

TRABAJO DE DIPLOMA



*Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de
PROBIOLEV® frente a bacterias productoras de mastitis
bovina.*

Autora: Daniela Ordoñez Barrios

Tutoras: Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva

Dr. C. Aymara Luisa Valdivia Ávila

Matanzas, 2023



UNIVERSIDAD DE MATANZAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



TRABAJO DE DIPLOMA

Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de PROBIOLEV® frente a bacterias productoras de mastitis bovina.

Autora: Daniela Ordoñez Barrios

Tutoras: Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. C. Marlen Rodríguez Oliva

Dr. C. Aymara Luisa Valdivia Ávila

Matanzas, 2023

PENSAMIENTO

*Que la enseñanza científica vaya, como la savia de los árboles, de la raíz
al tope de la educación pública.*

José Martí

DECLARACIÓN DE AUTORIDAD

Declaro que yo, Daniela Ordoñez Barrios, soy la única autora del presente 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

- ❖ Quiero dedicar este trabajo de diploma a toda mi familia.
- ❖ Seres queridos más allegados por brindarme todo su apoyo y ayuda de forma incondicional para llevar a cabo este proyecto y a lo largo de mi carrera.
- ❖ A mis padres y mi esposo, por su constante preocupación por mi educación y por inculcarme los valores morales.
- ❖ En especial a mi bebita, que a pesar de llegar en medio de mis estudios me dio alegría y fuerzas para seguir adelante y luchar por mis sueños para su mejor futuro y ejemplo a seguir.
- ❖ A mis tutoras, por la paciencia, dedicación, ayuda y comprensión que tuvieron conmigo para realizar esta investigación y el presente trabajo de diploma.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi familia por su apoyo en estos cuatro años de la carrera.
- ❖ Seres queridos más allegados por brindarme todo su apoyo y ayuda de forma incondicional, por su paciencia y toda la dedicación para llevar a cabo este proyecto y a lo largo de mi carrera.
- ❖ A mis padres y mi esposo, por su constante preocupación por mi educación y por inculcarme los valores morales.
- ❖ En especial a mi bebita, que a pesar de llegar en medio de mis estudios me dio alegría y fuerzas para seguir adelante y luchar por mis sueños para su mejor futuro y ejemplo a seguir.
- ❖ A mis tutoras Ana Julia Rondón Castillo, Marlen Rodríguez Oliva y Aymara Valdivia Ávila, por la paciencia, dedicación, ayuda, comprensión y el tiempo que han dedicado a la asesoría y revisión del presente trabajo de diploma.
- ❖ Al profesor Héctor Díaz, aunque ya no se encuentra en la universidad, fue el impulsor y motivador que continuara en la carrera y me gustara. Gracias a él, por toda la dedicación.
- ❖ A todos mis profesores guías, Claudia Vela y Ramón Turruelles.
- ❖ Al profesor Ramón Liriano, por su exigencia, las vivencias y conocimientos transmitidos.
- ❖ A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias que de un modo u otro interactuaron en nuestra enseñanza y formación.
- ❖ A mis compañeros y amigos de aula durante toda la carrera.
- ❖ A los trabajadores de la Empresa LABIOFAM Matanzas.

Muchas gracias

OPINIÓN DEL TUTOR

La estudiante Daniela Ordoñez Barrios comenzó su trabajo de investigación como 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. Desde los inicios mostró responsabilidad, disciplina e independencia para el desarrollo de la parte experimental, obteniendo excelentes resultados en su contribución a la “Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de PROBIOLEV® frente a bacterias productoras de mastitis bovina. Después de realizar la primera parte de la investigación salió embarazada, lo cual no le impidió continuar su trabajo científico con vistas a presentar su trabajo de diploma.

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.

Los resultados que presenta en el día de hoy tienen gran importancia, ya que comprueba la actividad antimicrobiana del biopreparado simbiótico PROBIOLEV® frente a bacterias causantes de la mastitis bovina, una de las enfermedades más costosas de la ganadería cubana. Por otra parte, actualiza el costo del aditivo a escala industrial en función de los cambios provocados por el reordenamiento monetario en el país, elemento básico para desarrollar la transferencia de tecnología a la empresa LABIOFAM Matanzas.

Por todas estas razones solicitamos a este tribunal que tenga en cuenta todos estos aspectos en los resultados de su evaluación.

Resumen

La mastitis bovina una de las enfermedades más costosas de la ganadería en Cuba. Las afectaciones que sufre el ganado bovino y consigo la calidad de la leche son producto de no contar con un sellante del pezón eficaz, capaz de prevenir esta enfermedad. De ahí que el objetivo del presente trabajo fue, evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana del aditivo simbiótico PROBIOLEV® frente a bacterias productoras de la mastitis bovina, para su futura utilización en la prevención de esta enfermedad. Para ello se emplearon las cepas patógenas *Staphylococcus aureus* C1, *Staphylococcus* cogulasa negativa C7, *Corynebacterium* spp C11. y *Escherichia coli*, aislada de vacas con mastitis subclínica. Se desarrollaron dos experimentos con la aplicación de las técnicas de difusión de sustancias en el agar y el establecimiento de los cocultivos. Se realizó además la actualización de la ficha de costo del PROBIOLEV®. Como resultado se demostró el potencial antibacteriano del biopreparado al observarse halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* C1 (15,66 mm), *Staphylococcus* cogulasa negativa C7 (6,67 mm) y *Corynebacterium* spp. (17,23 mm). De igual modo se observó la reducción de la población de estos patógenos a partir de las 8 horas en cultivos asociados con PROBIOLEV®. Se concluye que este biopreparado tiene potencial para evaluarse *in vivo* como sellante del pezón y controlar de forma natural la mastitis bovina. Se determinó que el costo de producción de este aditivo a escala industrial es de 28,72 CUP por litro.

Abstract

Bovine mastitis is one of the most costly diseases in livestock farming in Cuba. The effects suffered by cattle and, consequently, the quality of the milk are the result of not having an effective teat sealant capable of preventing this disease. Hence, the objective of this work was to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of the symbiotic additive PROBIOLEV® against bacteria that produce bovine mastitis, for its future use in the prevention of this disease. For this, the pathogenic strains *Staphylococcus aureus* C1, *Staphylococcus* coagulase negative C7, *Corynebacterium* spp C11 and *Escherichia coli* were used, it isolated from cows with subclinical mastitis. Two experiments were developed with the application of diffusion techniques of substances in agar and the establishment of cocultures. The PROBIOLEV® cost sheet was also updated. As a result, the antibacterial potential of the biopreparation was demonstrated by observing halos of inhibition against *Staphylococcus aureus* C1 (15.66 mm), *Staphylococcus* coagulase negative C7 (6.67 mm) and *Corynebacterium* spp. (17.23mm). Likewise, the reduction in the population of these pathogens was observed after 8 hours in cultures associated with PROBIOLEV®. It is concluded that this biopreparation has the potential to be evaluated *in vivo* as a teat sealant and to naturally control bovine mastitis. It was determined that the production cost of this additive on an industrial scale is 28.72 CUP per liter.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
I.1- Mastitis bovina.....	4
I.1.2 Principales microorganismos productores de mastitis	6
I.1.2.1 Patógenos causantes de la mastitis contagiosa	6
I.1.2.2 Patógenos causantes de la mastitis ambiental	7
I.1.3 Diagnóstico de la incidencia de mastitis	7
I.1.4 Efectos de la mastitis a nivel mundial y en Cuba	9
I.2 Control de la mastitis	10
I.3 Estrategias alternativas para el control de la mastitis bovina. Uso de probióticos	11
I.3.1 Probióticos, prebióticos y simbióticos	11
I.3.2 Microorganismos utilizados como probióticos	12
I.3.3 Modo de acción de los probióticos	14
I.3.4 Principales sustancias utilizadas como prebióticos.....	14
I.3.4.1 Modo de acción de los prebióticos	15
I.3.5 Modo de acción de los simbióticos	16
I.4 Efecto antimicrobiano de los aditivos zootécnicos frente a microorganismos causantes de mastitis. Modo de acción	17
I.5.1 PROBIOLEV®	19
I.5.2 Efecto probiótico de PROBIOLEV® en animales de interés zootécnico	20
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
II.1 Evaluación del efecto antimicrobiano de PROBIOLEV® frente a bacterias patógenas	22
II.1.1 Elaboración del PROBIOLEV®	22
II.1.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de PROBIOLEV® frente a bacterias causantes de la mastitis bovina a través de la técnica de difusión de sustancias en el agar	23
II.2 Evaluación del efecto antibacteriano de PROBIOLEV® en cocultivos con bacterias patógenas causantes de la mastitis bovina	24
II.3 Actualización de la ficha de costo de PROBIOLEV®	25
II.4 Análisis estadístico	26
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
III.1 Actividad antimicrobiana de PROBIOLEV® frente a bacterias causantes de mastitis bovina a través de la técnica de difusión de sustancias en el agar	27

III.2 Actividad antimicrobiana de PROBIOLEV® frente a bacterias causantes de mastitis bovina a través de la técnica de cocultivos	29
III.3 Actualización de la ficha de costo del PROBIOLEV® a escala industrial.....	32
IV. CONCLUSIONES	34
V. RECOMENDACIONES.....	35
V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
VI. ANEXOS.....	47

Introducción

INTRODUCCIÓN

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria, comúnmente es consecuencia de una infección microbiana causada por patógenos que penetran a través del canal del pezón. La mastitis subclínica no posee síntomas que se puedan percibir a simple vista, produce una reducción en el rendimiento de la leche, cuya composición es alterada por la presencia de componentes inflamatorios y bacterias. La falta de un producto antiséptico eficaz como sellante y en algunos casos, el mal manejo del ganado de ordeño, son también algunas de las causas de la presencia de esta enfermedad (Azooz *et al.*, 2020; Sharun *et al.*, 2021).

La mastitis bovina se considera a nivel mundial una de las enfermedades más importantes dentro de los hatos lecheros, debido principalmente a las pérdidas económicas asociadas. La etiología más prevalente son las bacterias, clasificadas en contagiosas y ambientales, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, aunque también es posible encontrar micoplasmas, levaduras, algas y hongos (Bedolla *et al.*, 2020). Hasta la fecha estos patógenos son resistentes a los ingredientes activos más comunes utilizados para el tratamiento de la mastitis. Según estudios recientes, la resistencia a los nuevos antimicrobianos ha aumentado, por lo que es imperativo desarrollar tratamientos alternativos (Morales-Ubaldo *et al.*, 2023).

En estos tiempos la administración de sustancias para el tratamiento de mastitis, se realiza frecuentemente mediante la infusión Intramamaria de antibióticos. Esta fácil aplicación provocó el uso indiscriminado de estos productos en la práctica veterinaria, lo que trajo como consecuencia que las bacterias patógenas se volvieran resistentes a estos fármacos, sin contar la presencia de estas sustancias como residuos en la leche (Peng *et al.*, 2022; Bonardi *et al.*, 2023). De ahí surge la necesidad de encontrar otras alternativas eficientes para reducir los tratamientos con antimicrobianos (Zendejas *et al.*, 2022; Zhumakayeva *et al.*, 2023).

Entre estas alternativas se encuentra la utilización de diferentes sustancias como sellantes del pezón para controlar la entrada de microorganismos patógenos a la glándula mamaria. En Cuba desde hace años se utiliza la PROPOLINA; sin embargo, este preparado ya no resulta efectivo, debido probablemente a que los

microorganismos que provocan la infección crearon cierto nivel de resistencia, ya que continúan las pérdidas económicas causadas por la mastitis. De ahí la necesidad de evaluar nuevos productos que sean efectivos en el control de esta enfermedad.

Entre los diferentes tratamientos alternativos se utilizan extractos de plantas medicinales, aceites esenciales, nanopartículas, polímeros, péptidos o bacteriocinas y probióticos (Morales-Ubaldo *et al.*, 2023). Se conoce que los probióticos son microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, resultan beneficiosos para la salud del hospedero. Estos aditivos digieren los alimentos y compiten con los patógenos por los nutrientes, alteran el pH local para crear un entorno local desfavorable y producen bacteriocinas para inhibir a microorganismos infecciosos. También estimulan el sistema inmune, mejoran la función de barrera intestinal, impiden la adherencia de patógenos y modifican las toxinas derivadas de estos (Guarner *et al.*, 2023).

El presente trabajo constituye una tarea dentro 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. Como resultado de sus investigaciones está la obtención de PROBIOLEV®, un aditivo simbiótico compuesto por un hidrolizado enzimático de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, producido por un crudo enzimático elaborado a partir de un cultivo de *Bacillus subtilis*. Este biopreparado presenta actividad antimicrobiana comprobada frente a diferentes microorganismos patógenos (Pérez, 2000; Rodríguez, 2017), por lo que se ideó su posible utilización como sellante del pezón para prevenir la mastitis bovina.

En la actualidad, investigadores del Centro de estudio trabajan en la transferencia tecnológica de este biopreparado a la Empresa LABIOFAM Matanzas y se hace necesario actualizar la ficha de costo de este aditivo a escala industrial a partir de los cambios provocados por el reordenamiento monetario realizado en el país.

Problema

La mastitis bovina una de las enfermedades más costosas de la ganadería en Cuba. Las afectaciones que sufre el ganado bovino y consigo la calidad de la leche

son producto de no contar con un sellante del pezón eficaz, capaz de controlar o prevenir esta enfermedad.

Hipótesis

La evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del biopreparado simbiótico PROVIOLEV® frente a microorganismos productores de mastitis en vacas lecheras, demuestra su efectividad para prevenir o controlar esta enfermedad.

Objetivo general

Evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana de PROVIOLEV® frente a bacterias productoras de la mastitis bovina.

Objetivos específicos

- 1- Determinar la actividad antimicrobiana de PROVIOLEV® frente a bacterias productoras de mastitis a través del método de la difusión de sustancias en el agar.
- 2- Evaluar el efecto antimicrobiano de PROVIOLEV® frente a bacterias productoras de mastitis a través del método de los cocultivos.
- 3- Actualizar la ficha de costo de PROVIOLEV® para su producción y comercialización.

Revisión bibliográfica

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1- Mastitis bovina

La mastitis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de la glándula mamaria o la ubre, en la cual la inflamación del tejido se produce como respuesta a la invasión de microorganismos patógenos que penetran por el canal del pezón, lo cual genera dolor y estrés en las vacas, y consecuentemente ocasiona la disminución de la producción y la calidad de la leche (Hasan *et al.*, 2022).

Se conoce que las bacterias comensales de la glándula mamaria ayudan al huésped bovino a resistir la colonización de los patógenos mediante varios mecanismos, incluida la competencia por los nutrientes, el acondicionamiento del microecosistema para desfavorecer el crecimiento de patógenos, a través de la producción de ácidos orgánicos, la síntesis de compuestos antimicrobianos, la inhibición de la adhesión a células epiteliales superficiales y a la regulación de la inmunidad del epitelio (Derakhshani *et al.*, 2018) (figura 1).

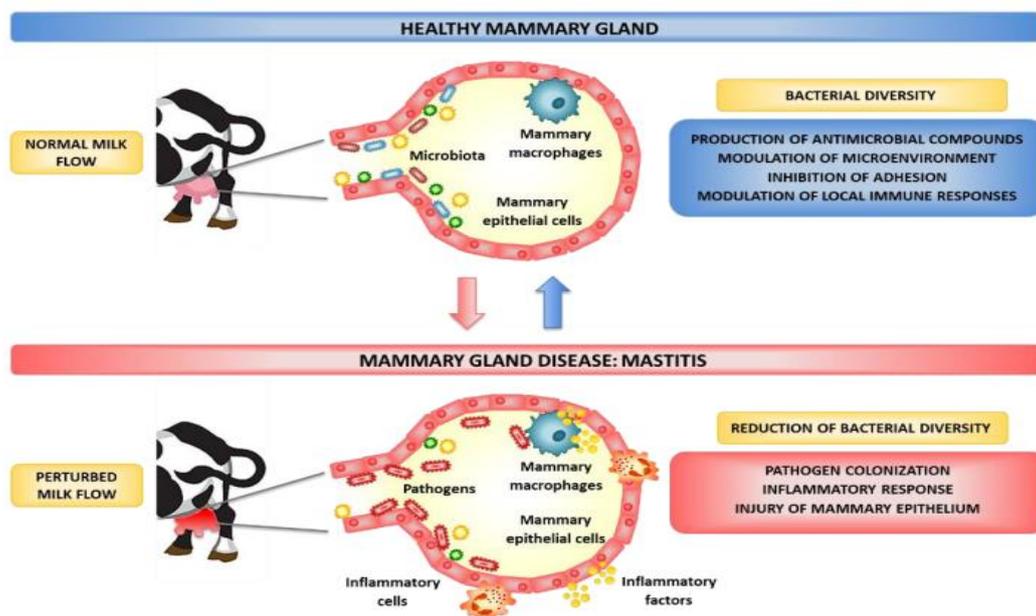


Figura 1. Efecto de la microbiota de la glándula mamaria bovina sobre la susceptibilidad a las infecciones (Fuente: Kober *et al.*, 2022).

La mastitis es una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero, y es una de las enfermedades más importantes que afecta mundialmente a la industria lechera. Ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los ganaderos debido a la disminución del rendimiento de la leche y al aumento del número de tratamientos clínicos y el desecho temprano de vacas, por lo que se reconoce, como la enfermedad más costosa de los hatos lecheros (Bedolla, 2017).

Sin embargo, los microorganismos patógenos causantes de la mastitis provocan una reducción de la diversidad bacteriana al producirse la colonización de bacterias indeseables, se generan procesos de inflamación y se pierde la integridad del epitelio de la glándula mamaria (Kober *et al.*, 2022).

I.1.1 Tipos de mastitis

Bedolla (2017), en su artículo sobre la etiología de la mastitis bovina, expresa que la mastitis bovina normalmente se da como resultado de la infección intramamaria por bacterias que pueden producir la enfermedad de manera clínica o subclínica. Es decir, puede ser acompañada de signos clínicos o no.

La mastitis subclínica se define como la presencia de microorganismos en combinación con el conteo elevado de células somáticas de la leche. La mastitis subclínica no puede percibirse a simple vista, apenas se nota una reducción en el rendimiento de la leche, cuya composición es alertada por componentes inflamatorios y bacterias. La leche tiene apariencia normal, solo en un fondo oscuro se puede observar la presencia de grumos y no hay inflamación en la glándula mamaria. La mastitis, particularmente subclínica y crónica, es la más persistente y común del grupo de las enfermedades, debido a la importancia que tiene la higiene de la leche en el ganado lechero (Giannechini *et al.*, 2002).

La mastitis clínica se caracteriza comúnmente por la observación de los signos clínicos, como anormalidades en la leche y la ubre. Según el tipo de patógeno implicado, la fiebre y el letargo pueden estar asociados a signos claros de inflamación de la glándula mamaria como el enrojecimiento, temperatura, dolor que provocan cambios físicos, químicos y habitualmente bacteriológicos en la leche. Siendo la más costosa ejerciendo un gran impacto en la producción animal, su bienestar y la calidad de la leche (Sharma *et al.*, 2011)

La mastitis clínica también se puede clasificar según su signología, grado de infección y duración en (Anon, 2023b):

Por forma aguda: Pirexia, anorexia, dificultad respiratoria, ubre inflamada, caliente y dolorosa. Cesación de la producción de leche. El exudado es a menudo manchado de sangre.

Forma aguda: ubres hinchadas, cambios en la calidad de la leche. La leche se convierte en cuajada, amarillo, líquido marrón con escamas y coágulos.

Forma subaguda: No hay cambios en el tejido de la ubre.

Forma crónica: la ubre es hemorrágica y fibrótica. Inflamación y palpable linfoma supra mamario. La ubre es gruesa, firme, nodular y atrófica, fluida amarillenta o blanca con coágulos y escamas.

I.1.2 Principales microorganismos productores de mastitis

La mastitis es causada por diferentes especies de bacterias que invaden la ubre mediante acceso por el canal del pezón. Una vez dentro de la glándula, estos microorganismos se multiplican y producen sustancias dañinas que resultan en inflamación, reducción en la producción y alteraciones en la calidad de la leche (Sánchez *et al.*, 2018).

La infección bacteriana intramamaria (IMI) se considera la principal causa de la mastitis bovina. Muchas especies bacterianas han sido identificadas como agentes causantes de mastitis bovina. Estas infecciones bacterianas se pueden clasificar en 2 tipos: contagiosa y ambiental (Lakew, 2019).

I.1.2.1 Patógenos causantes de la mastitis contagiosa

La mastitis contagiosa es causada por microorganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp*; y sus reservorios son la glándula mamaria y la leche de vacas infectadas. Su transmisión puede ocurrir en el momento del ordeño por prácticas como el uso compartido de toallas para lavar y secar las ubres o por medio de las

manos contaminadas de los ordeñadores o por el uso de pezoneras no desinfectadas entre vacas en los ordeños mecánicos (Realpe, 2023).

Los patógenos contagiosos son capaces de establecer infecciones subclínicas, generalmente con elevación del conteo de células somáticas (SCC). El SCC es una indicación útil de infección y está formado por leucocitos (es decir, neutrófilos, macrófagos, linfocitos y eritrocitos) y células epiteliales. Las infecciones contagiosas se pueden controlar reduciendo el contacto entre los reservorios y las vacas no infectadas. Por lo tanto, el mantenimiento adecuado del equipo de ordeño, la desinfección de los pezones, el descarte y la terapia de vaca seca son importantes para prevenir infecciones contagiosas (Cheng *et al.*, 2020).

I.1.2.2 Patógenos causantes de la mastitis ambiental

La mastitis ambiental es originada cuando la vaca se expone a un ambiente sucio, las bacterias que se encuentran en lugares como las camas, el estiércol, el polvo, el lodo o el agua contaminada, colonizan la piel de la ubre y eventualmente ingresan al canal del pezón. Todos estos factores se encuentran altamente influenciados por las prácticas de manejo e higiene de los corrales. Las principales bacterias que la provocan son: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Streptococcus uberis* y *Pseudomonas* spp. (García, 2019).

A diferencia de los patógenos contagiosos, los patógenos ambientales generalmente no viven en la piel de la ubre y los pezones de la vaca; en cambio, existen en el lecho y alojamiento del rebaño. Se los describe mejor como patógenos oportunistas, que buscan la posibilidad de causar una infección. Por ejemplo, pueden entrar en el pezón durante el ordeño debido al deslizamiento de la pezonera, o cuando la inmunidad natural de la vaca es débil, causando mastitis clínica, al invadir y multiplicarse en la ubre de la vaca (Cheng *et al.*, 2020).

I.1.3 Diagnóstico de la incidencia de mastitis

Según Cuellar (2020), antes de abordar las pruebas de diagnóstico para mastitis, es necesario aclarar que estas pueden variar dependiendo de algunos factores, como es el momento de la lactación de la vaca de interés, ya que en el periodo del peri parto (tres semanas antes y tres semanas después del parto) o al final de la

lactación, pueden aparecer niveles elevados de células somáticas que afecten la lectura de la prueba; y por otro lado algunas enfermedades como retículo-peritonitis traumática que también puede incidir en estas pruebas.

Las principales pruebas y métodos para realizar el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino, se encuentran las realizadas en el campo donde se hace referencia al método de observación y palpación de la ubre; la prueba de escudilla de ordeño, prueba de paño negro y tasa probadora las cuales se encargan de diagnosticar mastitis clínica. Por otra parte, están las pruebas químicas dentro de las cuales se encuentran: la prueba de conductividad eléctrica de la leche; el papel indicador de mastitis y la prueba de Whiteside, que sirven también para diagnosticar mastitis clínicas y subclínicas. Entre las pruebas biológicas se destacan la prueba de California para mastitis (CMT), la prueba de Wisconsin para mastitis (WMT), el monitoreo de células somáticas y el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, pruebas bioquímicas e identificación, así como al conteo de células somáticas por microscopía directa (Bedolla 2018).

En la figura 2 se define que para diagnosticar la enfermedad se realizan pruebas de campo y análisis microbiológicos los que se resumen a continuación:



Figura 2. Pruebas realizadas para diagnosticar la mastitis bovina. Pruebas de campo: Presencia o ausencia de síntomas y el uso de la paleta para el test 1- Paleta requerida para la California mastitis Test (CMT). 2- Análisis microbiológico a través del recuento en placa y recuento por el número más probable (Fuente: Cuellar, 2020).

I.1.4 Efectos de la mastitis a nivel mundial y en Cuba

A nivel mundial la mastitis representa grandes pérdidas productivas y económicas en ganado lechero (Ruiz *et al.*, 2016). La mastitis por sí misma es la enfermedad más costosa del ganado lechero. En total, las pérdidas económicas de las mastitis subclínicas exceden aquellas causadas por la mastitis clínica. Las pérdidas económicas que se producen como resultado de una producción de leche reducida han sido predichas basándose en el conteo de células somáticas. Si el promedio de producción de un hato es 7.000 kg / vaca /año, esto significa que un promedio de conteo de células somáticas de 1.000.000, es un indicativo de pérdidas de producción de $(7.000 \times 18/100=)$ 1.260 kilogramos por vaca y a un conteo de 500.000 representa una pérdida de 420 kilos por año (Vicente *et al.*, 2019).

Según Izurieta (2020), la mastitis es la enfermedad más costosa del ganado lechero. En hatos sin un programa de control se infectan aproximadamente un 40% de las vacas en producción. Los costos llegan a US\$ 200 dólares por vaca al año, cifra que puede aumentar o disminuir de acuerdo con la prevalencia de la infección. Para determinar cuánto cuesta la enfermedad en el hato se tiene en cuenta: la reducción de la producción de leche, la cual representa un 70% de la pérdida total asociada a la mastitis, sea esta clínica o subclínica, el costo del tratamiento, la leche descartada, la muerte o descarte prematuro del animal, la disminución del avance genético y la disminución de la calidad de la leche.

Estudios realizados por la NDSU (North Dakota State University) expresan cuantiosas pérdidas en la industria láctea debido a la presencia de mastitis en sus rebaños. Según reportes de dicha investigación, el costo anual total de la enfermedad se aproxima a \$ 1,8 mil millones de dólares. Esto representa aproximadamente el 10% del valor total de las ventas de leche de granja, y estiman que dos tercios de esta pérdida se debe a la reducción de la producción de leche en las vacas infectadas de forma subclínica (Schroeder, 2012).

En una valoración económica realizada por Vissio *et al.*, (2015) en Córdoba, Argentina se determinó que las pérdidas por mastitis subclínica representan un promedio del 87% del costo total calculado para esta enfermedad. Por su parte, Romero (2016) expresó, que este tipo de mastitis es la que más afecta a los

pequeños productores en Colombia. En correspondencia con lo anteriormente planteado, los estudios realizados por Ruiz *et al.*, (2012) en Cuba, manifestaron que la mayor prevalencia (75%) corresponde a esta misma forma de presentación de la enfermedad (subclínica).

I.2 Control de la mastitis

Gonzales (2018) elaboró un plan que consta de seis puntos, que tienen como objetivo controlar la mastitis en establecimientos lecheros. Entre estos están:

- 1- Buena higiene en la preparación de la ubre.
- 2- Uso de equipos de ordeño controlados y chequeados.
- 3- Desinfección de los pezones después del ordeño.
- 4- Detección y tratamiento de los cascos clínicos.
- 5- Tratamiento al secado de todos los cuartos.
- 6- Eliminación de los cascos clínicos.

Los antibióticos se utilizan en la producción ganadera intensiva con fines terapéuticos y profilácticos, y se estima que más del 50 % de todos los antimicrobianos se utilizan en medicina veterinaria a nivel mundial. La administración de antibióticos se puede realizar mediante la aplicación local de preparados intramamarios, así como la aplicación sistémica de estos antimicrobianos (Kovačević *et al.*, 2022).

Sin embargo, el uso irracional de antibióticos frecuentemente resulta en la aparición de resistencia a estas sustancias en las bacterias patógenas, lo que representa una grave amenaza para el bienestar del ganado lechero. Además, esta problemática podría plantear graves riesgos para la salud pública debido a la propagación de infecciones bacterianas por resistencia a los antimicrobianos y residuos de medicamentos a través del consumo de leche cruda de vacas que han recibido tratamiento con antibióticos. Otro problema importante para el sector lácteo es que la presencia de residuos de antibióticos en la leche puede interferir con el proceso

de fermentación, particularmente en la producción de queso y yogur (Kour *et al.*, 2023).

I.3 Estrategias alternativas para el control de la mastitis bovina. Uso de probióticos

Actualmente, la mayoría de las estrategias de manejo de la mastitis bovina se centran en la prevención durante el ordeño al seguir prácticas higiénicas de ordeño y un buen sistema de manejo. Otros enfoques alternativos para el control de esta enfermedad incluyen vacunación, antibióticos, inmunoterapia, bacteriocinas, bacteriófagos, péptidos antimicrobianos, terapia con células madre, factores secretorios nativos, dieta, vaca seca y terapia de lactancia, selección genética, productos botánicos, terapia basada en tecnología de nanopartículas y probióticos (Sharun *et al.*, 2021).

I.3.1 Probióticos, prebióticos y simbióticos

La definición actual formulada en 2002 por los expertos del grupo de trabajo de la FAO y la OMS establece que los **probióticos** son “cepas vivas de microorganismos estrictamente seleccionados que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador” Schrezenmeir & dr Vrese (2001). La definición fue refrendada en 2013 por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP). El término “probiótico” está reservado para fórmulas o productos que cumplen con criterios estrictamente definidos. El más importante de estos criterios incluye: un recuento apropiado de células viables, un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador (que también puede implicar la estimulación del crecimiento) y un efecto beneficioso sobre la función del tracto digestivo (Markowiak y Śliżewska, 2018).

Para incrementar la población beneficiosa y los microorganismos probióticos se emplean además los **prebióticos**. Estos son compuestos no digeribles que, a través de su metabolización por microorganismos en el intestino, modula la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, confiriendo así un efecto fisiológico beneficioso sobre el huésped” (Bindels *et al.*, 2015).

También en la nutrición animal se utilizan fórmulas que contienen tanto probióticos como prebióticos. En 1995, Gibson y Roberfroid introdujeron el término “**simbiótico**” especificando de esta manera “una mezcla de probióticos y prebióticos que afecta beneficiosamente al huésped mejorando la supervivencia y la implantación de suplementos dietéticos microbianos vivos en el tracto gastrointestinal, estimulando selectivamente el crecimiento y/o activación del metabolismo de una o un número limitado de bacterias promotoras de la salud, al mejorar así el bienestar del huésped”. Como la palabra "simbiótico" implica sinergia, el término debe reservarse para aquellos productos en los que un componente prebiótico favorece selectivamente a un microorganismo probiótico (Markowiak & Śliżewska, 2018).

I.3.2 Microorganismos utilizados como probióticos

Como se aprecia en la tabla 1 son numerosas las especies de microorganismos que se utilizan como probióticos en la producción animal. De forma general los probióticos presentan actividad antimicrobiana, ya que producen sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos como antibióticos, bacteriocinas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno; impiden la adherencia y colonización de estos a través de la exclusión competitiva, competencia por nutrientes, o la estimulación del sistema inmune, con su presencia en la primera barrera de defensa o induciendo la activación de las células inmunes (linfocitos T, linfocitos B, células *natural killer*, macrófagos) para la producción de Inmunoglobulinas. También pueden coagregarse a las células patógenas (Kamel *et al.*, 2022).

Tabla 1. Microorganismos probióticos destinados principalmente a la producción animal (EFSA, 2017).

Tipo <i>Lactobacillus</i>	Tipo <i>Bifidobacterium</i>	Otras bacterias ácido lácticas	Otros microorganismos
<i>L. brevis</i> ^a	<i>B. animalis</i> ^a	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei</i> ^a	<i>B. longum</i> ^a	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> ^a
<i>L. crispatus</i> ^a	<i>B. pseudolongum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ^a	<i>Bacillus subtilis</i> ^a
<i>L. farciminis</i> ^a	<i>B. thermophilum</i>	<i>Leuconostoc citreum</i> ^a	<i>Propionibact.</i> <i>Freudenreichi</i> ^a
<i>L. fermentum</i> ^a		<i>Leuconostoc lactis</i> ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. murinus</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ^a	<i>Saccharomyces pastorianus</i> ^a
<i>L. gallinarium</i> ^a		<i>Pediococcus acidilactici</i> ^a	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
<i>L. paracasei</i> ^a		<i>Pediococcus pentosaceus</i> ^a	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ^a
<i>L. pentosus</i> ^a		<i>Streptococcus infantarius</i>	<i>Aspergillus orizae</i>
<i>L. plantarum</i> ^a		<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>L. reuteri</i> ^a		<i>Streptococcus thermophilus</i> ^a	
<i>L. rhamnosus</i> ^a		<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. salivarius</i> ^a			

I.3.3 Modo de acción de los probióticos

En la figura 3 se presenta un diagrama esquemático que ilustra los mecanismos potenciales o conocidos mediante los cuales las bacterias probióticas podrían afectar la microbiota. Estos mecanismos incluyen (1) competencia por ingredientes dietéticos como sustratos de crecimiento, (2) bioconversión de, por ejemplo, azúcares en productos de la fermentación con propiedades inhibitoras, (3) producción de sustratos de crecimiento, por ejemplo, vitaminas, para otras bacterias, (4) antagonismo directo por bacteriocinas, (5) exclusión competitiva de los sitios de unión, (6) función de barrera mejorada, (7) reducción de la inflamación, alterando así las propiedades intestinales para la colonización y persistencia interna, y (8) estimulación de la respuesta inmune innata, con la activación de las células dendríticas (DC), linfocitos T (T), linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas A (IG A).

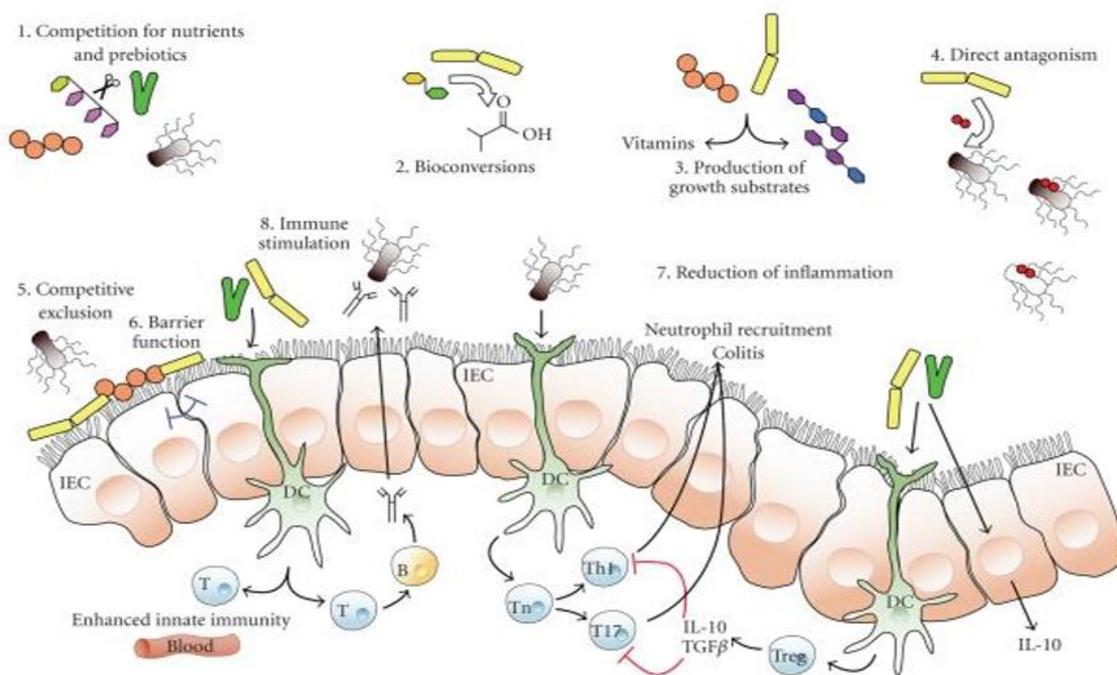


Figura 3. Mecanismos de acción de los probióticos (Fuente: Khalighi *et al.*, 2016).

I.3.4 Principales sustancias utilizadas como prebióticos

Solo unos pocos compuestos del grupo de los carbohidratos, como los β -fructanos de cadena corta y larga como los fructooligosacáridos (FOS) e inulina, lactulosa y los galactooligosacáridos (GOS), pueden clasificarse como prebióticos. En la

literatura también se incluyen oligosacáridos derivados del almidón y la glucosa y otros y otros oligosacáridos que no son carbohidratos (Davani-Davari *et al.*, 2019).

I.3.4.1 Modo de acción de los prebióticos

En general, en el intestino, la falta de enzimas que hidrolizan los enlaces poliméricos de los prebióticos les permite permanecer en el tracto gastrointestinal para resistir la digestión en el intestino delgado. Luego, el organismo transporta estos prebióticos intactos al intestino grueso, donde la flora intestinal los degrada y los fermenta selectivamente para producir ciertos metabolitos secundarios, que son absorbidos por el epitelio intestinal o transportados al hígado a través de la vena porta y pueden tener efectos beneficiosos. También inciden sobre los procesos fisiológicos del huésped, como regular la inmunidad, resistir patógenos, mejorar la función de la barrera intestinal, aumentar la absorción de minerales y reducir los niveles de lípidos en sangre. Una ventaja específica de los prebióticos se refiere a la promoción del crecimiento de microorganismos diana. Después del consumo de prebióticos específicos (p. ej., inulina, FOS y GOS), se promueve el crecimiento de microbiota beneficiosa para competir con otras especies al proteger o incrementar la producción de productos de fermentación beneficiosos (You *et al.*, 2022). Los posibles mecanismos por los cuales los prebióticos promueven beneficios para la salud se muestran en la figura 4.

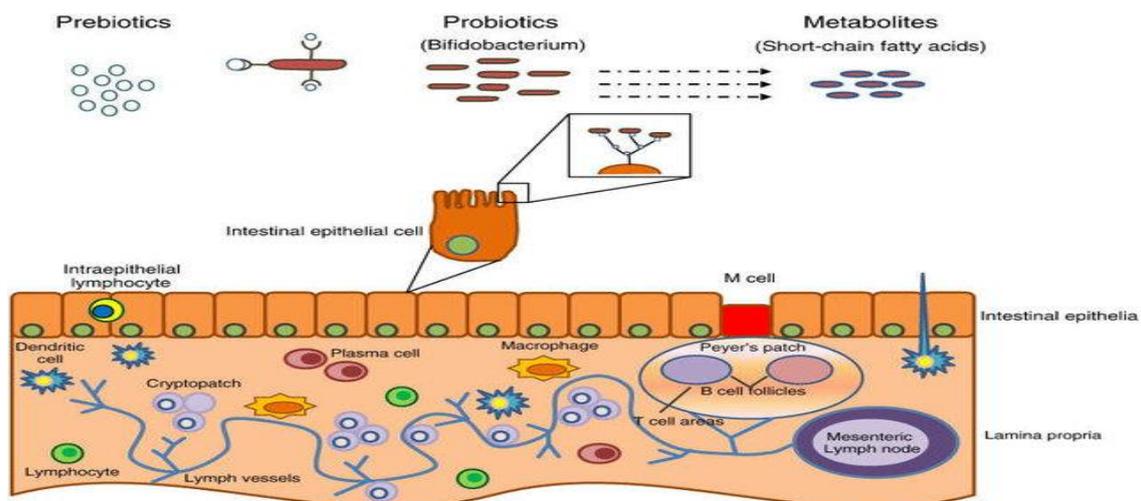


Figura 4. Modo de acción de los prebióticos (Fuente: Mtasher *et al.*, 2018).

I.3.5 Modo de acción de los simbióticos

Recientemente, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos ha actualizado el concepto de simbióticos por parte de un panel de expertos. Según ellos, los simbióticos son de dos tipos, complementarios y sinérgicos. Un simbiótico complementario consiste en un probiótico y un prebiótico que juntos confieren uno o más beneficios para la salud, pero no requieren funciones codependientes. Un simbiótico sinérgico contiene un sustrato que es utilizado selectivamente por microorganismos (Swanson, 2020).

Hay varios informes disponibles que sugieren que los aditivos simbióticos estimulan positivamente la salud y la nutrición del huésped. Se conoce que los simbióticos no sólo aumentan el número de bacterias probióticas, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en muestras fecales, también reducen a los coliformes. Por otra parte, aumentan el nivel de enzimas digestivas como lactasa, lipasa, sacarasa y isomaltasa en el intestino (Yadav *et al.*, 2022).

En la figura 5 se puede observar cómo los aditivos simbióticos promueven la supervivencia de los microorganismos probióticos y contribuyen a la exclusión de los patógenos al impedir su translocación a través de los espacios intersticiales del tejido epitelial.

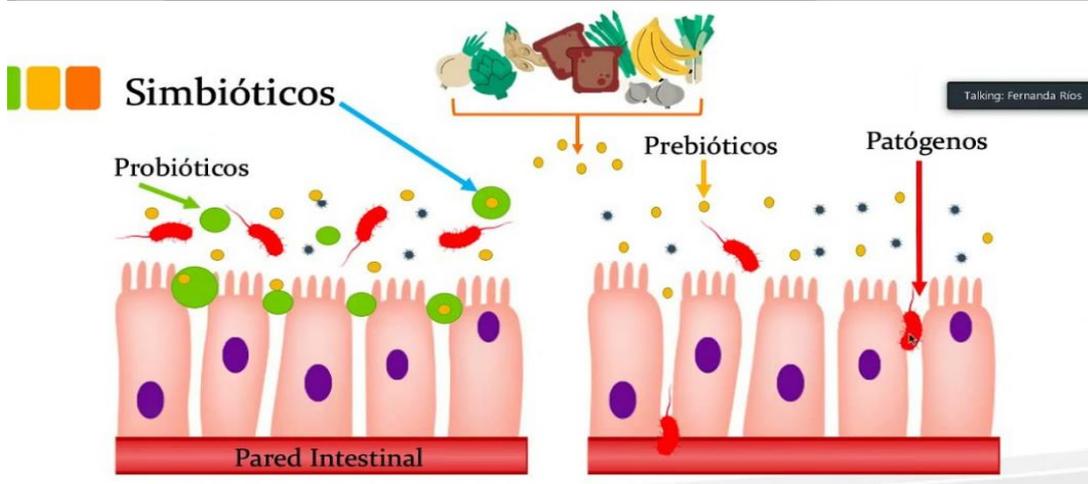


Figura 5. Modo de acción de los simbióticos que promueve mayor supervivencia e implantación de los probióticos (Fuente: Anon, 2023c).

I.4 Efecto antimicrobiano de los aditivos zotécnicos frente a microorganismos causantes de mastitis. Modo de acción

Estudios recientes revelaron que los probióticos pueden usarse como una herramienta novedosa para tratar o prevenir la mastitis bovina y al mismo tiempo abordar el problema de la resistencia a los antimicrobianos (Fukuyama *et al.*, 2020). En la figura 6 se aprecia la acción de los probióticos en la glándula mamaria con capacidades inmunomoduladoras o inmunobióticos. Se plantea que estos microorganismos actúan a través de la producción de sustancias antimicrobianas, inhiben la adhesión de los patógenos y modulan el microambiente, al incrementar la microbiota beneficiosa en este ecosistema.

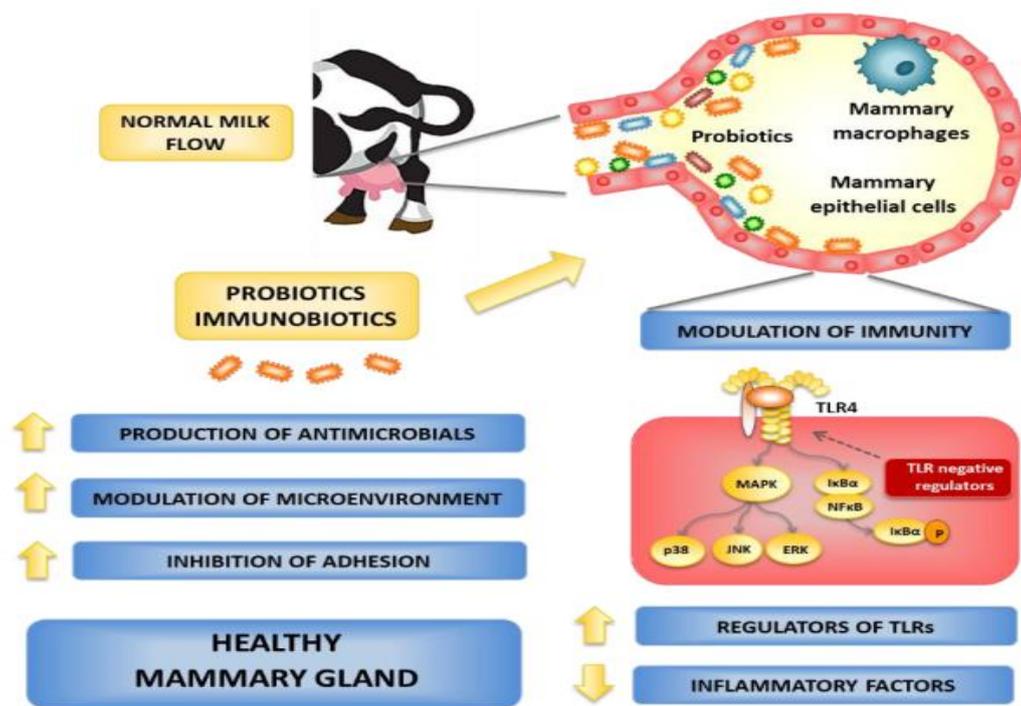


Figura 6. Efecto de los microorganismos probióticos e inmunobióticos sobre la susceptibilidad a las infecciones de la glándula mamaria bovina (Fuente: Kober *et al.*, 2022).

En los últimos años se reconoce el género *Bacillus* spp. por el potencial que posee para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana. Estas sustancias antimicrobianas son biopéptidos con diferente estructura química, que se utilizan como agentes terapéuticos contra bacterias y hongos patógenos, capaces de actuar sobre microorganismos de diversa etiología. El efecto bio-

controlador que ejerce *Bacillus* pp., es el resultado de diversos mecanismos, entre los que se encuentra la antibiosis, que se produce debido a la producción de péptidos, lipopéptidos y fosfolípidos (Kadaikunnan *et al.*, 2015). En el caso del ganado bovino, los ensayos demuestran un efecto positivo, sobre todo en la calidad de la leche. Lo interesante es que la comunidad científica aquí apuesta por el PROBIOLEV® en el sentido de consolidarlo como un aditivo en la alimentación animal y una nada despreciable fuente de sustitución de importaciones ya que se trata de un nuevo producto de interés veterinario que puede incrementar la cartera de exportaciones de la Mayor de las Antillas (Perulactea, 2015).

Desde hace muchos años, *Saccharomyces cerevisiae* se emplea en diferentes procesos industriales. Su utilización como aditivo natural, capaz de ejercer efectos beneficiosos en la salud y la productividad de los individuos que la consumen, está bien documentada (Van-Staden y Dicks, 2012; Purdum y Hahn-Didde, 2016).

Las bacteriocinas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, consideradas benéficas para la salud y la producción de alimentos. Se secretan extracelularmente y no son tóxicas para las células eucariotas. Además, ellas presentan alta actividad bactericida o bacteriostática en cepas o especies relacionadas, en microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos (Cotter *et al.*, 2005 y Svetoch *et al.*, 2011).

El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cistina y, de acuerdo con ello, se establecen tres grupos: I- bacteriocinas con un estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie; II- bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram-Positivas; y III- bacteriocinas con amplio rango de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de bacterias Gram-Positivas (Cintas *et al.*, 2001). Sin embargo, Elegado *et al.* (2004) y Bizani *et al.* (2005) en sus estudios sobre el espectro de acción, determinaron la presencia de bacteriocinas capaces de actuar contra gérmenes Gram- negativos.

La inhibición o muerte de los microorganismos patógenos también puede desencadenarse debido a la producción de antibióticos. Los representantes del género *Bacillus* spp. se destacan por la producción de una amplia gama de

antimicrobianos lipopeptídicos (Cho *et al.*, 2011). Estos se diferencian por su estructura química, pero también, por los diferentes mecanismos que ejercen en las bacterias patógenas como: destrucción de la pared de la célula patógena, desintegración de la membrana bacteriana, inhibición de la síntesis proteica, del metabolismo de los ácidos nucleicos y del intermediario (Preeti *et al.*, 2006).

I.5.1 PROBIOLEV®

En el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas (CEBIO), Pérez (2000) desarrolló la hidrólisis de *S. cerevisiae* mediante el método enzimático, con el objetivo de obtener un aditivo simbiótico para la alimentación animal. Este proceso se logró a partir de la aplicación de enzimas hidrolíticas producidas por un cultivo de *Bacillus subtilis* cepa E-44 a estas levaduras. Este procedimiento permitió la presencia, entre otros compuestos, de oligosacáridos de glucanos y mananos (prebióticos) y células viables de *Bacillus subtilis* y sus endosporas (probiótico); composición que permite considerar al biopreparado con alto potencial de actividad sinérgica.

PROBIOLEV® se produjo a partir de materias primas de bajo costo y alta disponibilidad en el país. La originalidad de la investigación radicó en el procedimiento de obtención de este biopreparado, que utiliza la crema de levadura (*S. cerevisiae*), procedente del fondaje de cubetas de la destilería de alcohol, con un crudo enzimático conformado por enzimas hidrolíticas producidas por un cultivo de *Bacillus subtilis* E-44. El empleo de estas sustancias se aprobó por el Código de Regulaciones Federales de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) y los cultivos de esta especie se consideran cepas GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras), según el criterio expuesto por la *Association of American Feed Control Officials* (Anon, 1998).

Entre los microorganismos que más se utilizan como probióticos están representantes del género *Bacillus* sp., ya que marcan una importante función en la producción de sustancias antimicrobianas del tipo bacteriocinas o antibióticos que inhiben a microorganismos patógenos (Rodríguez, 2017).

I.5.2 Efecto probiótico de PROBIOLEV® en animales de interés zootécnico

El primer trabajo que reporta el nivel de inclusión de PROBIOLEV® en el alimento lo realizó Pérez (2000), quien evaluó la aplicación de este hidrolizado enzimático de levaduras en pollos de ceba. Este autor trabajó con diferentes dosis en la alimentación de estas aves. Para ello desarrolló un experimento donde aplicó 50, 75 y 100 mL.kg⁻¹ de alimento. De esta manera se demostró que la dosis más idónea fue de 75 mL, ya que las aves mejoraron los indicadores productivos y la salud. De igual manera Piad (2001) suministró esta dosis en pollitas de reemplazo de ponedoras, donde obtuvo excelentes resultados en la reproducción, el rendimiento productivo y la salud.

Pérez (2010) evaluó el efecto en cerdos durante la etapa de lactancia y crecimiento con la dosis de 100 mL por kg de alimento. Este autor comprobó que se incrementó el peso vivo de los animales, la ganancia media diaria y la mejora de la conversión alimenticia. De igual manera provocó la disminución de la población de coliformes en el ciego de estos animales.

Galindo *et al.* (2010), evaluaron el efecto de un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la población microbiana ruminal. Para ello se condujo un experimento en condiciones *in vitro*. Se utilizó la técnica de cultivo sumergido con agitación mecánica. Los tratamientos correspondieron a los niveles de hidrolizado que se emplearon: A) 0 (control), B) 75 mL.kg⁻¹ de concentrado.d⁻¹ y C) 100 mL.kg⁻¹ de concentrado.d⁻¹. Como sustrato a fermentar se utilizó *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT- 115, de 112 d de rebrote. La población de bacterias viables totales fue de 20.89, 22.37 y 50.47 x 10¹¹ ufc.mL⁻¹, para los tratamientos A, B y C, respectivamente. Se encontró interacción significativa entre los tratamientos y diferentes tiempos de fermentación para las bacterias celulolíticas. Sus mayores poblaciones se encontraron a las 4 h después de iniciada la fermentación en los tratamientos donde se suministró 75 y 100 mL.kg⁻¹ de concentrado/d. No hubo efecto del hidrolizado en la población de bacterias proteolíticas, hongos y pH del rumen. Estos autores concluyeron que el hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae* incrementa la población total de bacterias del rumen y es capaz de activar la población de bacterias celulíticas en las horas de máxima fermentación, resultado que pudiera contribuir a una mayor degradación de la fibra en los rumiantes.

Beruvides *et al.* (2018) realizaron un experimento en una unidad porcina, con el objetivo de evaluar el efecto probiótico de un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en el comportamiento productivo y de salud en cerdos en preceba. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado y se formaron dos grupos: un control y el otro con dosis de 5 mL.g⁻¹ peso vivo. La inclusión del producto en la alimentación de estos animales mejoró la ganancia media diaria y la conversión alimentaria y disminuyó la incidencia de diarreas provocada por bacterias patógenas y la mortalidad de los animales.

Por su parte Valenciaga *et al.* (2019) determinaron el efecto del hidrolizado enzimático de levadura *Sacharomyces cerevisiae* (PROBIOLEV®) en la cinética de degradación ruminal de nutrientes del forraje de *Cenchrus purpureus* vc. OM - 22, en vacas Holstein canuladas en el rumen, que consumieron forraje fresco a voluntad y concentrado comercial. Los tratamientos fueron: Control (forraje + 2 kg concentrado comercial) y tratamientos 2, 3 y 4 (forraje + 2 kg concentrado comercial + dosis de 50 mL, 100 mL o 150 mL de hidrolizado.kg⁻¹ de concentrado.d⁻¹, respectivamente). De esta investigación se concluyó que, la adición del hidrolizado tuvo efecto positivo en la cinética de degradación ruminal del forraje. Los autores recomendaron la utilización de 100 mL de hidrolizado enzimático. kg⁻¹ de concentrado. d⁻¹ en rumiantes que consumen dietas con alto contenido de fibra.

Este aditivo se evaluó por otros investigadores (Rodríguez, 2017) con excelentes resultados en los indicadores productivos y en la salud de los animales. Sin embargo, a pesar de la comprobada efectividad antimicrobiana de estos productos, no se ha evaluado su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas procedentes de vacas con mastitis, con la perspectiva de que sean utilizados como sellante del pezón para la prevención de esta enfermedad.

Materiales y métodos

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Evaluación del efecto antimicrobiano de PROBIOLEV® frente a bacterias patógenas

II.1.1 Elaboración del PROBIOLEV®

A partir de la metodología descrita para la elaboración de PROBIOLEV® por Pérez (2000), se obtuvo el biopreparado, el cual se conservó en refrigeración a 4°C hasta su utilización. En la figura 7 se muestra el procedimiento para la obtención de este aditivo a escala industrial.

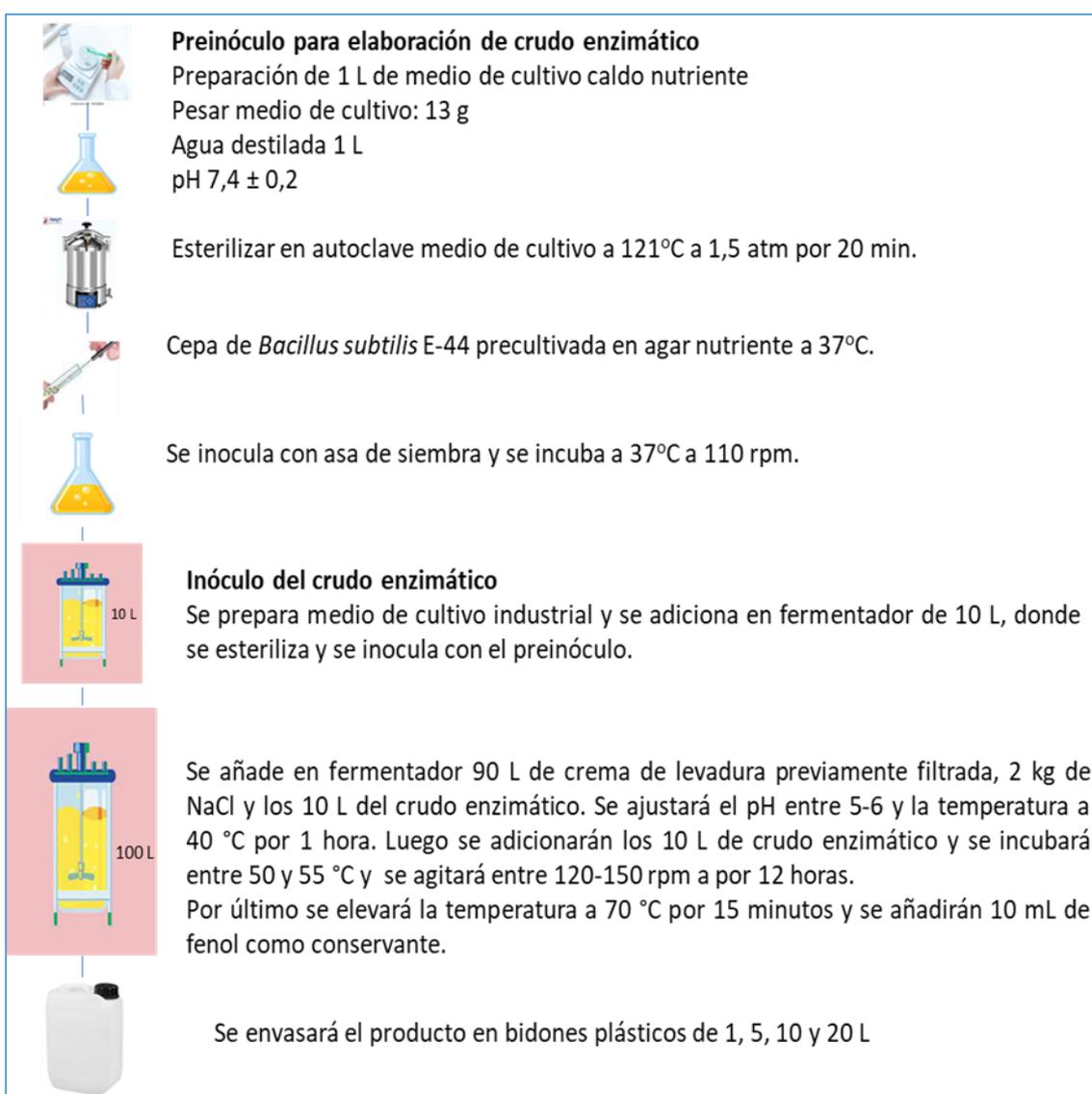


Figura 7. Esquema de la metodología para la producción de PROBIOLEV® a escala de producción.

II.1.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de PROBIOLEV® frente a bacterias causantes de la mastitis bovina a través de la técnica de difusión de sustancias en el agar

Para evaluar la actividad antibacteriana de PROBIOLEV® se empleó la técnica de difusión de sustancias en agar, propuesta por Schillinger y Lucke (1989). En la figura 8 se presenta un esquema que demuestra la secuencia que se siguió para el desarrollo de esta técnica.

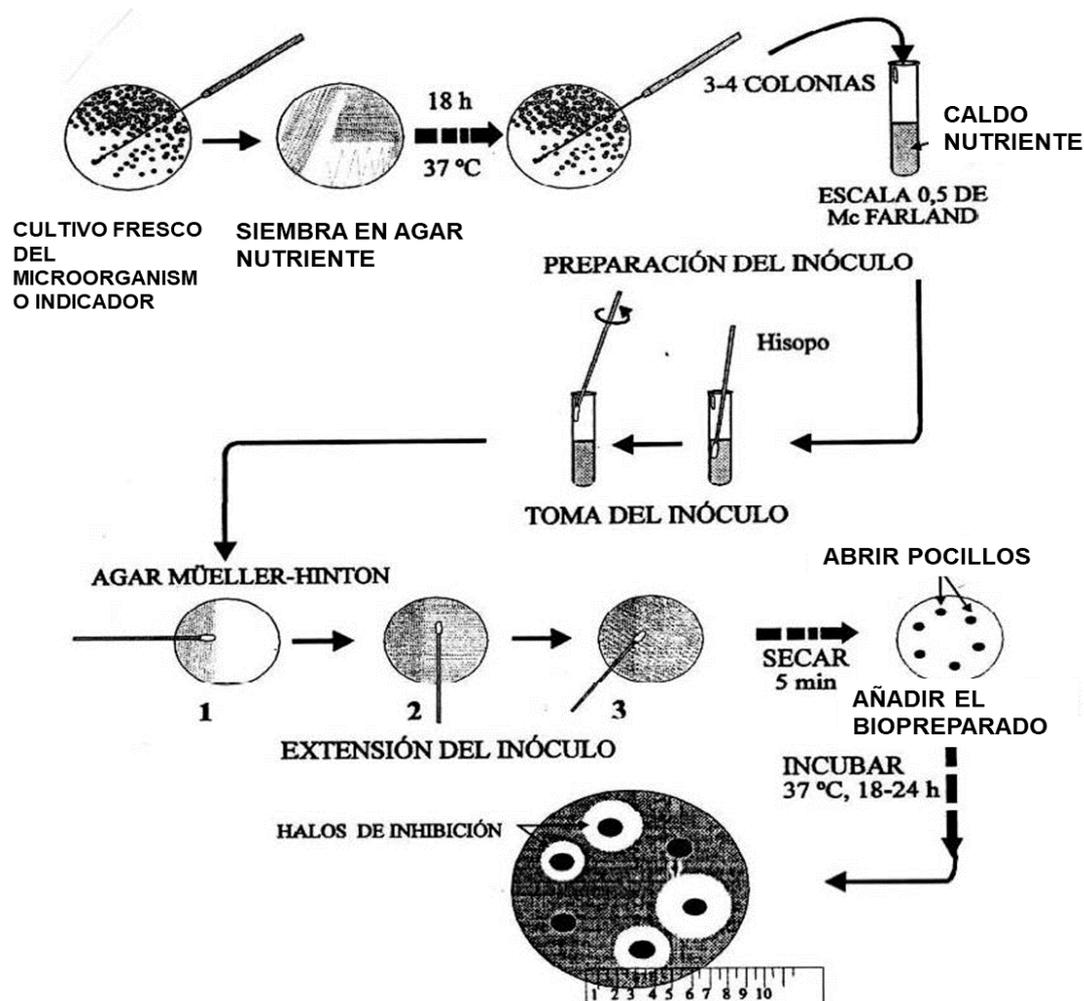


Figura 8. Secuencia experimental para determinar la actividad antimicrobiana a través de la técnica de difusión de sustancias en el agar. (Fuente: Anon, 2023a).

Tratamiento de las cepas indicadoras

Como cepas indicadoras se utilizaron las cepas patógenas: *Staphylococcus aureus* C1, *Staphylococcus coagulasa negativo* C7, *Corynebacterium* sp. C11 y *Escherichia coli*, todas procedentes del cepario del Laboratorio de Microbiología de

la Universidad de Matanzas. Las cepas 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.

Desarrollo de la técnica de difusión en agar

Se tomaron 200 µL del cultivo de las cepas indicadoras en estudio, que estaban en la escala 0,5 de MacFarland y se inocularon en placas que contenían agar Mueller Hinton (BIOCEN) con el empleo de hisopos estériles. Con ayuda de un sacabocado metálico estéril, se abrieron pocillos de 5 mm de diámetro donde se añadieron 100 µL del biopreparado PROBIOLEV®. Dichas placas se mantuvieron en refrigeración (4°C) por 4 horas para mayor difusión de las sustancias en el agar. Posteriormente, las placas se incubaron entre 18 y 24 horas a 37°C hasta detectar el crecimiento y la aparición de los halos. Por último, se midió el halo con regla milimetrada y se le restó el diámetro de los pocillos.

II.2 Evaluación del efecto antibacteriano de PROBIOLEV® en cocultivos con bacterias patógenas causantes de la mastitis bovina

La actividad antagónica de PROBIOLEV® se estudió mediante cultivos asociados o mezclas de cultivos con las cepas patógenas que fueron inhibidas en el ensayo anterior. Se utilizó la técnica descrita por Orlowski y Bielecka (2006), modificada por Rodríguez (2017). El desarrollo del cocultivo tuvo lugar en caldo leche, medio de cultivo que simula el contenido de la glándula mamaria. Este se adicionó en erlenmeyer de 250 mL, a razón de 100 mL de volumen efectivo. En cada uno se añadieron 5 mL de PROBIOLEV® y 4 mL del cultivo del microorganismo patógeno o indicador (con una población de 10^6 UFC.mL⁻¹). Una vez mezclados, los cocultivos se incubaron en condiciones estáticas durante 24 h a 37°C y se tomaron muestras a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h para realizar diluciones seriadas en caldo peptona (1%) y la siembra en placas las que se incubaron por 24 h a 37°C. El conteo de viables se realizó en placas que contenían medios selectivos para cada cepa indicadora. En la tabla 2 se aprecian los medios utilizados y las características de las colonias de las bacterias patógenas.

Tabla 2. Características de las colonias bacterianas de las cepas indicadoras en los medios selectivos empleados para el conteo de viables (Hispanlab 1998 y Anon, 2006).

Cepas indicadoras	Medios selectivos empleados	Características de las colonias
<i>Staphylococcus aureus</i> C1	Agar manitol salado	Grandes y rodeadas de zona amarilla (cepas patógenas)
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulasa negativo C7	Agar manitol salado	Grandes y rodeadas de zona amarilla (cepas patógenas)
<i>Corynebacterium</i> C11	Sereum Tellurite Agar	Colonias de color gris a negro; con centros oscuros; de lisas a rugosas, planas

Cepas indicadoras

Las cepas indicadoras se inocularon en caldo nutriente enriquecido (Hispanlab, España) y se incubaron en zaranda termostata (UNITRONIC 320 OR) a 110 rpm durante 18 h a 37°C

II.3 Actualización de la ficha de costo de PROBIOLEV®

Esta actualización se hace necesaria, puesto que el país sufrió cambios de reordenamiento comercial y financiero, donde los precios de todos los productos aumentaron según sus costos en el mercado internacional o derivado del costo de las materias primas para su confección en Cuba. Este aditivo zootécnico se encuentra en transferencia de tecnología con la Empresa productora LABIOFAM de Matanzas para su producción y comercialización, por lo que se es indispensable tener un valor actualizado del producto.

Para su elaboración se buscaron los datos actuales del precio de cada componente del biopreparado y los gastos incurridos en su producción. Este trabajo se realizó en la Empresa LABIOFAM Matanzas a partir de los datos de tres lotes producidos

por la empresa para la toma de muestras con vistas a la aprobación del Registro sanitario de este aditivo.

II.4 Análisis estadístico

Para procesar los resultados de la actividad antibacteriana se utilizó un análisis de varianza simple. El paquete estadístico que se utilizó fue INFOSTAT, Versión 2012 (Di Rienzo *et al.*, 2012). Para verificar las diferencias se empleó la dócima de comparación de Duncan (1955).

La viabilidad del biopreparado probiótico se transformó a logaritmo LN para establecer la normalidad de los datos.

Resultados y discusión

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Actividad antimicrobiana de PROBIOLEV® frente a bacterias causantes de mastitis bovina a través de la técnica de difusión de sustancias en el agar

En la tabla 3 se muestra el resultado del efecto de los dos biopreparados frente a cuatro cepas aisladas por Garrote (2020), a partir de las glándulas mamarias de vacas con mastitis subclínica. Se aprecia que el PROBIOLEV provocó mayores ($P < 0,005$) halos de inhibición en *Corynebacterium* spp. C11 y *Staphylococcus aureus* C1; sin embargo, no se observó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* (Anexo 1).

Tabla 3. Efecto antimicrobiano de PROBIOLEV® frente a bacterias patógenas causantes de la mastitis bovina.

Cepas patógenas	PROBIOLEV® (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> C1	15,66 ^a
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i> C7	6,67 ^b
<i>Corynebacterium</i> sp. C11	17,23 ^a
<i>Escherichia coli</i> .	NI
P	0,0033
±EE	1,25

Ni- No inhibición. Letras diferentes representan diferencias para $P < 0,05$ (Duncan, 1955).

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. Se conoce que la actividad antimicrobiana *in vitro* puede estar dada por la producción de sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno (Eviwie *et al.*, 2019).

A partir de los resultados del presente trabajo, se pudiera evaluar el efecto de estos aditivos en la prevención de esta enfermedad *in vivo*, ya que este microorganismo patógeno se reporta entre los principales agentes causales de esta infección.

PROBIOLEV es un aditivo constituido por un hidrolizado de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, producido a partir de enzimas sintetizadas por *Bacillus subtilis*. Estudios realizados por Vondruskova *et al.* (2010) y Ansari *et al.* (2012) demuestran que diferentes cepas de *B. subtilis* son capaces de generar sustancias como la bacitracina, polimixina, difficidina, subtilina y mycobacillina, antibióticos que inhiben el crecimiento de numerosos patógenos de los animales.

Gálvez *et al.* (2011) destacan que los miembros del género *Bacillus* spp. son excelentes productores de péptidos, lipopéptidos de antibióticos y bacteriocinas. Dentro de estas últimas se presentan las “bacteriocinas semejantes a péptidos” (BLIS=bacteriocin-like inhibitory substance, por sus siglas en inglés), entre las que se destacan: Mersacidin, Sublancin 168, Subtilosin, Subtilosin B, Betacin, Ericin S, Erisin A, MJP1, Bac 14B y LFB 112.

Stein (2005) y Xie *et al.* (2014) reconocen que *B. subtilis* produce una amplia variedad de compuestos antimicrobianos y antifúngicos. Las investigaciones revelan que la bacteriocina LFB 112 y los lipopéptidos Sufactin y Mycosubtilin inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y negativas, gérmenes involucrados en enfermedades de animales con interés zootécnico, tales como *E. coli*, *Salmonella* spp., *C. perfringens*, *Streptococcus* spp., *S. aureus*, *Pasteurella multocida* y *P. aeruginosa*.

Sánchez y Peña (2016), consideran que el uso de bacterias ácido lácticas y *Bacillus* spp. puede resultar una alternativa para evitar la utilización de estos fármacos que generan residuos en la leche y afectan la calidad de los subproductos lácteos destinados a la alimentación de la población. En este sentido, se consideró importante que los productos naturales que se apliquen para controlar esta enfermedad permitan preservar la calidad bacteriológica, composición de la leche y eviten la presencia de residuos no deseados en este producto.

De acuerdo con Blajman *et al.* (2015), las tendencias actuales en los sistemas intensivos de producción postulan a los probióticos como una buena alternativa para el reemplazo de los antibióticos como promotores de crecimiento y en la prevención de enfermedades.

III.2 Actividad antimicrobiana de PROBIOLEV® frente a bacterias causantes de mastitis bovina a través de la técnica de cocultivos

En la figura 9, 10 y 11 se presenta el comportamiento del crecimiento de las cepas *Staphylococcus aureus* C1, *Staphylococcus* spp. coagulasa negativo C7 y *Corynebacterium* spp. C11 respectivamente, en presencia de PROBIOLEV®. Se observa, cómo con la dosis que se utilizó de este biopreparado, no se produjo el desarrollo de las cepas indicadoras en el medio, mientras que estas en el cultivo control, manifestaron un crecimiento acelerado, lo que evidencia el potencial que tienen estas cepas de crecer en la leche.

Se constató que en la medida que pasó el tiempo, las células de las cepas indicadoras disminuyeron su viabilidad. En todos los casos se redujo el número de colonias. A pesar de que no hubo un descenso total de la población patógena en los cocultivos de las cepas causantes de mastitis a las 24 horas de muestreo, estos cultivos perdieron más del 75% de las células viables. La reducción comenzó a partir de las 4 horas.

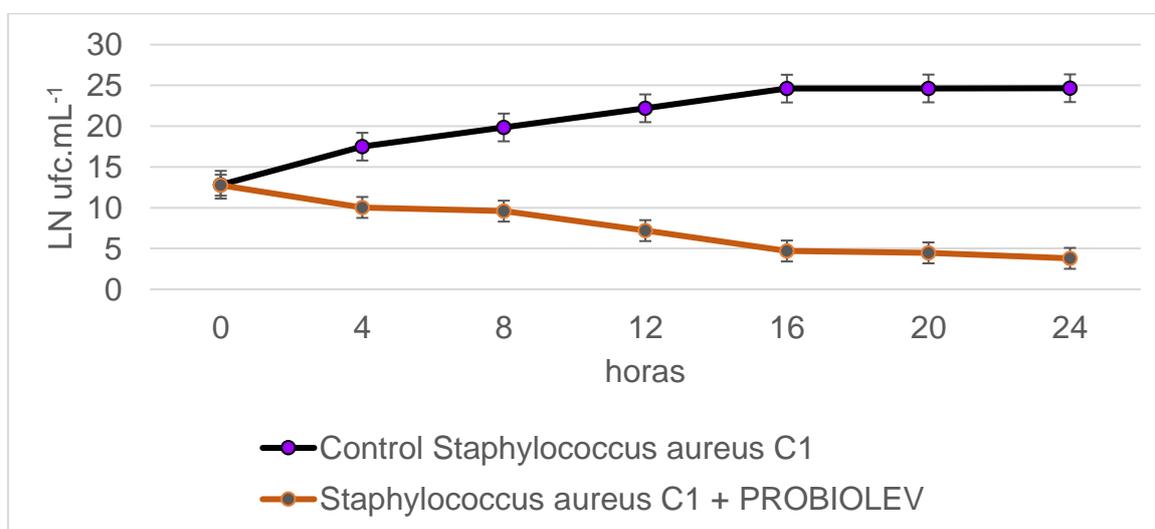


Figura 9. Comportamiento del crecimiento de *Staphylococcus aureus* C1 en presencia de PROBIOLEV®. Barras representan la desviación estándar.

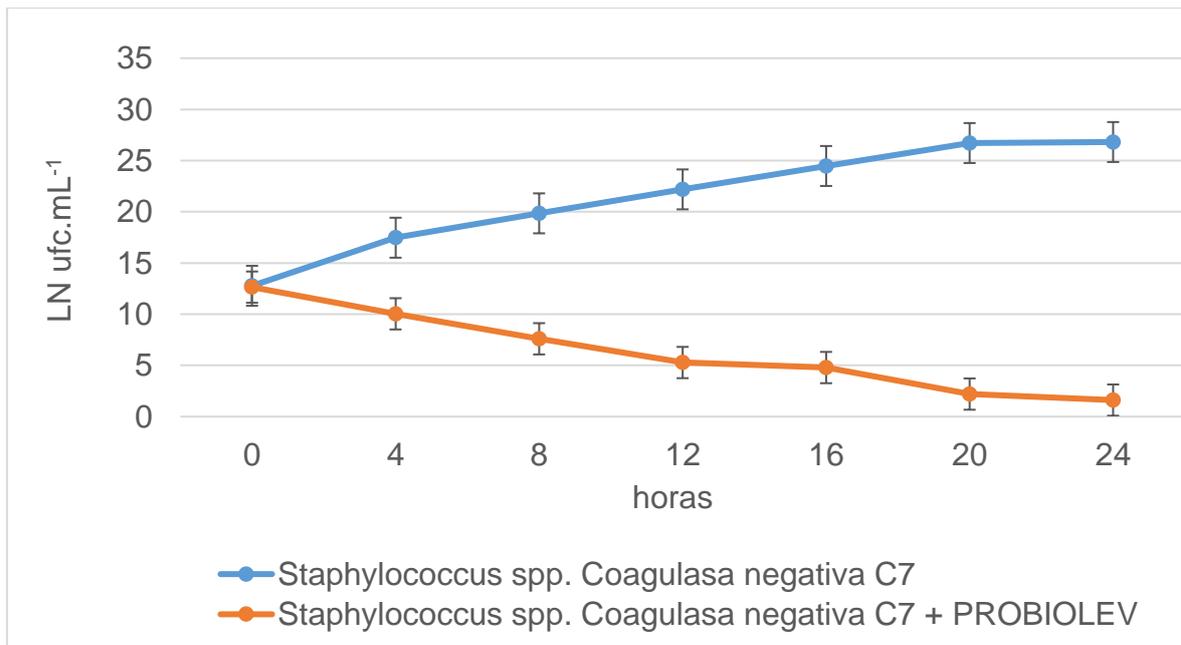


Figura 10. Comportamiento del crecimiento de *Staphylococcus* coagulasa negativo C7 C1 en presencia de PROBIOLEV®. Barras representan la desviación estándar.

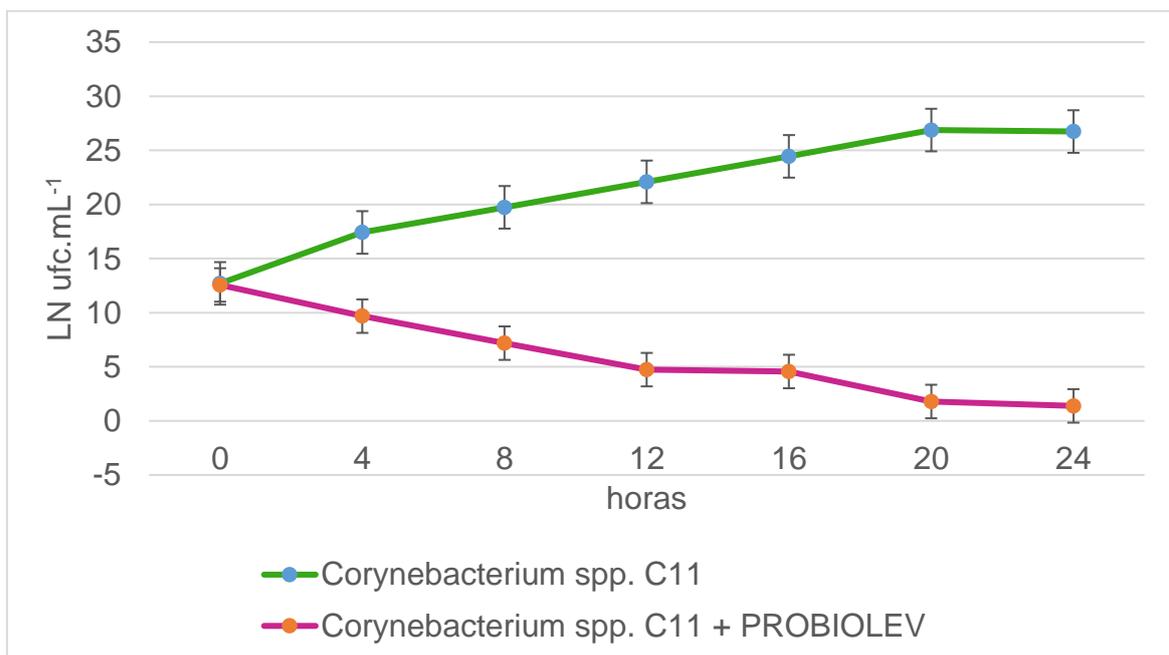


Figura 11. Comportamiento del crecimiento de *Corynebacterium* spp. C11 en presencia de PROBIOLEV®. Barras representan la desviación estándar

PROBIOLEV® contiene *Bacillus subtilis*, y se conoce que esta bacteria puede producir sustancias inhibitoras del crecimiento de los microorganismos patógenos (Milian, 2009). En este sentido, Zhang *et al.* (2021) comprobaron que el

sobrenadante libre de células de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis* CFS) eliminó el planctónico y el biofilm de *S. aureus* y aumentó la susceptibilidad de este microorganismo a la penicilina y la gentamicina. Un estudio adicional demostró que *B. subtilis* CFS suprimió la expresión de los genes involucrados en las moléculas adhesivas (Cna y ClfA), el factor de virulencia Hla, y la formación de biopelículas (lca y sarA).

Rodríguez (2017) refiere que cepas del género *Bacillus* producen bacteriocina LFB 112 y lipopéptidos Surfactin y Mycosubtilin, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas, como *E. coli*, *Salmonella*, *C. perfringens*, *Streptococcus spp.*, *S. aureus*, *Pasteurella multocida*, *P. aeruginosa*, gérmenes involucrados en enfermedades propias de animales con interés zootécnico.

Al-Quimber *et al* (2006) realizaron el aislamiento de bacterias comensales de la microbiota de la ubre de vacas sanas con actividad antimicrobiana frente a patógenos de la mastitis bovina, con vistas a su aplicación a largo plazo como probióticos antimastitis. Para ello se analizaron aislados bacterianos de cuatro ubres de vacas sanas para determinar su actividad inhibidora contra tres bacterias indicadoras Gram positivas. Esto llevó a la selección de nueve cepas ampliamente inhibidoras. Todas eran del género *Bacillus* y sus actividades antimicrobianas, eran muy heterogéneas en función de sus espectros antibacterianos y la susceptibilidad al calor.

Urakawa *et al.* (2022) manifiestan que los probióticos pueden servir como alternativa a los antibióticos para prevenir la mastitis, y el uso de probióticos puede disminuir el riesgo de que se desarrollen bacterias resistentes a los antibióticos. Estos autores investigaron el efecto de la alimentación oral con la cepa probiótica *Bacillus subtilis* (BS) C-3102 en la aparición de mastitis en vacas lecheras con historia previa de mastitis. Como resultado observaron que disminuyó la incidencia de mastitis, el número promedio de días de medicación y el número promedio de días en que se descartó la leche y mantuvo el RCS medio en la leche a un nivel sustancialmente más bajo que el grupo de control. La alimentación con BS se asoció con niveles más bajos de cortisol y el aumento de la proporción de células T CD4+. Con estos resultados como antecedentes se pudiera relacionar con la

actividad antimicrobiana de PROBIOLEV demostrada en el presente trabajo para avalar su futura utilización en el control esta enfermedad.

Este biopreparado simbiótico contiene sustancias prebióticas procedentes de las paredes celulares de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. En este sentido Vailati-Riboni *et al.* (2021) refieren que la alimentación con un producto de fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* mejora la salud de la ubre y la respuesta inmune ante la mastitis producida por *Streptococcus uberis* en vacas lecheras en mitad de la lactancia. En este sentido, se pudiera combinar los resultados anteriores con el uso tópico en la entrada del canal del pezón como sellante, para prevenir la mastitis bovina.

III.3 Actualización de la ficha de costo del PROBIOLEV® a escala industrial

En la tabla 4 se muestran los resultados de la búsqueda de información actualizada del costo de todos los componentes que intervienen en la producción del biopreparado simbiótico a escala industrial (100 L).

Las primeras investigaciones para obtener este biopreparado se desarrollaron en la Universidad de Matanzas (UM), el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) y el Instituto de Ciencia Animal (ICA). A partir de sus resultados se estandarizó el contenido de materia seca (20%) de la crema *Saccharomyces cerevisiae* empleada como componente principal y el tipo de hidrólisis (enzimática), que se utilizaría para romper la pared celular de las levaduras.

Según Pérez (2000) elaborar 1 L del hidrolizado tenía un costo de 0.08 cup, a partir del costo de las materias primas en ese momento.

Después de pasado 23 años y reordenamiento comercial y financiero en el país hace dos años (2021), el costo de 1 L del PROBIOLEV® ascendió a 28,72 CUP. Esto se produjo debido a que el costo de las materias primas se elevó considerablemente

Tabla 4. Ficha de costo estimada de la producción de PROBIOLEV® a escala industrial.

:Para la elaboración del crudo enzimático (10 L)				
Crudo enzimático	Unidad	Costo (CUP)	Gasto	Precio CUP
Miel final	1000 L	1500	0,5 L	0.75
Cloruro de calcio (CaCl)	100 g	27,60	1 g	0.25
Di hidrógeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	100 g	15,50	10 g	1,55
Hidrolizado			400 ml	11,48
Agua destilada	1000,00 L	17,50	1 L	0,02
Total				12,05
Elaboración de PROBIOLEV®				
Componentes del PROBIOLEV	Unidad	Costo	Gasto	Precio CUP
Crema de levadura	1000 L	600,00	90 L	54,00
Crudo enzimático			10 L	12,05
Caldo nutriente	500 g	137,41	13,00 g	3.57
Cloruro de sodio (NaCl)	1000 g	5,90	2 kg	11.80
Fenol 0.01 %	100 mL	37,80	10 mL	3.80
Electricidad			185 kw	136.55
Combustible			150 L	1891.5
Salario obrero	Operador de fermentación: 3410,00/mes			758,31
Total	100 L			2872,03
	1 L			28,72

Conclusiones

IV. CONCLUSIONES

1. El biopreparado simbiótico PROBIOLEV® mostró su efecto antibacteriano en el enfrentamiento *in vitro*, ya que provocó la inhibición de tres cepas de los microorganismos patógenos causantes de mastitis subclínica.
2. Los cultivos asociados de PROBIOLEV® con las cepas *Staphylococcus aureus* C1, *Staphylococcus* coagulasa negativo y *Corynebacterium* spp. C11 mostraron el efecto inhibitorio de este biopreparado al impedir el crecimiento desde las 0 horas en caldo leche y reducir la población de las bacterias patógenas hasta las 24 horas.
3. La actualización del costo de PROBIOLEV® a escala industrial constató el empleo de 28,72 CUP para la producción de 1 L del biopreparado.

Recomendaciones

V. RECOMENDACIONES

1. Evaluar *in vivo* el efecto antimicrobiano del biopreparado PROBIOLEV® en el control de la mastitis bovina mediante la ingestión oral y la aplicación como sellante del pezón.
2. Determinar las sustancias antimicrobianas contenidos en el PROBIOLEV® que provoquen la reducción del as bacterias patógenas causantes de la mastitis.

Referencias bibliográficas

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Qumber, M., & Tagg, J. R. 2006. Commensal bacilli inhibitory to mastitis pathogens isolated from the udder microbiota of healthy cows. *Journal of applied microbiology*, 101(5), 1152–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03004.x>.
- Anon, 1998. Intranets CHR Hansen. Byo System. The Worl's microfobial experts. Probios. Disponible en: www.Chransen.com. Fecha de consulta: 27 de noviembre 2023.
- Anon, 2006. BBL Procedimientos de control de calidad. Sereum Telluritev Agar Slants. L007499. Rev.08. Disponible en: [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007499\(08\)\(1006\)_E_S.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007499(08)(1006)_E_S.pdf). Fecha de consulta: noviembre del 2023.
- Anon, 2023a. ¿Por qué se utiliza el agar Mueller-Hinton para la sensibilidad bacteriana de los antibióticos? ¿Cuál es la importancia? Disponible en: <https://pdfcoffee.com/cuestionario-13-2-pdf-free.html>. Fecha de consulta: diciembre de 2023.
- Anon, 2023b Mastitis. Zoetis Argentina. Disponible en: <https://www2.ar.zoetis.com/productos-y-soluciones/bovinos/mastitis>. Fecha de consulta: 28 de noviembre de 2023.
- Anon. 2023 c. Simbióticos: mecanismo de acción de los prebióticos y los probióticos en el intestino. Disponible en: https://wanglikear.live/product_details/68314108.html. Fecha de consulta: noviembre 2023.
- Ansari, A., Aman, A., Siddiqui, N., Iqbal, S., Ali, ul. & Qader, S. 2012. Bacteriocin (BACIB17): screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17. *The Karachi Institute of Biotechnology & Genetic*. 25(1):195-208. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22186330>. Fecha de consulta 25 noviembre del 2023.
- 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.

<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1750-1759> ..

- Bedolla, C. 2017. Entorno Ganadero 80, BM Editores. Profesor e Investigador. Titular de Tiempo Completo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. Responsable del Cuerpo Académico CA-UMSNH-234. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar . Fecha de consulta: noviembre del 2023.
- Bedolla, C. 2018. Pruebas y Métodos para el Diagnóstico de Mastitis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Disponible en: <https://bmeditores.mx/ganaderia/pruebas-y-metodos-para-el-diagnostico-de-mastits-1706/> . Fecha de consulta: noviembre del 2023.
- Bedolla, C., Lucio, R., Cruz, A.R., Castañeda, H., Valladares, B., Velázquez, V., Córdoba A. 2020. Etiología de la mastitis en ganado lechero. 11º Seminario Internacional en Reproducción Animal y Producción de leche. Disponible en https://www.engormix.com/lecheria/mastitis-infecciones-ubre/etiologia-mastitis-ganado-lechero_a45487/ Fecha de consulta: 6 de noviembre del 2023.
- Beecher C., Daly M., Berry D.P., Klostermann K., Flynn J., Meaney W., Hill C., McCarthy T.V., Ross R.P., Giblin L. 2009. Administration of a live culture of *Lactococcus lactis* DPC 3147 into the bovine mammary gland stimulates the local host immune response, particularly IL-1 β and IL-8 gene expression. *J. Dairy Res.* 76:340–348. <https://doi.org/10.1017/S0022029909004154> .
- Beruvides A., Elías A., Valiño E., Milián G., Rodríguez M. & González J. 2018. Evaluación de la actividad probiótica de un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en cerdos en preceba. Disponible en: <https://www.engormix.com/mbr-1599328/agustin-beruvides-rodriguez>.
- Bindels, L.B., Delzenne, N.M., Cani, P.D., *et al.* 2015. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 12:303–310. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.47> .
- Bizani, D., Motta, A., Morrissy, R., Souto, A & Brandelli, A. 2005. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*.

International Microbiology. 8:125-131.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16052461/> . Fecha de consulta: diciembre del 2023.

Blajman J., Zbruna M.V., Astesana D., Berisvil A.P., Romero A., Fusari M.L., Soto L.P., Signorini L.B. Rosmini M.R., Frizzo L.S. 2015. Probiotics in broilers' rearing: A strategy for intensive production models. *Rev ArgMicrobiol* 47(4):360-367. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.08.002> .

Bonardi, S., Cabassi, C. S., Fiaccadori, E., Cavirani, S., Parisi, A., Bacci, C., Lamperti, L., Rega, M., Conter, M., Marra, F., Crippa, C., Gambi, L., Spadini, C., Lannarelli, M., Paladini, C., Filippin, N., & Pasquali, F. 2023. Detection of carbapenemase- and ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* from bovine bulk milk and comparison with clinical human isolates in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 387, Article 110049. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110049> .

Cheng, W.N., Han, S.G. 2020. Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments.A review. *Asian Australas J. Anim. Sci.* 33:1699–1713. <http://doi:10.5713/ajas.20.0156> .

Cho, J.H., Zhao, P.Y., & Kim, I.H. 2011. Probiotics as a Dietary Additive for Pigs.*Journal of Animal and Veterinary Advances.* 10 (16):2127-2134. <https://doi:10.3923/javaa.2011.2127.2134> .

Cintas, M., Casaus, M., Herranz, C., Nes, F. & Hernández, E. 2001. REVIEW: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science Technology International.* 7(4): 281-305. <https://doi.org/10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT> .

Cotter, P., Hill, C, & Ross, R. 2005. Bacteriocins developing innate immunity for food, *Nat. Rev. Microbiol*, 3:377-788. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1273> .

Cuellar, J.A. 2020. Mastitis bovina: enfermedad mundial. *Revista de información veterinaria, medicina y zootecnia, especializada en los sectores de avicultura, porcicultura, rumiantes y acuicultura.* Veterinaria digital S.A. Panamá City (Panamá). Disponible en: <https://www.veterinariadigital.com/articulos/mastitis-bovina-enfermedad-mundial/> . Consultado en noviembre del 2023.

- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* (Basel, Switzerland), 8(3), 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092> .
- Derakhshani H., Fehr KB, Sepehri S., Francoz D., De Buck J., Barkema HW, Plaizier JC, Khafipour E. 2018. Revisión invitada: Microbiota de la ubre bovina: factores contribuyentes y posibles implicaciones para la salud de la ubre y la mastitis susceptible. *J. Ciencia láctea*. 2018; 101:10605–10625. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14860> .
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (En línea). Disponible en: <http://www.infostat.com.ar> . Fecha de consulta: diciembre del 2023.
- Duncan, B. 1955. Multiple ranges and multiple F. Test *Biometrics* 11:1.
- EFSA. 2017. Scientific opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017 update) *EFSA J.* 2017;15(3):1–177. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4664> .
- Elegado, F., Guerra, M., Macayam, R., Mendoza, H & Lirazan, M. 2005. Spectrum of bacteriocina activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 95: 11-18. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.014> .
- Evivie, S. E., Abdelazez, A., Li, B., Bian, X., Li, W., Du, J., Huo, G., & Liu, F. 2019. *In vitro* Organic Acid Production and *In Vivo* Food Pathogen Suppression by Probiotic *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. *Frontiers in microbiology*, 10, 782. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00782> .
- Fukuyama K., Islam MA, Takagi M., Ikeda-Ohtsubo W., Kurata S., Aso H., Vignolo G., Villena J., Kitazawa H. 2020. Evaluación de la capacidad inmunomoduladora de las bacterias del ácido láctico aisladas de un corral de engorde Ganado contra la mastitis mediante un ensayo in vitro de células

epiteliales mamarias bovinas. *Patógenos*. 2020; 9 :410.
<https://doi.org/10.3390/patogenos9050410> .

Galindo J., Díaz A., González N., Sosa A., Marrero Y., Aldana A. I., Moreira O., Bocourt R., Torres V., Sarduy L. y Noda A. 2010. Efecto de un hidrolizado enzimático de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en la población microbiana ruminal con sustrato de *Pennisetum purpureum*, vc. Cuba CT- 115 en condiciones in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 44 (3).

Gálvez, A., Abriouel, H., Franz, C. and Ben, N. 2011. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS. Microbiology Reviews*. 35(1): 201-232.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x> .

García, A. 2019. Mastitis contagiosa versus ambiental. Universidad estatal de Dakota. Disponible en: <https://dairy-cattle.extension.org/mastitis-contagiosa-vs-ambiental/> . Fecha de consulta: noviembre del 2023.

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

Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I., & Moreno López, J. 2002. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta veterinaria Scandinavica*, 43(4), 221–230.
<https://doi.org/10.1186/1751-0147-43-221>.

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Jun*, 125 (6): 1401-12.
<https://doi:10.1093/jn/125.6.1401> . PMID:7782892.

Gonzales, D.J. 2018. ¿Cómo controlar la mastitis bovina? Plan de los 6 puntos para el control de mastitis en bovinos de leche. Laboratorio Weizur Argentina S.A. Disponible en: <https://www.weizur.com/controlar-mastitis-bovina> . Consultado en noviembre del 2023.

- Guarner, F., Sanders, M.E., Szajewska, H., Cohen, H., Eliakim, R., Herrera, C., Karakan, T., Merenstein, D., Piscocoya, A., Ramakrishna, B. & Salminen, S. 2023. Probióticos y prebióticos. Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. Consultado en: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2023.pdf> . Fecha de consulta: noviembre de 2023.
- Hasan, M.S., Kober, A.K.M.H., Rana, E.A., Bari, M.S. 2022. Association of udder lesions with subclinical mastitis in dairy cows of Chattogram, Bangladesh. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 10(2): 226-235. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2022/10.2.226.235> .
- Hispanlab. 1998. Manual de Microbiología. Medios de cultivos y reactivos para diagnóstico. España. Tercera edición.
- Izurieta, G. 2017. Perdidas económicas por altos conteos de células somáticas en leche cruda. Engormix/Lechería/Artículos técnicos. Disponible en https://www.engormix.com/lechería/mastitis-infecciones-ubre/perdidas-economicas-altos-conteos_a41133/ . Fecha de consulta: noviembre del 2023.
- Kadaikunnan, S., Sarasam, T., Khaled, J. M., Alharbi, N. S. & Mothana, R. 2015. "In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*". *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14: 9, ISSN: 1476-0711, <https://doi:10.1186/s12941-015-0069-1> .
- Kamel, H.M., Armanious, W., Morgan, S., Ebtsam, M., Kotb, E. 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.org/10.21608/javs.2021.79310.1083>.
- Khalighi, A., Behdani, R., & Kouhestani, S. 2016. Probiotics: A Comprehensive Review of Their Classification, Mode of Action and Role in Human Nutrition. InTech. <https://doi.org/10.5772/63646>.
- Kober, A. K. M. H., Saha, S., Islam, M. A., Rajoka, M. S. R., Fukuyama, K., Aso, H., Villena, J., & Kitazawa, H. 2022. Immunomodulatory Effects of Probiotics: A

- Novel Preventive Approach for the Control of Bovine Mastitis. *Microorganisms*, 10(11), 2255. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112255> .
- Kour, S., Sharma, N., N, B., Kumar, P., Soodan, J. S., Santos, M. V. D., & Son, Y. O. 2023. Advances in Diagnostic Approaches and Therapeutic Management in Bovine Mastitis. *Veterinary sciences*, 10(7), 449. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070449> .
- Kovačević, Z., Samardžija, M., Horvat, O., Tomanić, D., Radinović, M., Bijelić, K., Vukomanović, A.G., Kladar, N. 2022. Is There a Relationship between Antimicrobial Use and Antibiotic Resistance of the Most Common Mastitis Pathogens in Dairy Cows? *Antibiotics*. <http://doi:10.3390/antibiotics12010003>.
- Lakew, B.T., Fayera, T., Ali, Y.M. 2019. Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.*;51:1507–13. <https://doi:10.1007/s11250-019-01838-w>.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut pathogens*, 10, 21. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>.
- Mesa, A. 2018. Empleo del aditivo zootécnico SULTILPROBIO® en la prevención y control de la mastitis bovina. Tesis presentada en opción al Título de Ingeniero agrónomo. Universidad Matanzas Camilo Cienfuegos. Matanzas, Cuba.
- Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., & Zaragoza-Bastida, A. 2023. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Veterinary and animal science*, 21, 100306. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100306> .
- Mtasher, A.S., Abdulhusein, A.J. & Mutlag, S.H. 2018. Probiotics and prebiotics”, *International Journal of Curren. Research*, 10, (11), 75341-75352. <https://doi.org/10.24941/ijcr.33164.11.201> .

- Peng, J., Lu, Q., Liu, X., Deng, Y., Shang, T., Yuan, L., Zhang, H., & Zeng, Q. 2022. Antibacterial effect of synthetic ultra-short lipopeptide on *Streptococcus agalactiae* and its active on bacterial mastitis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 601, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.02.061>.
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba.
- Pérez, Y. 2010. Evaluación del efecto de un hidrolizado enzimático de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en cerdos lactantes y en crecimiento. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Máster en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Perulactea. 2015. Investigadores cubanos Diseñan nuevo aditivo para la alimentación del ganado. Disponible en: <https://perulactea.com/investigadores-cubanos-diseñan-nuevo-aditivo-para-la-alimentacion-del-ganado> . Consultado el 3 de diciembre del 2023.
- Piad, R.E. 2001. Evaluación de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollitas de reemplazo de ponedoras. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba.
- Preeti, Y., Chun, Z., Jing, S. & Hughes, J. A. 2006. Antimicrobial activities of human β -defensins against *Bacillus* species. *J. 28 (2): 132-137*. <https://doi.org/10.16/j.ijantimicag.2006.02.021>.
- Purdum, S., & Hahn-Didde, D. 2016. Prebiotics and probiotics used alone or in combination and effects on pullet growth and intestinal microbiology. *J Appl Poult Res 25 (1): 1-11*. <https://doi.org/10.3382/japr/pfv051> .
- Realpe, D.M. 2023. Caracterización de Patógenos Causantes de Mastitis Clínica y Subclínica y Perfil de Sensibilidad “*In Vitro*” en Dos Fincas con Diferentes Condiciones Climáticas. Trabajo de grado para optar el título de Médico

Veterinario. Universidad Antonio Nariño Programa Medicina Veterinaria Popayán. Disponible en: <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/7619>.

Fecha de consulta: diciembre del 2023.

Rodríguez, M. 2017. Evaluación de la capacidad antibacteriana de PROBIOLEV® frente a bacterias patógenas. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba.

Romero, N.V. 2016. Análisis de la calidad higiénica de la leche de ganaderías pequeñas y grandes pertenecientes al área 5 de Zipaquirá, Cundinamarca. Trabajo presentado para optar por el título de zootecnista. Universidad de la Salle. Bogotá. Colombia.

Ruíz, A., Peña, J., González, D. 2012. Situación de la mastitis bovina en Cuba. REDVET. Revista Electronica de Veterinaria, vol 13, num 12, pp. 1-12. Malaga, España. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63625154001>.

Fecha de consulta: diciembre del 2023.

Ruiz, G., Peña, J., Remón D.D. 2016. Mastitis bovina en Cuba. Artículo de revisión. Revista de producción animal. 28 (2-3):39-50. ISSN 2224-7920. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202016000200006#:~:text=La%20mastitis%20bovina%20se%20ha,cubana%20\(Ponce%2C%202009\)](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202016000200006#:~:text=La%20mastitis%20bovina%20se%20ha,cubana%20(Ponce%2C%202009)).

[Links]. Fecha de consulta: diciembre del 2023.

Sánchez, L., Peña, J.. 2016. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina. Rev. Salud Anim. Vol. 38 No. 2): 85-92. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57X2016000200003.

Fecha de consulta: noviembre del 2018.

Sánchez, M.P., Gutiérrez, N., Posada, I. 2018. Mastitis bovina por microorganismos emergentes y multirresistentes a antibióticos. Disponible en <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/mastitis-bovina-por-microorganismos-emergentes-y-multirresistentes-antibioticos?amp=1>.

Fecha de consulta: noviembre del 2023.

Schillinger, U., Lucke, F. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus* sake Isolated from Meat. Appl. Environm. Microbiol. 55(8):1901-1906.

https://scholar.google.com/cu/scholar_url?url=https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202976/pdf . Fecha de consulta: noviembre del 2023.

Schrezenmeir, J. & dr Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics—approaching a definition. *Am Soc Clin Nutr.* 1;73:361S–364S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.361s> ..

Schroeder, J. 2012. Mastitis Control Programs. Bovine mastitis and Milking management. North Dakota State University Fargo, North Dakota. REV CLÍN MED FAM. 5 (1). Disponible en: <https://www.webpages.uidaho.edu/avs472/Word/Mastitis%20and%20Milking/mastitis-control-programs.pdf> . Consultado el 16 de noviembre del 2023.

Sharma, N.; Singh, N.K.; Bhadwal, M.S. 2011. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australas. J. Anim.Sci.* 2011, 24, 429–438. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10233> . Fecha de consulta: noviembre del 2023.

Sharun K., Dhama K., Tiwari R., Gugjoo M.B., Iqbal Yatoo M., Patel S.K., Karthik K., Khurana S.K., Singh R., Puvvala B., Singh R., Singh K.P., Chaicumpa W. 2021. Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: A comprehensive review. *Veterinary Quarterly.* 41(1):107–136. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>

Statgraphics. 2002. Statgraphics Plus version 5.1. Statgraphic Technical Support Center. Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, USA.

Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56(4):845-847. <https://doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>.

Svetoch, E., Eruslanov, B., Levchuk, V., Perelygin, V., Mitsevich, E., Mitsevich, I., Stepanshin, J., Dyatlov, I., Seal, B. & Stern, N. 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and Characterization of Its Bacteriocin, Including the Antimicrobial Activity Spectrum. *Appl. Environ Microbiol.* 77 (8): 2749-2754. <http://doi:10.1128/AEM.02481-10>.

- Swanson, K.S., Gibson, G.R., Hutkins, R. *et al.* 2020. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 687–701. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0344-2>.
- Urakawa, M., Zhuang, T., Sato, H., Takanashi, S., Yoshimura, K., Endo, Y., Katsura, T., Umino, T., Tanaka, K., Watanabe, H., Kobayashi, H., Takada, N., Kozutsumi, T., Kumagai, H., Asano, T., Sazawa, K., Ashida, N., Zhao, G., Rose, M. T., Kitazawa, H., ... Aso, H. 2022. Prevention of mastitis in multiparous dairy cows with a previous history of mastitis by oral feeding with probiotic *Bacillus subtilis*. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, 93(1), e13764. <https://doi.org/10.1111/asj.13764>.
- Vailati-Riboni, M., Coleman, D. N., Lopreiato, V., Alharthi, A., Bucktrout, R. E., Abdel-Hamied, E., Martinez-Cortes, I., Liang, Y., Trevisi, E., Yoon, I., & Loor, J. J. 2021. Feeding a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product improves udder health and immune response to a *Streptococcus uberis* mastitis challenge in mid-lactation dairy cows. *Journal of animal science and biotechnology*, 12(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00560-8>.
- Valenciaga D., López J. R., Delgado Á., Galindo J., Herrera M., Monteagudo F. 2019. Efecto del hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la cinética de degradación ruminal de nutrientes del forraje de *Cenchrus purpureus* vs. OM - 22 (*Cenchrus purpureus* x *Cenchrus americanus*). *Cuban Journal of Agricultural Science*. 53 (3). Mayabeque. Cuba.
- Van Staden, A. & Dicks, L. 2012. Applications, antibiotic release and alternatives to antibiotics. *J Appl Biomater Funct Mater*. 10(1):2-11.
- Vicente, J.G., Cervantes, P., Hernández, A., Gudiño, R., Martínez, J.M., Segura, N.B. 2019. Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. Memorias del XVI Curso Internacional Teórico Práctico. La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana. Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara. Universidad de HESSEN. Servicio Alemán de Intercambio Académico y La Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos del estado de Veracruz, A.C. Disponible

en: <https://www.uv.mx/veracruz/fmvz/noticias/memxvi/> . Fecha de consulta: noviembre del 2023.

- Vissio, C., Aguero, D., Raspanti, C., Odierno, L., Larriestra, A. 2015. Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. Archivos de medicina veterinaria 47(1): 7-14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2015000100003> .
- Vondruskova, H., Slamova, R., Trckova, M., Zraly, Z & Pavlik, I. 2010. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhea in weaned piglets: a review. Veterinarni Medicina. 55 (5): 199-224. <http://doi:1017221/2998-VETMED>.
- Xie, M., Rong, J., Zhao, M.X., Song, B., & Chi, Z.M. 2014. Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals. Appl Microbiol Biotechnol 98 (1): 127–136. <http://doi:10.1007/s00253-013-5291-1>.
- Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K., & Tiwari, S. K. 2022. Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. Applied microbiology and biotechnology, 106(2), 505–521. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>.
- You, S., Ma, Y., Yan, B., Pei, W., Wu, Q., Ding, C., & Huang, C. 2022. The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review. Frontiers in nutrition, 9, 1000517. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1000517>.
- Zendejas, E.; Muñoz, L.; Quezada, T.; Carrera, R.C.; Häubi, C.U.; Iñiguez, O.; Gómez, L.; Gonzales, E. 2022. Mastitis, problema número 1 en ganado lechero: Manejo, Tratamiento y Control/ Buenos Aires, Centro, Argentina. Disponible en <https://www.ganaderia.com/destacado/Mastitis,-problema-numero-1-en-ganado-lechero:-Manejo,-Tratamiento-y-Control> . Fecha de consulta: octubre del 2023.
- Zhang, F., Wang, B., Liu, S., Chen, Y., Lin, Y., Liu, Z., Zhang, X., & Yu, B. 2021. *Bacillus subtilis* revives conventional antibiotics against *Staphylococcus aureus*

osteomyelitis. Microbial cell factories, 20(1), 102.
<https://doi.org/10.1186/s12934-021-01592-5>.

Zhumakayeva, A., Zhubatkanova, A., Asauova, Z., Tokayeva, M., & Kemeshev, Z. 2023. Efficiency of probiotic culture consortium application for disinfection of dairy farm premises and prevention of mastitis in cows. Journal of advanced veterinary and animal research, 10(2), 185–195.
<https://doi.org/10.5455/javar.2023.i668>.

Anexos

VI. ANEXOS

Anexo 1.

