolated from raw cow's milk against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. Journal of Applied Veterinary Sciences, 6(3), 60-69. <https://doi: 10.21608/jav.2021.79310.1083>.
- Kang, M.S., Lim, H.S. Oh, J.S., Lim, J., Wuertz-Kozak, K., Harro, H., Shirliff, M. & e Achermann, Y. 2017. Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*, Pathogens and Disease, 7(2): ftx009. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx009>.

- Kour, S.; Sharma, N.; Kumar, P.; Singh Soodan, J.; Viega dos Santos, M.; 2023. Advances in Diagnostic Approaches and Therapeutic Management in Bovine Mastitis. *Vet Sci.* 10(7):449. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070449>.
- Kovačević, Z.; Kladar, N.; Čabarkapa, I.; Rodinović, M.; Erdeljan, M.; Maletić, M.; Božin, B. 2021. New Perspective of *Origanum vulgare* L. and *Satureja montana* L. Essential Oils as Bovine Mastitis Treatment Alternatives. *Antibiotics* (Basel). 10(12):1460.
- Li, X., Xu, C., Liang, B., Kastelic, J. P., Han, B., Tong, X., & Gao, J. 2023. Alternatives to antibiotics for treatment of mastitis in dairy cows. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1160350. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1160350>
- Liu, W.; Jie, L.; Li, D.; Han, H.; Yan, H.; Sol, Y.; Lei, O.; Wang, J.; Zhou, Y.; Cao, D.; Min Li, Hui.; Wei Li, Fu. 2023. *Ciencia avícola*.
- Liu, Y.; Lianhong, L.; Yan, H.; Ning, Z.; Zhong, W. 2022. *Lactobacillus salivarius* SNK-6 activa el sistema inmunológico de la mucosa intestinal regulando la estructura de la comunidad microbiana cecal en gallina ponedoras. 10(7): 1469. doi:10.3390/microorganisms10071469
- Maldonado, D.F., Quilapanta, A. E., Santos, C. R., & Mena, L.A. (2022). Diagnóstico de mastitis subclínica mediante tres métodos para el control y tratamiento en bovinos de leche Holstein. *Dom. Cien.*,8(1), 773-790.<http://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/index>
- Manivel Chávez, R. A., Campos Arroyo, A.G., (2020) Probióticos, prebióticos y simbióticos: aliados en el cuidado de la salud. Facultad de Quimiocofarmacología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morella, (2020). 2p.
- Markoswiak, P.; Ślizewska, K. 2019. El papel de los Probióticos, prebióticos y simbióticos en la nutrición animal. Department of Biotechnonology and Food Sciences, Institute of Fermentation Technology and Microbiology, Lodz University of Technology, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Lodz, Polonia. Artículos técnicos, Titulares.
- Medrano, C.; Ahumada, D.G.; Romero, J.J. y Donado, P. 2021. Prevalencia, incidencia, factores de riesgo de mastitis subclínica en lecherías especializadas en Colombia. *Agronomía Mesoamericana*. 32(2):149-169.

- Mera Andrade, R.; Muñoz Espinosa, M.; Artieda Rojas, J.R.; Ortiz Tirado, P.; González Salas, R.; Vega Falco, V. 2017. Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. *Revista Electrónica de Veterinaria*.
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Mohammed, R. R.; Mohammed, M. R. 2022. Antimicrobial Activity of Probiotic Lactobacilli against Some Pathogenic Bacteria. *J Prob Health*. <https://doi.org/10.35248/2329-8901.22.10.284>.
- Morales Cuichán, M. J., 2021. Determinación de las pérdidas económicas por mastitis bovina, en un hato de la sierra ecuatoriana, a través del seguimiento longitudinal de la producción, calidad de leche y determinación de células somáticas. Trabajo de titulación, previo a la obtención de título de Ingeniera Agropecuaria. Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura.
- Pérez-Chabela, M. L.; Álvarez-Cisneros, Y. M.; Soriano-Santos, J.; Pérez-Hernández M. A. 2020. Los probióticos y sus metabolitos en la acuicultura. Una Revisión. *Hidrobiológica*. Departamento de Biotecnología. Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 196, Colonia Vicentina. Ciudad de México. 30 (1): 93-105.
- Remón, Dianys.; González, Dayaimi.; Martínez, Ailin. 2019. Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de la leche cruda por métodos de flujo citométrico. *Salud Animal*. 41 (1):1-8.
- Robredo, B. & Torres, C. 2000. Bacteriocin Production by *Lactobacillus salivarius* of Animal Origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 0095-1137/00/\$04.0010. 3908–3909.
- Rondón Castillo, A. J.; Valdivia Ávila, A.; Casals Bruffau, Sheila.; Laurencio Silva, Marta.; Milián Florido, G.; Arteaga Chávez, F.; Martínez Mora, M.; Rodríguez Oliva, M. 2019. Estudios de la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. frente a bacterias patógenas causantes de la mastitis en vacas lecheras. Centro de Estudios Biotecnológicos. Universidad de Matanzas, Cuba. Laboratorio de

- Biología Molecular. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 39: 21-28.
- Rondón, A. J.; del Valle, A.; Milián, G.; Arteaga, F.; Rodríguez, M.; Valdivia, A.; Martínez, M. 2019. Obtención de un biopreparado simbiótico (mezcla de pulpa de *Agave fourcroydes* Lem. y PROBIOLACTIL®) para su aplicación en terneros". *Revista Agrisost*, 25(2):1-9, ISSN: 1025-0247
- Rondón, A. J.; González, J.; Rodríguez, M.; Milián, G.; Martínez Mora, M.; Beruvides, A.; Vadivia, A.; Vera, R. 2020. Actividad metabólica in vitro de *Lactobacillus salivarius* y su efecto en indicadores productivos y de salud de terneros lactantes. Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO). Universidad de Matanzas. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Finca El Limón. Calceta, Manabí, Ecuador.
- Rondón, A. J.; Rodríguez, M.; Milián, G.; Beruvides, A. 2020. Potencial probiótico de *Lactobacillus salivarius* en animales de interés zootécnico. Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Cuba. Artículo de revisión. ISSN 0864-0408version On-line ISSN 2079-3480.
- Roy, S.; Dhaneshwar, S. 2023. Role of prebiotics, probiotics and symbiotics in management of inflammatory bowel disease: Current perspectives. *World J Gastroenterol*. 29(14): 2078-2100. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i14.2078>.
- Ruiz Gil, A. K.; Peña Rodríguez, J.; Remón Díaz, D. 2016. Mastitis bovina en Cuba. Artículo de Revisión. Bovine Mastitis in Cuba. Review Article Centro de Ensayos para el Control de la Calidad de la Leche y Derivados Lácteos (CENLAC), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. *Revista Producción Animal*.
- Sánchez Miranda, L.; Peña Rodríguez, J. 2016. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina.. Dirección de Salud Animal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. *Revista de Salud Animal*.
- Schilinger, U. & Lucke, F. K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. *Appl. Environm. Microbiol*. 55(8): 1901-1906.

- Sevillano, E., Peña, N., Lafuente, I., Cintas, L. M., Muñoz-Atienza, E., Hernández, P. E., & Borrero, J. 2023. Nisin S, a Novel Nisin Variant Produced by *Ligilactobacillus salivarius* P1CEA3. *International journal of molecular sciences*, 24(7), 6813. <https://doi.org/10.3390/ijms24076813>
- Sirisopapong, M.; Shimosato, T.; Okrathok, S.; Khempaka, S. 2023. Assessment of lactic acid bacteria isolated from the chicken digestive tract for potential use as poultry probiotics. *Anim Biosci*. 36(8):1209-1220. doi:10.5713/ab.22.0455.
- Soca, M.; Suarez, Y.; Soca, M.; Riviero, J.; Fuentes, M.; Purón, C. A. 2005. Comparación de la incidencia de mastitis clínica en dos rebaños lecheros después del uso del agua para la antisepsia final del pezón. *Redvet*, 6, 5-10.
- Statgraphics. 2002. Statgraphics Plus version 5.1. Statgraphic Technical Support Center. Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, USA.
- Sureshkumar, S.; Lee, H. C.; Jung, S. K.; Kim, D.; Oh, K. B.; Yang, H.; Jo, Y. J.; Lee, H. S.; Lee, S.; Byun, S. J. 2021. Inclusion of *Lactobacillus salivarius* strain revealed a positive effect on improving growth performance, fecal microbiota and immunological responses in chicken. *Arch Microbiol*
- Tellez, G.; Hafez, M.; Latorre, J.; Yalçın, S. 2023. Probióticos, prebióticos y sustancias fitogénicas para optimizar la salud intestinal en avicultura. Part II.
- Tello, L.; Flores, L.; Usca, J.; Moreno, I. 2021. Lactobacillus y su papel probiótico en los procesos digestivos y nutrivionales de los cerdos. *Revisión*. <https://doi.org/10.18502/epoch.v1i5.9587>.
- Thompson, J.; Everhart Nunn, S. L.; Clayton, B. 2023. Diagnostic Screening of Bovine Mastitis Using MALDI-TOS MS Direct- Spotting of Milk and Machine Learning. 31; 10(2):101. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020101>
- Tomanić, D.; Samardžija, M.; Koračević, Z. 2023. Alternatives to Antimicrobial treatment in Bovine Mastitis Therapy: A Review *Antibiotics* (Basel). 12(4):683. doi: 10.3390/antibiotics12040683. PMID: 37107045.
- Tsega, K. T.; Maina, K. J.; Tesema, N. B. 2023. Characterization of potencial probiotial probiotics *Lactobacillus* species isolated from the gastrointestinal tract of Rhode Island Red (RIR) chicken in Ethiopia. *Heliyon*. 9(7):e17453.doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e17453.

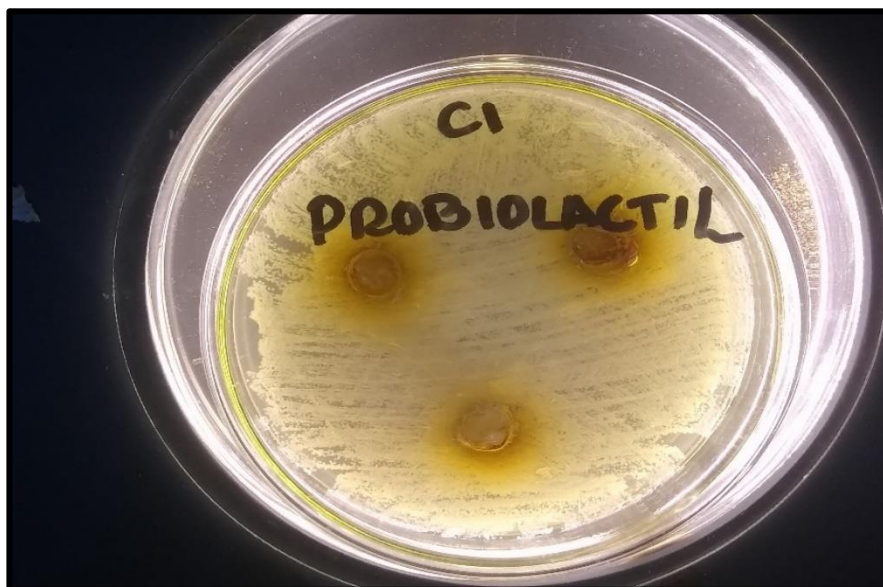
- Valdivia A, A.; Rubio Fontanills, Y.; Martínez Mora, M.; Garrote Pérez, M.; Pérez Hernández, Y. & Matos Trujillo, M. 2022. Actividad antimicrobiana de la PROPOLINA frente a bacterias causantes de mastitis subclínica. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas Revista de Producción Animal, 34(3). 12p.
- Valdivia, A. L.; Rubio, Yasmery.; Beruvides, A. 2021. Calidad higiénico-sanitaria de la leche, una prioridad para los productores. Revista de producción Animal. 33(2).
- Valdivia, A.; Matos, M.; Rodríguez, Z.; Pérez, Y.; Rubio, Y.; Vega, J. 2019. Los aditivos enzimáticos, su aplicación en la crianza animal. (4): 1-12.
- Xiang YZ, Wu G, Yang LY, Yang XJ, Zhang YM, Lin LB, Deng XY, Zhang QL 2022.. Antibacterial effect of bacteriocin XJS01 and its application as antibiofilm agents to treat multidrug-resistant Staphylococcus aureus infection. Int J Biol Macromol. 2022 Jan 31;196:13-22. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.136. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34838856.

Anexos

Anexos



Anexo 1. Actividad antimicrobiana del PROBIOLACTIL® frente al *Staphylococcus coagulasa* negativo



Anexo 2. Actividad antimicrobiana de PROBIOLACTIL® frente al *Staphylococcus aureus*.



Anexo 3. Medios de simulación (caldo leche) para el control de *Staphylococcus* coagulasa negativo C7, control del *Lactobacillus salivarius*. y el cocultivo.