



**UNIVERSIDAD DE MATANZAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**Caracterización química-microbiológica del VITAFERT y evaluación de su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias patógenas**



**Autor:** Jesús Milián Domínguez

**Tutores:** Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. C. Agustín Beruvides Rodríguez

**Matanzas, 2022**

## ***PENSAMIENTO***

**Toda ciencia empieza en la imaginación,  
y no hay sabio sin el arte de imaginar (...).**

**José Martí**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

Presidente del Tribunal Firma

---

Miembro del Tribunal Firma

---

Miembro del Tribunal Firma

Dado en Matanzas, el día \_\_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del año 2022

“Año 64 de la Revolución”.

## **DECLARACIÓN DE AUTORIDAD**

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

---

Firma

## **DEDICATORIA**

Una obra se concibe cuando el caudal de ideas, enfoques diversos y arduo trabajo, logran vencer la inercia del comienzo y atrapar la escurridiza musa.

Solo con valiosas colaboraciones es posible transitar el largo y escabroso camino entre los inicios y la culminación de un trabajo de esta naturaleza.

Dedico esta obra:

Dedico esta tesis principalmente a la persona más importante, especial y única en el mundo, a ti mi madre querida y amada Mariana Domínguez Bello, que has estado en cada segundo de mi vida dando lo mejor de ti, enseñándome, educándome, a ser como soy. Espero poder seguir haciendo que te sientas orgullosa de mí y que compartas cada una de mis metas y triunfos.

A mi abuela por ser como un ángel en la tierra que siempre ha cuidado de mí.

A mi padre Jesús Milián Fereira, por su comprensión y ayuda cuando lo he necesitado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Alcanzar una meta debe ser punto de partida para nuevos empeños, pero su feliz culminación, lo constituye el momento de reconocer el valor de todas aquellas personas e instituciones que de una u otra forma han brindado sus conocimientos y experiencias para contribuir a la materialización de ese sueño.

Agradecido primeramente de Dios por bendecirme siempre en cada uno de mis pasos y permitirme disfrutar de mis logros.

Agradezco a mi familia por todo su apoyo, por su confianza en mí, por su amor y comprensión.

Agradezco de manera especial a mis tutores la Dra. C. Ana Julia Rondón Castillo y el Dr. C. Agustín Beruvides Rodríguez, feliz por ser su alumno, amigo, porque son un ejemplo para todos nosotros los estudiantes, por demostrarme y enseñarme a no rendirme y ser mejor cada día, por dedicarse a mí para que juntos llegáramos a este maravilloso logro.

A Yunier Sánchez González por su apoyo en todo momento y por ser un pilar fundamental desde el inicio de mi investigación hasta verla concluida.

A todos los profesores de la facultad por su gran labor y por hacerme sentir tan enamorado de esta carrera y porque son maravillosos tanto en las aulas como en la vida personal.

Agradecido de todos mis educadores que me hicieron superarme durante toda mi vida.

A mis amigos que siempre me malcriaron, me apoyaron y me ayudaron a que terminara mi carrera a pesar de las dificultades, porque hacen de mí una mejor persona, los quiero y estoy muy feliz y agradecido que estén en mi vida.

A todos los que de una forma u otra contribuyeron al éxito de este trabajo, directa o indirectamente,

***A todos, muchas gracias.***

## **OPINIÓN DE LOS TUTORES**

### **UNIVERSIDAD DE MATANZAS**

FACULTAD/CUM/FUM: Departamento: Agronomía

### **INFORME DE TUTORÍA**

#### **DATOS GENERALES Datos de los tutores:**

Nombre y apellidos: Ana Julia Rondón Castillo y Agustín Beruvides Rodríguez

Calificación

Categoría docente: Profesores Titulares.

Grado científico y/o título académico: Doctores en Ciencias Veterinarias.

Institución a la que pertenece: MES

#### **Datos del trabajo de diploma**

Título del trabajo de diploma: Caracterización química-microbiológica del VITAFERT y evaluación de su actividad antimicrobiana in vitro frente a bacterias patógenas.

Nombre y apellidos del diplomante: Jesús Milián Domínguez

Curso académico: 2022

Carrera: Agronomía

## **ASPECTOS A VALORAR EN EL INFORME**

### **Rigor científico del trabajo.**

El trabajo de diploma presentado por el aspirante Jesús Milián Domínguez en opción al título de Ingeniero Agrónomo es a nuestro criterio un significativo aporte científico, por cuanto se comprueba la caracterización química y microbiológica del aditivo zootécnico VITAFERT y se determina su actividad antimicrobiana in vitro frente a bacterias patógenas que afectan con frecuencia a los animales de interés pecuario, y a su vez el mismo puede servir de base a los programas de desarrollo rural que se desarrollan en el territorio, además de contribuir a la estrategia para lograr un incremento en la adopción de tecnologías que propicien elevar los indicadores económicos y productivos en las unidades de producción. Este trabajo responde a las líneas de investigación pertenecientes al Programa Nacional de Seguridad Alimentaria y Educación Nutricional, liderado por nuestro Primer Secretario del Partido Comunista de Cuba y Presidente de nuestro país Miguel Mario Díaz-Canel Bermúdez.

### **Nivel de actualización científico-técnica.**

Las explotaciones pecuarias se caracterizan en la actualidad por la búsqueda incesante de alternativas alimentarias que conduzcan a un aumento de la eficiencia económica y productiva. Así los animales se someten a situaciones estresantes que presentan como consecuencia la aparición de enfermedades y la disminución de los niveles productivos.

En este documento se tuvo como objetivo caracterizar el aditivo zootécnico VITAFERT y determinar su actividad antimicrobiana in vitro frente a bacterias patógenas que afectan a los animales, para ser incluido en sistemas de alimentación que incluyan preparados microbianos, que son fundamentales para el desarrollo de la cadena productiva en el mundo. De ahí la importancia del tema.

En esta investigación se hizo un uso bastante exhaustivo de la literatura huyendo desde lo clásico hasta lo más actual que refiere a este tema y al empleo de aditivos en la alimentación animal.

### **Uso de las estrategias curriculares de acuerdo con el contenido del trabajo.**

Se hace uso de la estrategia de lengua materna y el idioma inglés. Se realizó el uso de la informática y la bioestadística, tanto para la escritura del documento, como para el procesamiento de toda la información.

### **Capacidad creadora, originalidad e independencia en el desarrollo del trabajo.**

El aspirante ha logrado alto grado de independencia, mostrando dominio del tema, conocimiento de las diferentes variables en estudio, así como de los métodos empleados para la investigación. Se destaca en el su dominio en el uso de la estadística, así como en la interpretación de los resultados alcanzados en el trabajo.



Es característico del aspirante su constante preocupación, apego y seriedad en cada uno de los pasos llevados a cabo desde la búsqueda de información científica actualizada, reflejadas a través de las referencias bibliográficas, la elaboración del protocolo de investigación, su ejecución y desarrollo, hasta la confección de esta obra.

**Competencias profesionales demostradas por el diplomante en la realización de la investigación.**

El alumno logró integrar los conocimientos adquiridos en la carrera de las asignaturas de Química, Microbiología, Metodología de la Investigación científica, Estadística entre otras lo que le permitió una adecuada interpretación de sus resultados.

**Valor científico de las conclusiones.**

En general existe correspondencia entre título, problema, hipótesis, los objetivos planteados y los resultados de la tesis, ya que se comprueba la caracterización química y microbiológica del VITAFERT y se determina su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas. Las conclusiones son lógicas, responden a los objetivos planteados y se derivan de los resultados obtenidos.

**Valoración general del trabajo desarrollado por el diplomante.**

Ninguna obra humana es perfecta, por lo que las deficiencias que pudieran ser halladas en este material, de modo alguno invalidan su calidad. Por ello propongo que se analice este documento y solicitamos al tribunal que se le otorgue el título de Ingeniero Agrónomo al aspirante.

**FECHA DE ELABORACIÓN:** 5/12/2022

**FIRMA DE LOS TUTORES:** Dr. C. Ana Julia Rondón Castillo

Dr. C. Agustín Beruvides Rodríguez

## RESUMEN

El aditivo zootécnico VITAFERT se utiliza para mejorar el rendimiento productivo y la salud de especies de interés pecuario. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la composición química-microbiológica del VITAFERT y su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias patógenas. Se elaboraron cinco lotes del biopreparado para la determinación de materia seca, cenizas, calcio, fósforo, proteína bruta y pH. Como indicadores microbiológicos se cuantificaron las poblaciones de bacterias ácido lácticas y levaduras, así como la presencia de microorganismos contaminantes. Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* del aditivo frente a *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Corynebacterium* a través de un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2X9 y el empleo del método de difusión de sustancias en el agar. Como resultado se obtuvo que el biopreparado presenta una composición química favorable. (Materia seca: 9,72; Proteína bruta:7,12; cenizas: 10,52; calcio: 1,32 y fósforo: 0,65 %) para el desarrollo de microorganismos benéficos y un pH=4. Se comprobó que el aditivo inhibió el crecimiento de todas las bacterias patógenas con mayor ( $P<0,001$ ) efecto frente a *Staphylococcus*. Estos resultados sugieren que este consorcio microbiano puede utilizarse como preventivo de numerosas enfermedades que afectan a los animales de granja.

**Palabras claves:** aditivo zootécnico, animales, efecto antimicrobiano, probiótico.

## **ABSTRACT**

The VITAFERT zootechnical additive is used to improve the productive performance and health of species of livestock interest. The objective of this work was to evaluate the chemical-microbiological composition of VITAFERT and its in vitro antimicrobial activity against pathogenic bacteria. Five batches of the biopreparation were prepared for the determination of dry matter, ash, calcium, phosphorus, crude protein and pH. As microbiological indicators, the populations of lactic acid bacteria and yeasts were quantified, as well as the presence of contaminating microorganisms. The in vitro antimicrobial activity of the additive against *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Shigella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Corynebacterium* was evaluated through a completely randomized design with a 2X9 factorial arrangement and the use of the agar diffusion method. As a result, it was obtained that the biopreparation has a favorable chemical composition (Dry matter: 9.72; Crude protein: 7.12; Ashes: 10.52; Calcium: 1.32 and Phosphorus: 0.65%) for the development of beneficial microorganisms and a pH=4. It was found that the additive inhibited the growth of all pathogenic bacteria with a greater ( $P<0.001$ ) effect against *Staphylococcus*. These results suggest that this microbial consortium can be used as a preventative of numerous diseases that affect farm animals.

**Keywords:** zootechnical additive, animals, antimicrobial effect, probiotic.

<b>Índice</b>	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
Problema científico.....	2
Hipótesis .....	2
Objetivo General.....	2
Objetivos específicos .....	2
<b>CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
I.1. Aditivos. Concepto.....	3
I.1.1. Clasificación de los aditivos (EURFA 2018).....	3
I.1.2. Aditivos zootécnicos. Clasificación (EURFA 2018).....	3
I.1.2.1 Aditivos zootécnicos utilizados en la alimentación animal .....	4
I.2. Aditivo zootécnico VITAFERT .....	5
1.2.1 Composición del VITAFERT .....	6
1.2.2. Resultados de la aplicación del aditivo zootécnico VITAFERT en la reducción de enfermedades en animales de interés zootécnico.....	6
I.3. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas.....	8
<b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 Elaboración del aditivo zootécnico VITAFERT en condiciones de laboratorio .....	20
2.2. Caracterización microbiológica del VITAFERT .....	21
2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> del aditivo zootécnico VITAFERT frente a bacterias patógenas .....	22
2.4 Valoración desde el punto de vista teórico la importancia económica del empleo del VITAFERT como preventivo de enfermedades en animales de interés zootécnico. ....	23
2.5 Análisis estadístico .....	23
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
3.1 Elaboración del aditivo zootécnico VITAFERT en condiciones de laboratorio .....	24
3.2 Análisis químico y microbiológico del aditivo zootécnico VITAFERT elaborado en condiciones de laboratorio.....	25
3.2.1 Caracterización química del VITAFERT .....	25
3.2.2 Cinética de crecimiento de las BAL y levaduras y comportamiento del pH en el tiempo.....	29

3.3 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> del aditivo zotécnico VITAFERT frente a bacterias patógenas.....	30
3.4 Valoración económica.....	36
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>39</b>

# *Introducción*

## INTRODUCCIÓN

En la producción animal es de suma importancia determinar la composición bromatológica de los alimentos, tales como los niveles de proteína, fibra, energía y minerales; de esta forma, se logra establecer el balance alimentario en las dietas de los animales. Al mismo tiempo, es necesario comprobar la calidad microbiológica del propio alimento, cualidad que puede afectar el comportamiento animal en cuanto al consumo, la digestibilidad y la absorción de nutrientes (Caicedo, 2015). El estudio de las características microbiológicas y químicas de un aditivo es también una premisa para introducir el nuevo producto en la alimentación animal (Caicedo y Valle, 2017).

Aunque en muchos países se restringió el uso de antibióticos como promotores del crecimiento animal (APC) en diferentes regiones se utilizan como preventivo de las enfermedades infectocontagiosas. Estos antimicrobianos, no solo eliminan a las bacterias patógenas del tracto gastrointestinal (TGI), sino que también reducen a la población de microorganismos beneficiosos que contribuyen a la estimulación del sistema inmune, a la digestibilidad de los nutrientes, la eliminación de sustancias enterotóxicas y a la exclusión de microorganismos nocivos (Hernández-Barrera, 2017).

Dentro de las alternativas al empleo de estos antimicrobianos se usan en la actualidad las bacterias ácido lácticas (BAL) probióticas, las cuales constituyen una opción favorable para la prevención de enfermedades infecciosas en humanos y en animales (Abramov *et al.*, 2014; Beruvides *et al.*, 2021). La actividad antimicrobiana de las BAL se asocia fundamentalmente a la producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno. También estas bacterias probióticas poseen otras características deseables como son: capacidad de adherencia a tejidos, ser seguras y no patogénicas, entre otras (Sánchez y Pena, 2016).

En el Instituto de Ciencia Animal se obtuvo por Elías y Herrera (2008) un aditivo zootécnico denominado VITAFERT. Diferentes investigadores evaluaron su efecto

en el comportamiento fisiológico, productivo y la salud en cerdos, conejos y aves (Brea, 2015; Beruvides, 2018 y Silvestre, 2021). En estos estudios se comprobó la reducción de la morbilidad y la mortalidad de los animales que consumieron este aditivo; sin embargo, no se ha estudiado el efecto antimicrobiano de este consorcio microbiano y sus productos frente a bacterias potencialmente patógenas.

### **Problema científico**

Los animales de interés zootécnico están expuestos a bacterias que causan enfermedades, las cuales son tratadas de forma preventiva con antibióticos que provocan resistencia en los microorganismos patógenos.

### **Hipótesis**

La evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del aditivo zootécnico VITAFERT frente a bacterias patógenas permitirá su empleo como preventivo de enfermedades en animales de interés zootécnico.

### **Objetivo General**

Evaluar la composición química-microbiológica del VITAFERT y su actividad antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias patógenas.

### **Objetivos específicos**

1. Elaborar el aditivo zootécnico VITAFERT en condiciones de laboratorio.
2. Realizar análisis químico y microbiológico del aditivo zootécnico VITAFERT elaborado en condiciones de laboratorio.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del aditivo zootécnico VITAFERT frente a bacterias patógenas.
4. Valorar desde el punto de vista teórico la importancia económica del empleo del VITAFERT como preventivo de enfermedades en animales de interés zootécnico.



# *Revisión bibliográfica*

## **CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **I.1. Aditivos. Concepto**

El Reglamento 1831/03 del *European Union Register of Feed Additives* (EURFA 2018) regula la utilización de aditivos en la alimentación animal, y los define como sustancias incorporadas a los concentrados para los animales, que pueden influir en las características de dichos alimentos o en la producción animal. La Recomendación 11/25 establece directrices para la distinción entre materias primas, aditivos, biocidas, medicamentos veterinarios y materias primas; en cualquier caso, el Reglamento 892/10 señala una serie de productos (minerales, ácidos grasos, condimentos, productos de fermentación, etc.) que no cabe considerarlos como aditivos para piensos.

#### **I.1.1. Clasificación de los aditivos (EURFA, 2018)**

Los aditivos organolépticos: colorantes y aromatizantes

Los aditivos nutricionales: Las vitaminas, provitaminas y sustancias de efecto análogo, los oligoelementos, los aminoácidos, los análogos de los aminoácidos y sus sales, la urea y sus derivados.

Los aditivos zootécnicos

#### **I.1.2. Aditivos zootécnicos. Clasificación (EURFA 2018)**

Los aditivos zootécnicos son los que mejoran la productividad de los animales sanos (además de los que reducen el impacto medioambiental de la ganadería); el Reglamento 1831/03 incluye en esta categoría a diferentes grupos funcionales:

Los digestivos. Son preparaciones enzimáticas que mejoran la digestibilidad de algunos alimentos de los animales (o levaduras que mejoran la degradabilidad ruminal de los forrajes); estos aditivos no tienen período de retirada, pero algunos tienen límite máximo de inclusión.

Los estabilizadores de la biota intestinal. Son microorganismos viables (o probióticos) que colonizan el intestino y reducen el desarrollo de enterobacterias;

cada probiótico de una casa comercial se autoriza mediante Reglamento europeo para la alimentación de especies concretas.

Otros aditivos zootécnicos. Otros aditivos autorizados en la alimentación de los animales son los mejoradores de parámetros de eficacia y los aditivos medicamentosos o antimicrobianos (coccidiostáticos e histomonóstatos).

### **I.1.2.1 Aditivos zootécnicos utilizados en la alimentación animal**

#### **Prebióticos**

Los prebióticos son en su gran mayoría polisacáridos, dentro de los que se incluyen, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), inulina, lactulosa, gluco-oligosacáridos, lactitol, malto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, estaquiosa y rafinosa (Revolledo 2013 y Pérez *et al.*, 2016). Por su estructura química, estos compuestos resisten la acción de las enzimas excretadas a nivel del tracto por el animal y llegan intactos hasta la parte distal del intestino delgado, el intestino grueso y ciego, donde pueden constituir un sustrato selectivo para la *microbiota* allí presente (Le *et al.*, 2015).

#### **Probióticos**

Según la FAO (2016) un probiótico es un “microorganismo vivo que, al aplicarse en la cantidad adecuada, le genera un efecto benéfico al huésped”. El nombre probióticos proviene del griego (pro) a favor, (biótico) vida, es decir, “a favor de la vida”. Su denominación fue dada por Lilly y Stillwell en 1965 y básicamente son sustancias secretadas por microorganismos que estimulan el crecimiento de otros microorganismos. Posteriormente ha ido modificándose la definición y en la actualidad es definido como: “Mono o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que aplicado en humanos o animales mejora la absorción intestinal, la calidad de vida, y mejoran la salud”. Su función es la de mantener y restablecer e, incluso, aumentar la flora y actividad de la flora bacteriana mediante la introducción de microorganismos vivos que reequilibren la flora intestinal (Bacardi-Sarmiento, 2021).

## **Simbióticos**

El término simbiótico se usa cuando un producto contiene probióticos y prebióticos (Adil y Magray, 2012). Estos biopreparados, al suministrarse directamente a los animales, mejoran su metabolismo, salud y producción. Según criterios de Mousavi *et al.* (2015), los simbióticos constituyen la mejor estrategia para la integración de probióticos en el ecosistema.

## **Enzimas**

Según EURFA (2018) las enzimas se consideran aditivos zootécnicos activadores de la digestibilidad o bien mejoradores medio ambientales. Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar los polisacáridos no almidón presentes en los cereales, tales como  $\beta$ -glucanasas, xilanasas, arabinoxilanasas, celulasas, etc. En el caso de las fitasas, enzimas con capacidad para hidrolizar el fósforo fítico presente en los cereales, se pueden ubicar en ambos grupos.

## **Antibióticos**

En producción animal, los antibióticos se utilizaron como promotores del crecimiento, preventivos y terapéuticos. Sin embargo, el consumo de estas sustancias por los animales puede ocasionar su aparición en el alimento, lo que puede provocar en el consumidor alergias, efectos tóxicos o bien asociarse a resistencias bacterianas (Chávez, 2015). Por estas razones desde el año 2006 la Unión Europea prohibió la utilización de estos productos como aditivos zootécnicos en la alimentación animal (*European Parliament and Council, 2003*).

### **I.2. Aditivo zootécnico VITAFERT**

En Cuba, investigadores del Instituto de Ciencia Animal (ICA) desarrollaron un producto biológicamente activo compuesto por BAL, levaduras, ácidos orgánicos de cadena corta y pH bajo, capaz de controlar el desarrollo de *E. coli*; además de reducir apreciablemente, la incidencia de diarreas en los animales, aumentar la ganancia de peso vivo e incrementar la retención de energía y nitrógeno. A este aditivo se le denominó VITAFERT (Elías y Herrera, 2008).

El aditivo VITAFERT se obtuvo en el laboratorio de producción de alimentos del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la propia institución científica. Es el resultado de un proceso biotecnológico sencillo, que tiene lugar en fermentadores a escala de laboratorio de 50 y 250 L de capacidad, con recirculación o agitación central, respectivamente. Las especificidades del proceso están protegidas por la oficina central de la propiedad intelectual (O.C.P.I), con número de registro 81/2011.

### 1.2.1 Composición del VITAFERT

En la tabla 1 se muestran los componentes del aditivo zootécnico VITAFERT para elaborar 100 L.

**Tabla 1.** Composición del VITAFERT (Beruvides *et al.*, 2021).

Componentes	U/M	Cantidad
Harina de maíz	kg	4,0
Harina de soya	kg	4,0
Urea	kg	0,5
Sulfato de magnesio	kg	0,25
Sal mineral	kg	0,5
Yogur	L	1,0
Azúcar crudo	kg	15,0
Agua	L	Hasta completar 100 L

### 1.2.2. Resultados de la aplicación del aditivo zootécnico VITAFERT en la reducción de enfermedades en animales de interés zootécnico

Desde hace varios años se trabaja en la obtención y evaluación del aditivo zootécnico VITAFERT en sus diferentes variantes y formulaciones. Este preparado microbiano se aplicó como aditivo en la alimentación de diferentes especies de interés económico, observándose la mejora de los indicadores de salud, lo que lleva a pensar que este consorcio microbiano inhibe a diferentes bacterias causantes de enfermedades.

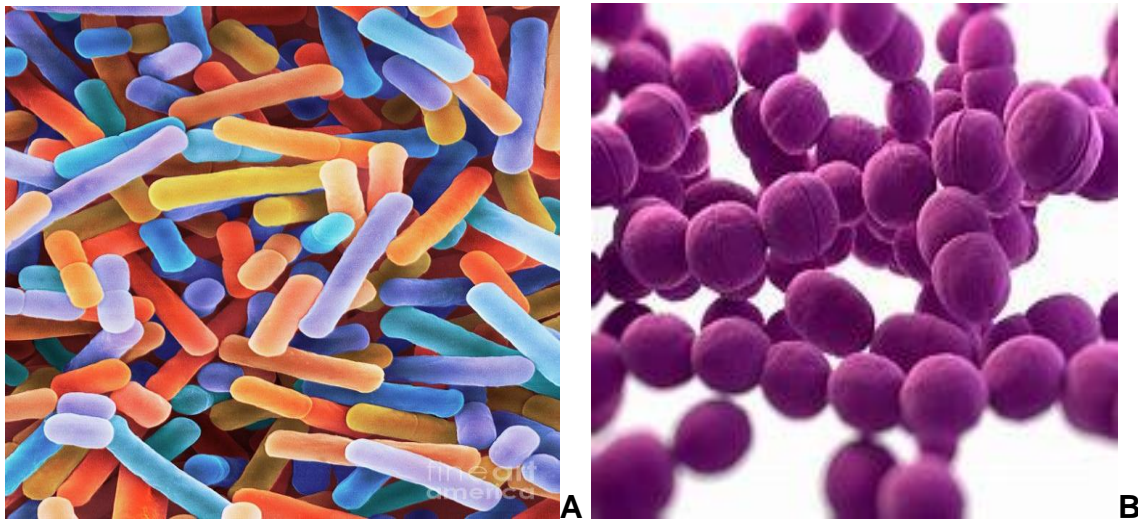
González (2009) refirió que la utilización de VITAFERT en reproductoras porcinas mostró menor pérdida de peso ( $P < 0,001$ ) y las crías presentaron menor incidencia de diarreas, tanto infecciosas como digestivas, a medida que se incrementaban los niveles de VITAFERT en el concentrado (0; 5; 10 y 15 mL·kg<sup>-1</sup> de PV). Otros trabajos en la propia especie porcina, en la categoría de cría, preceba y ceba, muestran similares resultados (González, 2009; Roján, 2009 y Beruvides, 2009; 2013).

Calderón (2005) utilizó el preparado microbiano VITAFERT al 10% para mejorar las condiciones sanitarias de las camas avícolas, donde logró una mejora en los indicadores productivos de las aves que se criaron sobre ellas. Estas camas mejoraron su composición bromatológica, digestibilidad de la MO y MS al utilizarse en la alimentación de ovinos Pelibuey en pastoreo, a razón de 12, 20 y 24 g·kg<sup>-1</sup> de PV más 6 g·kg<sup>-1</sup> de PV de miel final (para garantizar los requerimientos energéticos), obtuvo que con 20 g·kg<sup>-1</sup> de PV, se mejoran los indicadores productivos de los ovinos en crecimiento y ceba.

Vitaluña (2014) incluyó este aditivo en cerdos en crecimiento-ceba con niveles de inclusión de 5, 10, 15 mL·kg<sup>-1</sup> de PV y obtuvo mejoras en el comportamiento productivo y de salud.

En la mayoría de los trabajos de investigación donde se aplicó este aditivo, se obtuvo una mejora en los indicadores evaluados en los animales que lo consumieron. Esto da una medida de como los microorganismos presentes en el VITAFERT y sus metabolitos son capaces de favorecer la absorción de nutrientes y el estado inmunológico de los cerdos.

Se conoce que la actividad antimicrobiana del VITAFERT se potencia a través de la inclusión del yogurt en su composición. Este introduce Bacterias ácido Lácticas (BAL) como *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, las cuales presentan actividad antimicrobiana (Medine Plus, 2019). En la figura 1 se presentan imágenes de estas bacterias.



**Figura 1.** **A.** *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y **B.** *Streptococcus thermophilus* (Fuente: Anon, 2022; Kunkel, 2021).

### **I.3. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son microorganismos grampositivos y catalasa negativos utilizados para producir alimentos fermentados. Aparecen morfológicamente como cocos o bastones y no forman esporas. Las BAL utilizadas en la fermentación de alimentos son de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y son útiles para controlar a los microbios patógenos, debido a la producción de bacteriocinas y ácidos orgánicos (Mokoena *et al.*, 2021)

Las bacteriocinas tienen distintos mecanismos de acción y se pueden dividir en aquellas que promueven un efecto bactericida, con o sin lisis celular, o bacteriostáticas, que inhiben el crecimiento celular (Silva *et al.*, 2018).

Las bacterias ácido lácticas son capaces de competir con otros microorganismos presentes en la leche mediante producción de sustancias con acción inhibitoria. Al igual que en otros grupos bacterianos la síntesis de metabolitos antimicrobianos por LAB y NSLAB es una propiedad cepa-dependiente. Las cepas de una misma especie o subespecie pueden diferir en el tipo de compuestos sintetizados o incluso cuando generan un mismo compuesto los niveles de producción pueden diferir significativamente. Como consecuencia de lo anterior la caracterización

tecnológica de las cepas debe incluir una etapa de estudio de la actividad antimicrobiana para determinar su competitividad frente a microorganismos alterantes y patógenos, así como su compatibilidad con cepas presentes en los cultivos iniciadores y adjuntos empleados por la industria alimentaria (Nieto, 2010; Lorenzo y Raffo, 2015).

En forma general los compuestos inhibitorios son clasificados en dos clases: sustancias de bajo peso molecular cuando tienen menos de 1000 Da o sustancias de alto peso molecular si presentan más de 1000 Da. Las sustancias con bajo peso molecular son: ácidos orgánicos, los compuestos aromáticos acetaldehído, diacetilo y acetoína producidos en la fermentación heteroláctica de las NSLAB, D-aminoácidos, peróxido de hidrógeno, reuterina y reuterociclina. Las sustancias de alto peso molecular son compuestos de naturaleza peptídica denominados bacteriocinas (Šušković *et al.*, 2010).

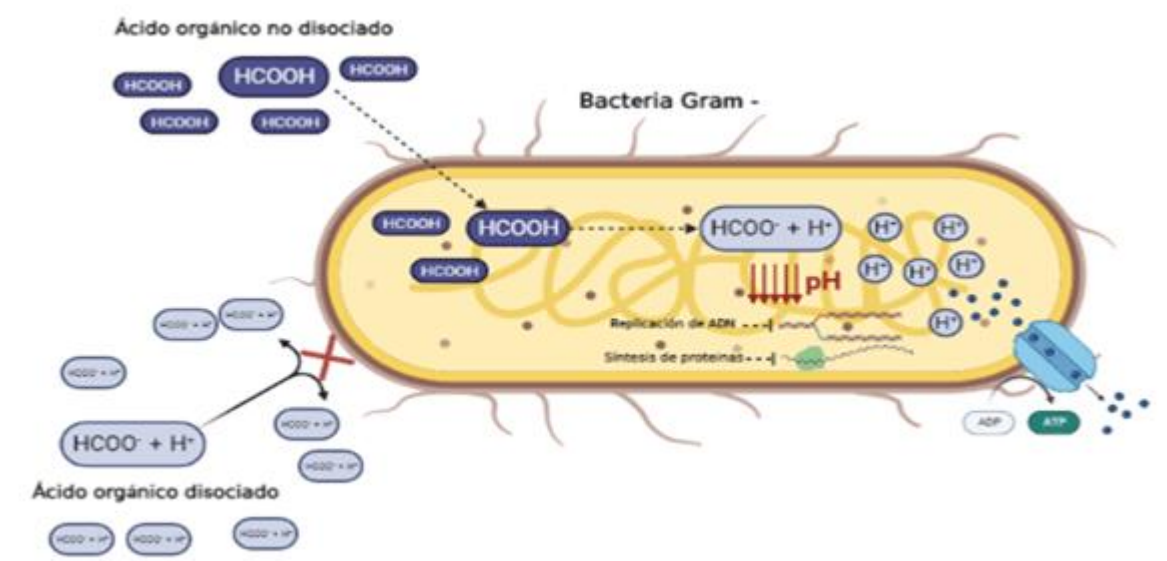
### **Ácidos orgánicos**

La producción de ácidos orgánicos durante la fermentación ácido láctica y el descenso del pH resultante es un fenómeno clave para la inhibición de microorganismos patógenos y de deterioro en quesos y leches fermentadas. El poder inhibitorio de estas sustancias depende del tipo de ácido, el pH de la matriz alimentaria y la concentración a la cual se encuentra. A su vez, este último factor varía dependiendo de la/s especie/s o cepa/s de BAL que compone/n el fermento y las condiciones de crecimiento. Los ácidos láctico y acético constituyen los principales ácidos orgánicos generados por las BAL, sus propiedades antimicrobianas son las que están mejor caracterizadas y al contar con status GRAS estos ácidos son empleados en los alimentos, siendo los principales acidulantes de uso industrial (Amenu, 2013).

Los ácidos orgánicos presentan actividad antimicrobiana porque producen acidificación del medio, en esas condiciones las moléculas de ácido se encuentran no disociadas lo que favorece su liposolubilidad, siendo capaces de atravesar la membrana celular de los microorganismos. El pH en el interior de la célula es más



alto que el pKa (constante de disociación) del ácido, por lo cual las moléculas se disocian y los protones liberados se acumulan aumentando el pH intracelular. Esto provoca la desnaturalización de enzimas y otros componentes estructurales y funcionales, en consecuencia las reacciones metabólicas se detienen. Por otra parte, dependiendo del anión presente en el ácido, ocurren procesos metabólicos tóxicos adicionales. Además los ácidos orgánicos actúan aumentando la permeabilidad de la membrana celular al neutralizar su potencial electroquímico de membrana celular, resultando en la interrupción de los sistemas de transporte de sustratos (Djadouni y Kihal, 2012; Erginkaya *et al.*, 2014). En la figura 2 se muestran los mecanismos descritos anteriormente.



**Figura 2.** Mecanismo de actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos frente a las bacterias patógenas (Rodríguez, 2022).

Es posible aumentar la efectividad de los ácidos al emplear ciertas combinaciones de ellos, por ejemplo: ácido láctico y acético, propiónico con fórmico o láctico junto a ácido fórmico, ya que actúan sinérgicamente. El efecto sinérgico se debe a que a cualquier valor de pH los ácidos orgánicos cuyos pKa son más bajos van a encontrarse mayoritariamente en forma no disociada, debido a esto carecen de capacidad de ingresar en las células y desencadenar el mecanismo de acción, pero disminuyen el pH del medio favoreciendo que la desprotonación de los ácidos

con pKa más altos de modo que potencia su acción efectora. Asimismo, los ácidos orgánicos se pueden emplear en combinación con otros compuestos antimicrobianos, por ejemplo, las bacteriocinas y lograr un efecto inhibitorio mayor (De Jesus, 2016).

Algunos de los microorganismos que el ácido láctico es capaz de inhibir son: *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium tuberculosis*, bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus* y *Clostridium*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus coagulans*, *Aspergillus* sp., *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp., *Helicobacter pylori* y *E. coli*. En cuanto al rango de acción del ácido acético comprende a variedad de microorganismos entre ellos: *S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella bareilly* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Este ácido tiene mayor acción letal que el láctico, fórmico, cítrico y sulfúrico sobre ciertos microorganismos: *H. pylori*, *Y. enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli* O157:H7 y *Aspergillus parasiticus* (Erginkaya *et al.*, 2014).

A pesar que el ácido acético es más efectivo que el láctico, su uso en los alimentos se encuentra limitado por el intenso olor y sabor que otorga, a diferencia del ácido láctico que confiere un sabor más suave. Debido a esto, la industria alimentaria suele emplear mezclas de ácido láctico y acético para compensar la acción antimicrobiana de las altas concentraciones requeridas de ácido acético por el efecto sinérgico obtenido al combinar ambos ácidos (Erginkaya *et al.*, 2014). Además de los ácidos ya mencionados, algunas especies de BAL producen otros ácidos como el benzoico, sórbico, propiónico, 3-fenil- láctico, 4-hidroxi-fenil-láctico y el ácido indol láctico (Blagojev *et al.*, 2012; Naz *et al.*, 2013).

Los estereoisómeros L y D del ácido 3-fenil-láctico (PLA) al igual que el ácido 4-hidroxi- fenil-láctico (OH-PLA) tienen actividad antifúngica y antibacteriana. Dichos ácidos son respectivamente producidos a partir de fenilalanina y tirosina por algunas cepas de *Lactobacillus* spp.. De los dos isómeros la forma D-PLA tiene

mayor acción antimicrobiana que la L-PLA. Algunos de los microorganismos que son susceptibles a estos compuestos son: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *B. cereus*, *E. faecalis*, *Klebsiella oxytoca*, *Providencia stuartii*, *Salmonella enterica*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.. Estos metabolitos además de presentar acción antimicrobiana, están involucrados en el desarrollo del “flavor” de los quesos (Manu, 2012).

El ácido benzoico que es uno de los preservantes más empleado en la industria alimentaria, es principalmente utilizado por su acción antifúngica aunque también puede inhibir bacterias Gram-negativas. Algunos de los microorganismos inhibidos son: *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.. Es producido por varias especies de LAB y NSLAB: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus paracasei*, que pueden sintetizarlo a partir de ácidos de la leche como el ácido hipúrico, mediante  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos o a través de la degradación de fenilalanina (Yu *et al.*, 2016). En los quesos los ácidos láctico, acético y propiónico son los más abundantes, pero debido a sus respectivos valores de pKa: 3.08, 4.75 y 4.87 difieren en su capacidad de inhibición. En el rango de pH alcanzado por estos productos y considerando igual concentración de los tres compuestos, el ácido propiónico se encuentra en mayor porcentaje bajo la forma no disociada por su elevado pKa, en consecuencia es el que tiene mayor efectividad, mientras que el ácido láctico es el menos efectivo dado que su pKa es el más bajo por lo que se encuentre mayoritariamente en la forma disociada. Sin embargo, el ácido láctico es el principal responsable de la inhibición microbiana por encontrarse en mayor concentración, con excepción de los quesos de pasta dura (Amenu, 2013).

### **Peróxido de hidrógeno**

En presencia de oxígeno las BAL producen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por acción de diferentes enzimas: flavoproteín oxidasas, NADH peroxidasas,  $\alpha$ -glicerofosfato oxidasa, NADH oxidasa y la superóxido dismutasa. En ausencia de

grupo hemo las BAL no sintetizan catalasa que degrada el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por lo que se acumula en el medio y puede presentar efecto citotóxico sobre bacterias, hongos y levaduras dependiendo de varios factores: concentración del compuesto, carga orgánica, pH del alimento y condiciones de temperatura. Dicha acción biocida involucra el daño del ADN celular. También es capaz de destruir esporas bacterianas pero se desconoce el modo de acción (Şanlıbaba y Güçer, 2015; De Jesus, 2016). Los mecanismos antimicrobianos ejercidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son la peroxidación de lípidos de la membrana celular que aumenta su permeabilidad y la oxidación de grupos sulfhidrilos de las proteínas lo que provoca su desnaturalización. Asimismo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es precursor de especies radicales del oxígeno que presentan actividad bactericida, por ejemplo los radicales superóxido e hidroxilo que pueden dañar el ADN (Şanlıbaba y Güçer, 2015). El peróxido de hidrógeno también puede desintegrar biofilms facilitando la destrucción de las células. En combinación con ácido acético o peracético tiene efecto bactericida y fungicida. Mezclas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con ácido láctico o cítrico logran eliminar *E. coli*, *S. enterica* y *L. monocytogenes* (Martin y Maris, 2012a).

Se han aislado varias cepas de *Lactococcus* y *Lactobacillus* capaces de inhibir mediante producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a *S. aureus*, *Pseudomonas* sp. y otras bacterias psicrótrofas provenientes de alimentos. En condiciones de refrigeración aislamientos de distintos géneros de BAL productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> han inhibido el crecimiento de microorganismos psicrotrofos y patógenos alimentarios (Reis *et al.*, 2012). También se determinó que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* es una de las BAL que genera mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En un estudio posterior se comprobó la capacidad de una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *lactis* de inhibir el desarrollo de *E. coli* O157:H7 en carne cruda de pollo durante su refrigeración y que el principal responsable de dicha inhibición era el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (De Jesus, 2016).

El empleo del peróxido de hidrógeno como preservante está mayormente estudiado en leche cruda, en la cual conforma junto con iones tiocianatos de la dieta del animal y la enzima lactoperoxidasa un sistema antimicrobiano denominado “sistema lactoperoxidasa”. Sin embargo el uso potencial de este

compuesto en otros alimentos es limitado porque puede afectar las propiedades organolépticas del producto al provocar reacciones de rancidez, decoloración o enverdecimiento (Vásquez *et al.*, 2009).

### **Acetaldehído, diacetilo y acetoína**

Los compuestos aromáticos diacetilo, acetaldehído y acetoína son producidos por varias cepas de BAL, estos metabolitos también presentan actividad antimicrobiana. El diacetilo y la acetoína son productos de la fermentación del citrato realizada por varias cepas de *Leuconostoc*, *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), *Pediococcus* y *Lactobacillus*. El precursor de ambos compuestos,  $\alpha$ -acetolactato, se convierte en diacetilo por descarboxilación oxidativa, mientras que la acetoína se produce por descarboxilación del  $\alpha$ -acetolactato y por reducción del diacetilo. Tanto el diacetilo como la acetoína presentan actividad inhibitoria sobre bacterias Gram-negativas, hongos y levaduras y en menor grado sobre bacterias Gram-positivas. Se conoce el modo de acción del diacetilo, este consiste en impedir la utilización de arginina al asociarse a proteínas de unión a arginina. La concentración de diacetilo necesaria para inhibir microorganismos Gram-negativos es 200  $\mu\text{g/mL}$ , pero se requieren 300  $\mu\text{g/mL}$  para que presente acción bacteriostática contra Gram-positivos (Erginkaya *et al.*, 2014).

Se ha determinado que el diacetilo presenta actividad antibacteriana contra *Listeria*, *Salmonella*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *Aeromonas* y *Bacillus*. Su empleo en alimentos como bioconservante es limitado debido a que las concentraciones sensorialmente aceptables son 2 - 7  $\mu\text{g/mL}$ . Además, los niveles de diacetilo producidos por las bacterias ácido lácticas suelen ser de 2 - 4  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, puede ser utilizado en combinación con otros agentes antimicrobianos aumentando la efectividad de los mismos (De Jesús, 2016).

El acetaldehído es un compuesto de sabor presente en queso, yogur, vino y cerveza que también posee acción antimicrobiana. Es producido principalmente por BAL a partir del piruvato generado en distintas vías metabólicas, como la

fermentación heteroláctica, fermentación de citrato y el catabolismo de aminoácidos, aunque la conversión de treonina en acetaldehído y glicina es la que genera mayores niveles de este metabolito, esta reacción es catalizada por la enzima treonina aldolasa. Algunos ejemplos de BAL que producen acetaldehído de esta forma son *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*, en cambio *Leuconostoc* spp. y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* lo generan por fermentación de citrato (Papagianni, 2012; Erginkaya *et al.*, 2014).

En productos lácteos el acetaldehído logra inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *S. typhimurium* y *E. coli* a concentraciones de 10 - 100 ppm. En este tipo de alimentos fermentados el acetaldehído producido puede alcanzar una concentración de 25 ppm, ejerciendo actividad inhibitoria contra estos microorganismos. El mecanismo de acción de este compuesto sigue sin determinarse, se considera que puede involucrar la capacidad del acetaldehído adicionado de sustituir el acetaldehído intracelular cuando la permeabilidad de la membrana celular es alterada por etanol (Erginkaya *et al.*, 2014).

### **D-aminoácidos**

Varias especies bacterianas, entre ellas las comprendidas dentro del grupo de las bacterias ácido lácticas, pueden producir D-aminoácidos extracelulares que tienen acción antimicrobiana. La síntesis de estos compuestos en bacterias ácido lácticas requiere de enzimas denominadas aminoácido racemasas que catalizan la conversión de L- o D- aminoácidos en sus respectivos isómeros ópticos y otras enzimas involucradas en el metabolismo de D-aminoácidos como transaminasas y oxidoreductasas (Bardaweel, 2014; Mutaguchi *et al.*, 2016).

Se han identificado los D-aminoácidos sintetizados por algunos aislamientos de bacterias ácido lácticas. En vinagre de tomate fueron detectadas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactobacillus salivarius* productoras de altos niveles de D-alanina, así como aislamientos de *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus otakiensis*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus brevis* productores de otros D-aminoácidos. En sake, se encontraron las cepas *L. sakei* NBRC 15893 que generó

D-aspartato, D-alanina y D glutamato y *L. mesenteroides* subsp. *sake* NBRC 102480 productor de D-alanina, D-lisina y D-glutamato.

Por otra parte, aislamientos de *Oenococcus oeni* provenientes de vino blanco sintetizaron D-lisina, D-aspartato y D-alanina (Mutaguchi *et al.*, 2016).

### **Bacteriocinas**

Algunas BAL también pueden sintetizar compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica a nivel de los ribosomas denominados bacteriocinas. Estos compuestos presentan efecto bactericida o bacteriostático sobre microorganismos filogenéticamente cercanos a la cepa productora, la cual contiene genes que le confieren resistencia para sus propias bacteriocinas. La producción de bacteriocinas no es exclusiva de las bacterias ácido lácticas, existen otras bacterias Gram-positivas así como Gram-negativas capaces de sintetizarlas, de hecho se estima que el 99% de las bacterias sintetizan al menos una bacteriocina. Dicha producción ocurre durante la fase de crecimiento exponencial o hacia el final de ésta y cesa en la fase estacionaria (Beristain-Bauza *et al.*, 2012; Abbasiliasi *et al.*, 2017).

En función del rango de microorganismos inhibidos, el espectro de inhibición de las bacteriocinas se puede clasificar en tres categorías: estrecho, intermedio o amplio. La mayoría de las bacteriocinas de BAL son de espectro estrecho ya que inhiben cepas pertenecientes al mismo género de la cepa bacteriocinogénica. Sin embargo existen bacteriocinas con espectro intermedio, las cuales son activas sobre otros géneros pertenecientes a BAL. Así como algunas de amplio espectro que además de inhibir BAL tienen efecto sobre otros géneros bacterianos filogenéticamente próximos (Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

Las bacteriocinas de BAL se caracterizan por ser compuestos catiónicos, hidrofóbicos o anfipáticos constituidos por 20 a 60 aminoácidos. Desde el punto de vista molecular, los genes estructurales y los elementos genéticos que codifican las proteínas de transporte y/o de secreción de dichas moléculas, enzimas responsables de modificaciones posttraduccionales en las bacteriocinas, proteínas

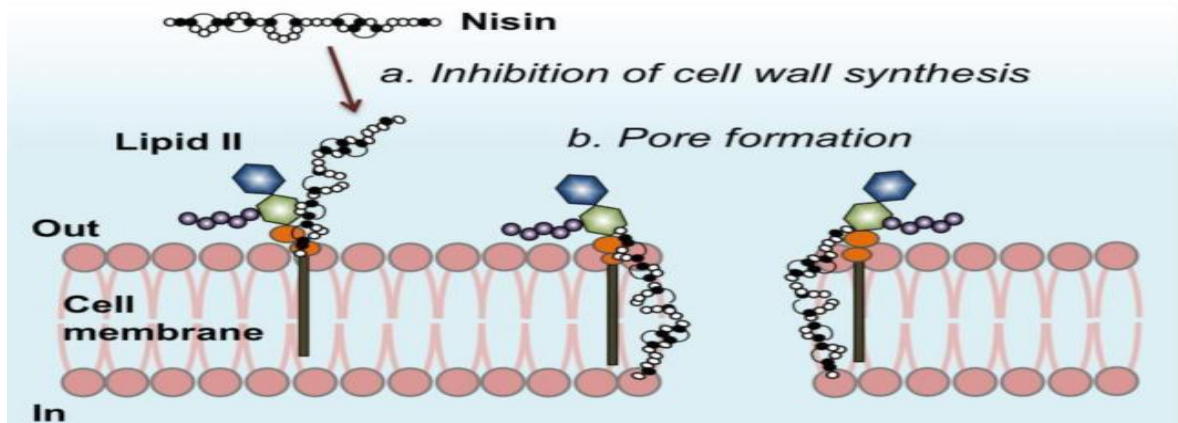
reguladoras, así como resistencia del microorganismo productor para la propia bacteriocina (factores de inmunidad) están organizados en clusters, siendo todos ellos expresados simultáneamente. Estos determinantes genéticos se pueden encontrar localizados en el cromosoma bacteriano, aunque frecuentemente se hallan en elementos genéticos móviles: plásmidos o transposones capaces de ser transferidos horizontalmente a otras cepas de BAL (Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

### **Mecanismos de acción de las bacteriocinas**

Actualmente se proponen como posibles mecanismos de acción de las bacteriocinas la formación de poros en la membrana celular, la inhibición de la germinación de esporas bacterianas, inhibición de la formación de septo durante la división celular o por acción sobre blancos intracelulares, en este sentido hay bacteriocinas capaces de bloquear el metabolismo del ADN, ARN o de las proteínas, también se plantea como mecanismo antibacteriano la activación de enzimas autolíticas que provocan autólisis celular. El mecanismo de inhibición más conocido es la generación de poros en la membrana celular, mediante los que se pierden iones y metabolitos esenciales, se altera la fuerza protón motriz necesaria para la generación de energía y se detiene la síntesis de ADN, ARN y proteínas, conduciendo eventualmente a la muerte celular (Silva *et al.*, 2018). En la figura 3 se presentan estos mecanismos que provocan la inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas.

En base a la naturaleza anfipática de la mayoría de las bacteriocinas se considera que este mecanismo ocurre por interacciones electrostáticas entre residuos catiónicos presentes en el extremo C o N-terminal, dependiendo de la bacteriocina, con receptores específicos de la membrana de carga negativa, los cuales son conservados a nivel de clase o subclase de bacteriocina. A su vez las regiones hidrofóbicas de los péptidos antimicrobianos permiten la inserción de éstos en la membrana celular (Cheng *et al.*, 2014; Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).





**Figura 3.** Modo de acción de las bacteriocinas (Fuente: Pérez *et al.*, 2015).

Es importante señalar que algunas bacteriocinas como la nisina interactúan con la bicapa lipídica mediante el lípido II, el transportador del monómero N-acetilglucosamina-N-acetilmurámico, precursor de la pared de peptidoglicano, por lo cual pueden desencadenar dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana y/o formación de poro en la membrana celular. En el caso de la nisina, el mecanismo activado tras la unión al lípido II depende de la concentración de la bacteriocina presente. A baja concentración inhibe la síntesis de la pared de peptidoglicano, mientras que a alta concentración el lípido II media la formación de poros en la membrana celular (Chikindas *et al.*, 2018).

Por otra parte, la nisina y otras bacteriocinas de la misma clase (lantibióticos) tienen acción inhibitoria sobre la germinación de las esporas bacterianas. En la actualidad existe poco conocimiento respecto a la interacción de las bacteriocinas con las esporas y la actividad anti-espora desencadenada. Se sabe que algunas bacteriocinas actúan sobre esporas que no iniciaron el proceso de germinación, denominadas dormantes, por lo que tienen efecto esporicida, otras en cambio presentan acción esporostática porque inhiben las esporas que iniciaron el proceso de germinación. También hay bacteriocinas capaces de afectar la tasa de germinación de la spora (Egan *et al.*, 2016). En este mecanismo el lípido II ha sido propuesto como molécula de anclaje para las bacteriocinas en las esporas. En las esporas que se encuentran en etapa de germinación se considera que

existe una reacción entre grupos sulfhidrilos de proteínas presentes en la envoltura de la espora y residuos deshidratados de la bacteriocina, que probablemente actúan como aceptores de electrones (Roces *et al.*, 2012).

# *Materiales y métodos*

## **CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Elaboración del aditivo zotécnico VITAFERT en condiciones de laboratorio**

Obtención del inóculo. El inóculo se obtuvo a partir de yogurt natural, producido en la Empresa Combinado de la Industria Láctea (ECIL) de Matanzas, Cuba. Este producto se elaboró con cepas procedentes de la colección del Instituto de Investigaciones de la Industria de los Alimentos (IIIA): *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*. El cultivo se encontraba a una concentración de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, lo que se corresponde con los valores normales para la producción de yogurt natural. El inóculo se conservó a 4 °C hasta su utilización.

Para la obtención del preparado microbiano se siguió la metodología propuesta por Elías y Herrera (2008), modificada por Beruvides *et al.* (2018). Para esta investigación se elaboraron cinco lotes, preparados en tanques plásticos de 20 L al mismo tiempo, en los que se pesaron y mezclaron todos los componentes con la sustitución de la miel final, como fuente de carbono, por azúcar crudo más la adición del inóculo (yogurt natural). El biopreparado se mantuvo durante 96 h en fermentación a temperatura ambiente (24 °C) y se activó cada 12 h mediante agitación con una paleta de madera. Su formulación se presenta en la tabla 2, así como los aportes energéticos y proteicos de las materias primas utilizadas.

Se analizaron las características organolépticas como olor, color y consistencia o textura. Determinación de pH: para determinar el comportamiento del pH durante la elaboración de este aditivo zotécnico se realizaron mediciones cada 24 h en todos los lotes desde la hora 0 hasta las 96 h con pHmetro digital (Sartorius Meter PP-25).

**Tabla 2.** Formulación del aditivo zotécnico VITAFERT obtenido en condiciones de producción a pequeña escala.

Composición	Niveles de inclusión (kg)	Aportes	
		Energético (MJ.kg <sup>-1</sup> )	Proteico (%)
Inóculo (yogurt natural)**	1	3,014	0,3
Harina de maíz*	4	0,040	0,85
Harina de soya*	4	0,039	0,83
Urea***	0,5	-	281
Sulfato de amonio*	0,25	-	21
Sal mineral*	0,5	-	-
Azúcar crudo*	15	0,041	-
Agua	100L	-	-

Fuente: NRC (2012)\*, IIIA\*\*

## 2.2. Caracterización microbiológica del VITAFERT

**Conteo de bacterias ácido lácticas y levaduras.** La determinación de la presencia de estos microorganismos se realizó cada 4 h a través de todo el proceso fermentativo durante 96 h en los cinco lotes estudiados.

Para efectuar el conteo de las bacterias ácido lácticas (BAL) y las levaduras se realizaron diluciones seriadas de las muestras (1:10, v/v) en agua de peptona hasta  $10^{-11}$ . De estas diluciones, se utilizaron para las BAL, en las primeras 12 h  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  y en horas posteriores  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$  para sembrarlas a profundidad en placas con agar MRS (De Mann *et al.*, 1960) (BIOCEN). Para las levaduras se tomaron las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  en las primeras 12 h y posteriormente se emplearon las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ . Cada una de estas se replicó tres veces (1 mL) en agar rosa de bengala (rosa de bengala 0,05% y cloranfenicol 0,5%) (HISPANLAB, España). Después de incubar a 37 °C (durante 72 h para BAL y 48 h para levaduras) se realizó el conteo microbiano. El número de UFC se determinó bajo lupa por conteo visual de colonias.

**Conteo de microorganismos contaminantes:** el conteo se realizó de acuerdo a las normas vigentes, descritas para los estudios de la calidad microbiológica de los alimentos de consumo humano y animal NC-ISO (tabla 3). Para ello se realizaron

diluciones seriadas de las muestras (NC ISO 6887-1: 2002) y se ejecutaron las técnicas de determinación de los diferentes grupos de microorganismos.

**Tabla 3.** Pruebas microbiológicas para la determinación de microorganismos contaminantes en el aditivo zootécnico VITAFERT.

Pruebas microbiológicas	Referencias NC- ISO
Conteo de coliformes fecales y totales	4832: 2010
Conteo de <i>Bacillus cereus</i>	4833-1: 2014
Conteo de <i>Salmonella</i> en 25 mL	6579: 2008

### 2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del aditivo zootécnico VITAFERT frente a bacterias patógenas

Para evaluar la actividad antibacteriana de VITAFERT se empleó la técnica de difusión en agar, propuesta por Schillinger y Lucke (1989). Para ello se montó un experimento con diseño completamente aleatorizado y arreglo factorías 2X9 (2 tratamientos: 1 cepa de referencia y 2 VITAFERT) y 9 cepas patógenas.

**Tratamiento de las sustancias producidas:** A partir del VITAFERT elaborado se tomaron muestras, las cuales se centrifugaron a 15 000 rpm a 5°C (MSM HIGH SPEED 18) por 10 min. Posteriormente, los sobrenadantes se filtraron a través de filtros microbiológicos de 0,22 µ (Minisart, satorius 600 kPa max).

**Tratamiento de las cepas indicadoras:** Como cepas indicadoras se utilizaron las cepas patógenas: *Staphylococcus* 1023, *Staphylococcus aureus* C1, *Staphylococcus coagulasa* negativo C7, *Streptococcus* sp., *Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. y *Corynebacterium* sp. C11. Todas procedentes del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Matanzas. 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L de sobrenadante del VITAFERT. Se utilizó como referencia una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. 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 24 y 48 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.

#### **2.4 Valoración desde el punto de vista teórico la importancia económica del empleo del VITAFERT como preventivo de enfermedades en animales de interés zootécnico.**

Se realizó una valoración teórica de la importancia del uso del VITAFERT como preventivo ante la utilización de antibióticos. Se buscó información de los costos de los antibióticos más utilizados en la producción de aves, cerdos, terneros y conejos, los cuales se pudieran reducir al utilizar el VITAFERT durante el proceso productivo.

#### **2.5 Análisis estadístico**

A los resultados de la caracterización química y microbiológica del VITAFERT se aplicó estadística descriptiva, para lo cual se determinó: media, desviación estándar y coeficiente de variación. Los valores de pH, concentración de BAL y levaduras se procesaron mediante un análisis de varianza y se utilizó la dócima de Duncan (1955). El paquete estadístico utilizado fue INFOSSTAT Versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017). Los valores de la población de BAL y levaduras se transformaron a LN para lograr normalidad en los datos. Para el análisis de los resultados de la inhibición de las bacterias patógenas se realizó un análisis de varianza simple y se empleó la misma dócima y el mismo paquete estadístico.

## *Resultados y discusión*



## CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Elaboración del aditivo zotécnico VITAFERT en condiciones de laboratorio

Los cinco lotes de VITAFERT presentaron las siguientes características organolépticas:

Color: crema o beige

Olor: leche fermentada

Consistencia: viscosa

El pH medio de los diferentes lotes de VITAFERT se muestra en la siguiente tabla 4. Se comprobó que no se presentan diferencias en el pH en los cinco lotes, lo cual coincide con los valores obtenidos por Elías y Herrera (2008). El hecho de que se obtengan valores de pH similares indica que la metodología establecida tiene repetibilidad.

**Tabla 4.** Comportamiento del pH de los diferentes lotes de VITAFERT a las 0, 24, 48, 72 y 96 h.

Indicador	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	P ±EE	
pH	0	7,89	8,1	7,98	8,02	8,12	P=0,3124 ±3,03
	24	6,22	6,34	6,12	6,23	6,18	P=0,2854 ±2,09
	48	5,12	5,08	5,21	5,15	5,04	P=1,2354 ±2,31
	72	4,54	4,63	4,51	4,61	4,62	P=0,4123 ±2,8675
	96	4,02	4,10	4,05	4,13	4,09	P=0,4312 ± 1,33

Por otra parte, se evidencia como el pH disminuye de valores de 8 hasta 4 debido a la producción de ácidos orgánicos por parte de las bacterias ácido lácticas. Se conoce que *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* son capaces de producir ácido láctico, acético, propiónico y butírico (Dowarah *et al.*, 2018). Estos ácidos tienen gran importancia

para la estabilidad microbiológica del producto, ya que muchas bacterias patógenas no crecen bajo estas condiciones. Esta condición de pH incide en que se puedan desarrollar fundamentalmente las BAL y las levaduras presentes en el VITAFERT.

El pH ácido también propicia la actividad de algunos tipos de bacteriocinas, las cuales actúan a nivel de la pared celular o membrana citoplasmática y provocan la muerte de las bacterias patógenas (Hassan *et al.*, 2020).

### **3.2 Análisis químico y microbiológico del aditivo zootécnico VITAFERT elaborado en condiciones de laboratorio.**

#### **3.2.1 Caracterización química del VITAFERT**

En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos en la caracterización química del VITAFERT. Los valores de la composición química están en correspondencia con las determinaciones reportadas por Elías y Herrera (2008), a excepción de la materia seca que presentó valores en el orden de 9,7%, mientras que estos autores obtuvieron valores de 15,05%. Estos resultados pueden deberse a modificaciones realizadas por Beruvides (2019), quien sustituyó la miel de caña de azúcar por azúcar crudo.

Los resultados obtenidos en los indicadores MS y calcio oscilan en los rangos determinados por Gutiérrez (2012) en caracterizaciones previas al mismo producto con miel final como fuente energética. De igual manera, Beruvides (2013) elaboró en condiciones de producción el aditivo zootécnico VITAFERT, formulado con la fuente energética miel final y lo caracterizó químicamente desde la hora 0 hasta las 96 horas y obtuvo valores similares a los reportados para la MS, PB y pH observados en el presente trabajo.

**Tabla 5.** Composición química de los lotes de VITAFERT obtenido en condiciones de producción a pequeña escala.

Indicadores		Lotes de VITAFERT (%)				
		1	2	3	4	5
Materia seca	Media	<b>9,70</b>	<b>9,70</b>	<b>9,80</b>	<b>9,70</b>	<b>9,70</b>
	DE	0,053	-	-	-	0,05
	CV (%)	0,54	-	-	-	0,51
Cenizas	Media	<b>10,6</b>	<b>10,4</b>	<b>10,5</b>	<b>10,5</b>	<b>10,6</b>
	DE	-	0,02	-	-	-
	CV (%)	-	0,16	-	-	-
Calcio	Media	<b>1,33</b>	<b>1,33</b>	<b>1,32</b>	<b>1,32</b>	<b>1,33</b>
	DE	0,006	0,01	0,17	0,006	-
	CV (%)	0,43	0,75	1,31	0,43	-
Fósforo	Media	<b>0,66</b>	<b>0,64</b>	<b>0,66</b>	<b>0,63</b>	<b>0,65</b>
	DE	0,006	-	-	0,032	0,006
	CV (%)	0,088	-	-	5,05	0,88
Proteína bruta	Media	<b>7,12</b>	<b>7,12</b>	<b>7,11</b>	<b>7,10</b>	<b>7,15</b>
	DE	0,03	0,006	0,017	-	-
	CV (%)	0,41	0,08	0,24	-	-

Los resultados son el promedio de tres determinaciones, DE- Desviación estándar; CV- Coeficiente de variación (%) y (-) no presenta variación en los datos.

### 3.2.2 Caracterización microbiológica del VITAFERT

En la tabla 6 se presentan los resultados de la caracterización microbiológica de los diferentes lotes de VITAFERT. Se aprecia que este biopreparado está

constituido fundamentalmente por BAL y levaduras, las cuales conforman un consorcio microbiano.

**Tabla 6.** Caracterización microbiológica de los diferentes lotes de VITAFERT finalizada la fermentación a las 96 h.

Conteo de microorganismos (UFC mL <sup>-1</sup> )	Lotes de VITAFERT					EE± Sign
	1	2	3	4	5	
BAL	4,53x10 <sup>12</sup>	3,24x10 <sup>12</sup>	4,40x10 <sup>12</sup>	4,95x10 <sup>12</sup>	3,85x10 <sup>12</sup>	0,3804 P=0,0711
Coliformes fecales y totales	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-
<i>Bacillus cereus</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-
Levaduras viables	9,66x10 <sup>7</sup>	7,00 x10 <sup>7</sup>	9,66 x10 <sup>7</sup>	8,00 x10 <sup>7</sup>	7,66 x10 <sup>7</sup>	0,9867 P=0,2819
<i>Salmonella</i>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización química y microbiológica del aditivo zootécnico VITAFERT en los cinco lotes, se constató que hubo homogeneidad en los indicadores analizados. Se confirma que la metodología empleada para la obtención de este biopreparado en condiciones de producción a pequeña escala, no provoca variaciones considerables en la composición bromatológica de este preparado microbiano, con respecto al obtenido en fermentadores a escala de laboratorio. Los datos presentados indican que existe repetibilidad en los resultados que se obtuvieron, lo cual significa que cuando se emplean estos componentes y en las mismas condiciones, no se producen modificaciones en estos parámetros.

El pH obtenido en esta investigación (3,9-4,0) se mantuvo dentro de los rangos establecidos para productos biológicos de esta categoría (Elías y Herrera, 2008; Rojan, 2009). Caicedo y Valle (2017) definieron que estos valores de pH permiten la estabilidad en el tiempo y la conservación de estos productos biológicos, por tanto, este aditivo zootécnico se puede considerar de óptima calidad para utilizarse en la alimentación animal. Además, estos niveles de acidez disminuyen

la presencia de microorganismos patógenos y otros contaminantes (Vega *et al.*, 2013; Vélez *et al.*, 2015).

Flores-Manchero *et al.* (2015) caracterizó el pH de un producto biológico para cerdos en la etapa de preceba y crecimiento-ceba, formulado con suero de leche fresca, urea y melaza de caña de azúcar. Este autor informó un valor de pH de 3,87; similar al obtenido en la presente investigación. Estos resultados están dados por la presencia de una población considerable de BAL, las cuales producen ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico y butírico) que disminuyen el pH (Belkacem-Hanfi *et al.*, 2014).

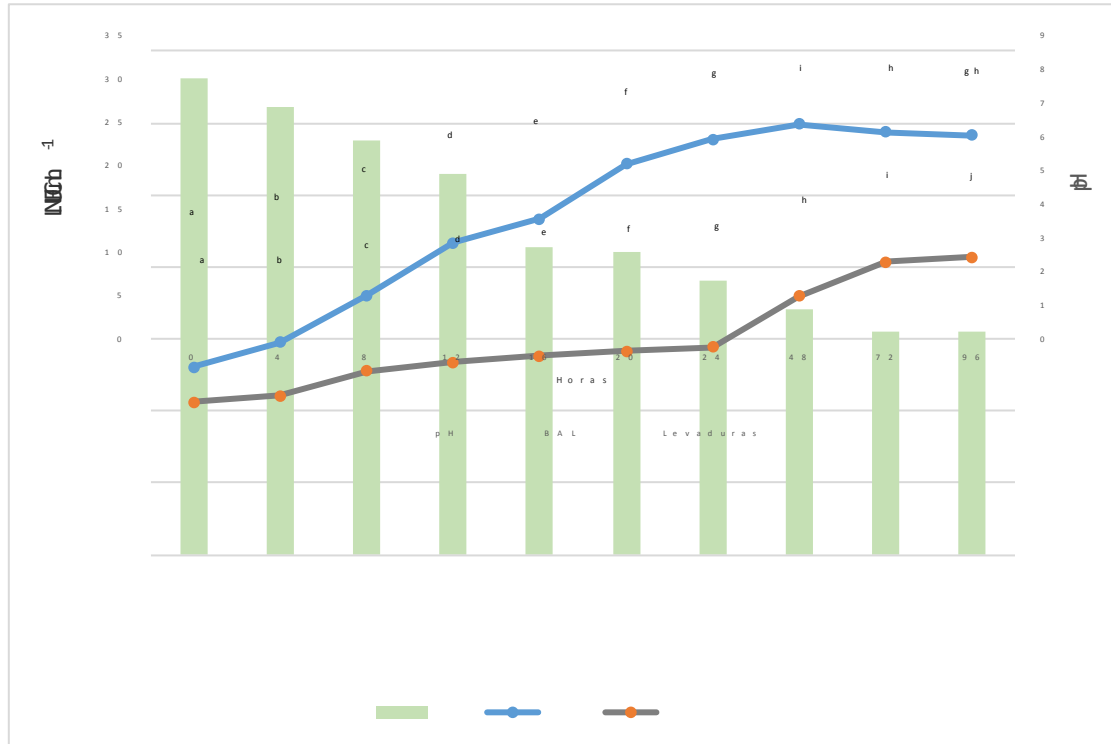
Estudios realizados por Caicedo y Valle (2017) mostraron un comportamiento similar a los obtenidos en el presente trabajo para la expresión del indicador pH cuando elaboraron un biopreparado microbiano para cerdos, el cual contenía yogurt natural, suero de leche, miel B y tubérculos de papa china.

El análisis microbiológico indica la no presencia de microorganismos contaminantes en el VITAFERT (tabla 6). Estos resultados pueden estar dados por la presencia de concentraciones altas de ácidos orgánicos (fundamentalmente láctico y acético) o bacteriocinas, aportados por las BAL (superiores a  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>), que permiten mantener libre de contaminantes a dicho producto, lo que hace viable su utilización en los animales.

Elías y Herrera (2008), Gutiérrez *et al.* (2012) y Beruvides (2013) caracterizaron desde el punto de vista microbiológico una de las variantes de VITAFERT y obtuvieron valores para *Lactobacillus* spp. en los rangos de  $10^9$  y  $10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup> y para las levaduras entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. En el presente trabajo se cuantificaron valores superiores para las BAL, esto pudiera estar dado por la sustitución de la materia prima miel final por azúcar crudo o por la población inicial que presentaba el inóculo utilizado (yogurt natural).

### 3.2.2 Cinética de crecimiento de las BAL y levaduras y comportamiento del pH en el tiempo

En la figura 4 se presentan los resultados del conteo de BAL y levaduras en el tiempo. Se comprobó que durante el proceso de fermentación, las BAL crecen hasta valores de 29 LN UFC.mL<sup>-1</sup> y las levaduras en el orden de 20 LN UFC.mL<sup>-1</sup>.



a,b,c,d,e,f,g,h,i,j Medias con letras diferentes difieren para  $P < 0,05$  (Duncan 1955) ( $EE \pm$  BAL: 0,10;  $EE \pm$  levaduras: 0,03).

**Figura 4.** Cinética de crecimiento de las bacterias ácido lácticas, levaduras y comportamiento del pH durante el proceso fermentativo del aditivo zootécnico VITAFERT.

El pH disminuyó de 8,5 a 4,0 desde el inicio de la fermentación hasta las 96 h. A través del estudio de la cinética de crecimiento de las BAL y las levaduras en el proceso de fermentación a pequeña escala se comprobó que a medida que disminuye el pH aumenta progresivamente el crecimiento de ambos grupos microbianos. Esto confirma lo informado por León (2012), que estos microorganismos pueden crecer en un amplio rango de pH (entre 4-7), a diferencia

de otros grupos microbianos como coliformes, *Salmonella* spp. y *Bacillus* spp., que en condiciones de acidez inhiben su crecimiento.

### 3.3 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del aditivo zootécnico VITAFERT frente a bacterias patógenas

En la tabla 7 se muestran los resultados de las interacciones para la actividad antimicrobiana del VITAFERT y la cepa de referencia frente a bacterias patógenas.

**Tabla 7.** Actividad antimicrobiana del VITAFERT frente a bacterias patógenas.

Cepas indicadoras	Halos de inhibición (mm)		
	Cepa de referencia <i>L. delbrueckii</i>	VITAFERT	P ±EE
<i>Staphylococcus</i> spp.1023	30 <sup>a</sup>	22, 33 <sup>b</sup>	P= 0,001  0,95
<i>Staphylococcus aureus</i> C1	16 <sup>c</sup>	14,00 <sup>c</sup>	
<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo C7	16 <sup>c</sup>	14,33 <sup>c</sup>	
<i>Streptococcus</i> spp.	17 <sup>c</sup>	14,00 <sup>c</sup>	
<i>Proteus</i> spp.	14 <sup>c</sup>	12,33 <sup>c</sup>	
<i>Escherichia coli</i>	14 <sup>c</sup>	16,00 <sup>c</sup>	
<i>Shigella</i> spp.	17 <sup>c</sup>	13,00 <sup>c</sup>	
<i>Pseudomonas</i> spp.	22 <sup>b</sup>	16,00 <sup>c</sup>	
<i>Corynebacterium</i> spp. C11	15 <sup>c</sup>	13,67 <sup>c</sup>	

Estos resultados indican que el VITAFERT tuvo la capacidad de inhibir el desarrollo de todos los microorganismos patógenos evaluados ( $P \leq 0,001$ ) lo cual se corresponde con los efectos *in vivo* observados por otros investigadores como Beruvides *et al.* (2018) en animales de interés zootécnico, cuando observaron la reducción de las enfermedades y la mortalidad. Masumuzzaman *et al.* (2021) comprobaron que la actividad antimicrobiana se codifica genéticamente y reportaron la producción de péptidos productores de bacteriocinas por *S. thermophilus* SMQ-301, lo que da una idea del potencial inhibitorio que presenta esta cepa presente también en el VITAFERT.

Recientemente, algunos agentes microbiológicos mostraron excelentes efectos en la inhibición de la invasión de *S. aureus*. Diferentes estudios informan sobre

tratamientos en las distintas fases de la infección por esta bacteria. En la primera y segunda fase, los últimos resultados de la investigación muestran que la vacuna de proteínas ancladas a la pared celular y algunos agentes microbianos pueden inhibir la adhesión de *S. aureus* a las células huésped (Li *et al.*, 2022), lo que hace pensar que el consumo sistemático de este aditivo pudiera prevenir las posibles infecciones por este microorganismo en los animales.

Se comprobó que tanto la cepa de referencia *L. delbrueckii* y el aditivo zootécnico VITAFERT ejercieron su mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas *Staphylococcus* spp.1023, *Staphylococcus aureus* C1 y *Staphylococcus* coagulasa negativo C7. Se conoce que esta 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).

El género *Staphylococcus* es causante de enfermedades como la mastitis, una infección de la glándula mamaria, causante de grandes pérdidas en la industria láctea. Esta afección puede presentarse de forma clínica o subclínica. Como medida de control se usan antibióticos para limitar las infecciones existentes. Si bien la terapia con antibióticos ayuda a reducir la incidencia de mastitis, el manejo inadecuado de estos fármacos también favorece que emerjan especies de *Staphylococcus* resistentes, lo que puede ocasionar una baja tasa de curación (Campos *et al.*, 2022). A partir de los resultados del presente trabajo, se pudiera evaluar el efecto de este aditivo en la prevención de esta enfermedad *in vivo*, ya que este microorganismo patógeno se reporta entre los principales agentes causales de esta infección.

Otros autores evaluaron la actividad antimicrobiana de cepas procedentes del yogur frente a bacterias patógenas (Eviwie *et al.*, 2020a). Autores como Khalil *et al.* (2017) indicaron el efecto antibacteriano de los lactobacilos contra los microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia.coli* al presentar actividad bactericida y bacteriostática respectivamente. Este estudio concluyó que las personas deben consumir más productos lácteos probióticos en lugar de usar



antibióticos como profilácticos, lo que conduce a problemas de salud y también alientan a la industria local a producir productos como el bioyogur.

Resultados similares al presente trabajo obtuvieron Wu *et al.* (2022), quienes observaron que la cepa *Lactobacillus delbrueckii* WDS-7 exhibió el mayor efecto de inhibición en cuatro patógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sonnei*). Estos autores señalaron que *S. aureus* fue la bacteria más inhibida en comparación con los otros patógenos probados.

El aditivo zootécnico VITAFERT inhibió también el crecimiento de *Escherichia coli*, Estos resultados indican que su suministro a los animales puede mejorar la microbiota intestinal al incrementar la presencia de microorganismos beneficiosos, como las BAL y las levaduras. Pocos microorganismos acaparan la atención de investigadores e instituciones científicas como lo ha hecho *Escherichia coli*. En un extremo de la balanza destaca su participación como comensal en la microbiota intestinal; el miembro prominente dentro de los representantes anaerobios facultativos de todos los animales de sangre caliente, y del otro lado, su desempeño como patógeno intestinal (Barreto *et al.*, 2020a).

Durante alrededor de 10 000 años la especie bovina ha sido la principal fuente de carne y leche para la humanidad. Tan largo período ha propiciado que devenga en importante reservorio de patógenos, causales de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), entre los que destaca el patotipo de *E. coli*, productor de toxina Shiga (STEC) (Sapountzis *et al.*, 2020). Al mismo tiempo, la casi totalidad de las variantes IPEC sobresalen entre los agentes productores de diarreas neonatales en terneros. Su impacto negativo se acrecienta en las primeras semanas de vida, etapa caracterizada por una elevada morbilidad y mortalidad, retardo en el crecimiento e incremento en las pérdidas económicas por concepto de tratamientos, entre otros (Awad *et al.*, 2020). De ahí la importancia de generar otros productos más baratos que prevengan su desarrollo en los animales.

Autores como Abedi *et al.* (2013) evaluaron el efecto *in vitro* el efecto antibacteriano y antiadherente de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* frente a *Escherichia coli*. Ellos comprobaron que el sobrenadante libre de células de esta bacteria mostró una buena actividad antibacteriana contra *E. coli* que se relacionó principalmente con la producción de ácido láctico. Cuando las dos bacterias se añadieron simultáneamente (inhibición competitiva) en un cocultivo, el grado de inhibición de *E. coli* por *L. delbrueckii* fue de 77%.

En el VITAFERT también se incluye la bacteria *Streptococcus thermophilus*, introducida a través del yogur. Se conoce que esta bacteria también posee efecto inhibitorio frente a bacterias patógenas. En este sentido, Evivie *et al.* (2020b) desarrollaron análisis genómicos y demostraron que *S. thermophilus* KLDS 3.1003 poseía péptidos codificadores para la producción de bacteriocinas, lo que explica sus capacidades antimicrobianas *in vitro* e *in vivo*. Este estudio mostró que esta bacteria tiene la capacidad genómica de inhibir el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos, calificándose como un potencial candidato probiótico, antimicrobiano y bioterapéutico.

Los halos de inhibición provocados por el VITAFERT frente a *Shigella* spp. demuestran que este aditivo pudiera reducir la presencia de este microorganismo. *Shigella* spp. es una de las principales causas de diarrea infecciosa grave en todo el mundo. La shigelosis está causada principalmente por el consumo de alimentos y agua contaminados (Kotloff *et al.*, 2018). Esta enfermedad, también llamada disentería bacilar, es una infección causada por bacterias del género *Shigella* spp. que contiene cuatro subgrupos con diferente capacidad patogénica (RENAPRA, 2022).

Zhang *et al.* (2020) evaluaron la actividad antibacteriana de diferentes BAL. Estos autores detectaron un nivel máximo de ácido láctico (3,1 g/L), peróxido de hidrógeno (4,31 mM) y bacteriocinas (31 AU/mg) en la cepa LB049 y observaron la actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Shigella flexneri* (ATCC 29903) y *Enterococcus faecium* (ATCC 8459), lo cual confirma el potencial antimicrobiano de estas bacterias.

*Proteus* spp. fue otra de las bacterias inhibidas por el sobrenadante libre de células del VITAFERT. Al género *Proteus* spp. pertenecen tres especies de alto interés patológico: *P. penneri*, *P. mirabilis* y *P. vulgaris*; estas bacterias están involucradas en diversas infecciones, especialmente de naturaleza nosocómica y en el tracto urinario. Las cistitis, la pielonefritis y la urolitiasis (formación de cálculos en la vejiga o los riñones) son las infecciones más comunes mediadas por *Proteus* (Anon, 2022b).

Shokouhfard *et al.* (2022) estudiaron varias propiedades de las células de *Proteus mirabilis* (formación de biopelícula, adhesión y expresión génica) y observaron que muchas se cambiaron después del tratamiento con un biosurfactante derivado de *Lactobacillus acidophilus*. En este estudio se demostró que el tratamiento con este biopreparado puede allanar el camino para un posible control del desarrollo de biopelículas producidas por *Proteus*, ya que interfiere en la adhesión de *P. mirabilis* a los catéteres y otros dispositivos.

Resultados similares al presente trabajo fueron referidos por Szczerbiec *et al.* (2022), quienes observaron que los sobrenadantes de cultivos de BAL sin tratar redujeron significativamente el crecimiento de *Proteus* spp. Estos autores refirieron que estas propiedades se relacionaban con la secreción de ácidos orgánicos por estas bacterias. A través de técnicas espectrofotométricas determinaron cualitativa y cuantitativamente los ácidos láctico, cítrico y succínico, e investigaron la influencia de estos en el crecimiento de *P. mirabilis* conjuntamente con la formación de biopelículas y la permeabilidad de las membranas. Los resultados indicaron que los ácidos orgánicos secretados por las cepas de *Lactobacillus* tienen un alto potencial antibacteriano y podrían utilizarse como agentes en el tratamiento de infecciones del tracto urinario causadas por *P. mirabilis*.

El aditivo VITAFERT produjo halos de inhibición frente a *Corynebacterium*, cepa procedente de vacas que presentaban mastitis. Las corinebacterias son en su mayoría inoñas, sin embargo, existe cada vez más evidencia de su patogenicidad, especialmente como causa de infección nosocomial en inmunodeprimidos. *Corynebacterium* es el género más importante y

*Corynebacterium diphtheriae* es la especie más relevante. Esta bacteria puede causar la difteria y *Corynebacterium bovis* es uno de los agentes causantes de la mastitis en Cuba (Ruíz *et al.*, 2014) y en el mundo (Gonçalves *et al.*, 2016).

Dong *et al.* (2021) evaluaron la actividad antimicrobiana de BAL frente a diferentes bacterias patógenas y detectaron que se redujo la abundancia relativa de *Paenibacillus*, *Aerococcus*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Facklamia* y *Globicatella*. Los resultados de este estudio revelaron que la suplementación con *Lactobacillus* no solo mejoró la microbiota intestinal, sino que también alivió la diarrea en ratones, lo que puede estar mediado por la modulación de la composición y función de la microbiota intestinal.

En el presente trabajo el VITAFERT inhibió el crecimiento de *Streptococcus* spp. Este género comprende diferentes especies que normalmente son patógenos oportunistas. Los estreptococos del grupo B (*S. agalactiae*) causan una variedad de infecciones como infección de las vías urinarias, bacteriemia, gangrena, infección posparto, neumonía, endocarditis, empiema, meningitis, etc. Los estreptococos del grupo D (*S. bovis*) suelen causar endocarditis, bacteriemia, infecciones del tracto urinario, osteomielitis y enfermedad gastrointestinal (INSST, 2022).

Otros autores también observaron actividad antimicrobiana de BAL frente a *Streptococcus*, como Humphreys y McBain (2019), quienes destacaron que las bacterias candidatas a probióticas podían prevenir o tratar la faringitis bacteriana provocada por *Streptococcus pyogenes*. Tres probióticos candidatos, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus salivarius*, redujeron la viabilidad dentro de las biopelículas existentes de *S. pyogenes* mediante la elaboración de factores difusibles distintos de los ácidos.

El sobrenadante del VITAFERT inhibió el crecimiento de *Pseudomonas* spp. Esta bacteria provoca procesos patológicos caracterizados por síndrome anémico depresivo, fiebre y enteritis, que puede llegar a ser hemorrágica. *Pseudomona aeruginosa* produce trastornos en mamíferos, aves e inclusive en reptiles. En

gatos y perros es causa frecuente de otitis con otorreas. De la rinitis atrófica de los cerdos se aísla, posiblemente como agente secundario. En bovinos y equinos es causa de abortos accidentales. En las aves es más común entre los pollos, faisanes y pavos. Se han efectuado aislamientos a partir del tracto respiratorio de aves afectadas de enfermedad respiratoria crónica (EcuRed, 2022).

Otros autores también evaluaron la actividad antimicrobiana de las BAL como Panda *et al.* (2017). Estos autores demostraron que las BAL SB10 y JC13 provocaron una zona de 3 mm contra *Staphylococcus aureus*, una zona de 2 mm contra *Klebsiella*, una zona de 1 mm contra *E. coli* y no mostraron efecto antimicrobiano contra *Pseudomonas*, resultados que no coinciden con los del presente trabajo, ya que el VITAFERT incidió frente a esta última bacteria con halos de 16 mm.

Como se puede apreciar la actividad antimicrobiana *in vitro* del aditivo zootécnico VITAFERT, confirma los resultados obtenidos *in vivo* por otros autores (Beruvides *et al.*, 2018; Silvestre, 2021), quienes refirieron la reducción de enfermedades, provocadas por bacterias patógenas. Las sustancias denominadas postbióticas, producto de la actividad microbiana, hacen de este aditivo zootécnico un excelente producto para prevenir las enfermedades en los animales.

### **3.4 Valoración económica**

Al realizar una valoración económica de la factibilidad de la aplicación del aditivo zootécnico VITAFERT en animales de interés pecuario, se hace necesario analizar los costos de producción del preparado microbiano y el efecto beneficioso que este provoca en estas especies como son: disminución o eliminación en la incidencia de diarreas, disminución de la morbilidad y mortalidad, incremento de la ganancia de peso y mejora de la conversión alimentaria. Si se toma en cuenta los precios de los antibióticos, tanto los que se usan como terapéuticos como los promotores del crecimiento en el mercado internacional, que cada día aumentan significativamente su valor, entonces se pudiera plantear que con la aplicación de este aditivo en la alimentación de los animales tendríamos una reducción de los

costos que incurren en el proceso productivo y unido a esto una mejora en la rentabilidad económica de las unidades pecuarias que lo utilicen.

## *Conclusiones*

## CONCLUSIONES

1. La caracterización química y microbiológica del aditivo zotécnico VITAFERT, obtenido en condiciones de laboratorio, demostró la presencia de ácidos orgánicos, la no proliferación de microorganismos patógenos y el incremento de las poblaciones de BAL y levaduras.
2. El aditivo zotécnico VITAFERT presenta sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* y *Corynebacterium*.
3. La aplicación del aditivo zotécnico VITAFERT en la alimentación de animales de interés zotécnico presume una reducción en los costos de producción debido al bajo consumo de antibióticos y pudiera incrementar las ganancias teniendo en cuenta los beneficios que este preparado microbiano ejerce sobre la productividad.



## *Recomendaciones*

## **RECOMENDACIONES**

1. Determinar la concentración de los ácidos orgánicos presentes en el aditivo zootécnico VITAFERT.
2. Realizar cocultivos del VITAFERT con los microorganismos que presentaron mayor inhibición para la evaluación de la acción directa entre los microorganismos.
3. Determinar qué sustancias antimicrobianas se producen en el VITAFERT y provocan la inhibición de los microorganismos patógenos.

## *Referencias bibliográficas*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Ibrahim, T.A.T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N.R., Mustafa, S., Ariff, A.B. 2017. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. RSC Advances, Vol. 7, No. 47, 29395 - 29420.
2. Abedi, D., Feizizadeh, S., Akbari, V., Jafarian-Dehkordi, A. 2013. In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. Research in pharmaceutical sciences, 8(4), 260–268.
3. Abramov V, Khlebnikov V, Kosarev I, Bairamova G, Vasilenko R, Suzina N, et al. 2014. Probiotic Properties of *Lactobacillus crispatus* 2,029: Homeostatic Interaction with Cervicovaginal Epithelial Cells and Antagonistic Activity to Genitourinary Pathogens. Probiotics Antimicrob Proteins 6(3-4):165-176.
4. Adil, S., Magray, S. 2012. Impact and manipulation of gut microflora in poultry: A review. J. Anim. Vet. Adv. 11: 873-877.
5. Amenu, D. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from “Ergo”, Ethiopian traditional fermented milk. Current Research in Microbiology and Biotechnology 1(6): 278 - 284.
6. Anon. 2022. Streptococcus-thermophilus. A lactic acid bacteria. Mindzymes. Disponible en: <https://mindzymes.com/streptococcus-thermophilus/>. Fecha de consulta: 24 de noviembre de 2022.
7. Anon. 2022a. Streptococcus-thermophilus. A lactic acid bacteria. Mindzymes. Disponible en: <https://mindzymes.com/streptococcus-thermophilus/>. Fecha de consulta: 24 de noviembre de 2022.
8. Anon. 2022b. Proteus: Infecciones Y Enfermedades. Disponible: <https://energymedresearch.com/81009-proteus-infections-and-diseases>. Fecha de consulta: 2 de diciembre de 2022.
9. Awad, W. S., El-Sayed, A. A., Mohammed, F. F., Bakry, N. M., Abdou, N. E. M., Kamel, M. S. 2020. Molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic and in-contact cattle and buffalo calves. Tropical animal health and production, 52(6), 3173-3185. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02343-1> [ Links ].
10. Bacardi-Sarmiento E. 2021. Efectos de los probióticos, prebióticos y simbióticos sobre la microbiota intestinal. EsTuSalud [revista en Internet]. 2021 [citado 5 Dic 2022]; 3 (3) Disponible en: <https://revestusalud.sld.cu/index.php/estusalud/article/view/67>.
11. Bardaweel, S.K. 2014. D-Amino acids: prospects for new therapeutic agents. Journal of Medical and Bioengineering, Vol. 3, No. 3, 195 - 198.

12. Barreto Argilagos, G., Rodríguez Torrens, H., Campal Espinosa, A. 2020. Cuatro elementos contribuyen a que la colibacilosis porcina persista en Camagüey. *Revista de Producción Animal*, 32(3). <https://revistas.reduc.edu.cu/index.php/rpa/article/view/e3550> [ Links ].
13. Belkacem-hanfi, N., Fhoula, I., Semmar, N., Guesmi, A., Perraud-Gaime, I., Ouzari. H., Boudabous, A., Roussos S. 2014. Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxina isolated from stored wheat. *Biological Control*. 76, p. 52-59.
14. Beristain-Bauza, S.C., Palou, E. y López-Malo, A. 2012. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, Vol. 6, No. 2, 64 - 78.
15. Beruvides, A. 2009. Efecto de un producto biológicamente activo (VITAFERT) en el comportamiento productivo y salud de la ceba porcina. Tesis presentada en opción al título de Máster en Producción Animal para la zona Tropical. ICA. La Habana. p. 51.
16. Beruvides, A. 2013. Efecto de la inclusión de diferentes niveles de VITAFERT sobre el comportamiento productivo y de salud en la ceba porcina. Tesis presentada en opción al título de Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia. La Habana, Cuba. p. 86.
17. Beruvides, A., Elías †, A., Valiño, Elaine C, Milián, Grethel, Rondón, Ana J., Rodríguez, Marlen, & Milián, J.. (2021). Caracterización química y microbiológica del aditivo zootécnico VITAFERT en condiciones de producción a pequeña escala. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 55(1), 57-65. Epub 01 de marzo de 2021. Recuperado en 06 de diciembre de 2022, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2079-34802021000100006&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802021000100006&lng=es&tlng=es).
18. Beruvides, A., Elías, A., Valiño, Elaine. C., Milián G, Rodríguez, M. & González, R. 2018. Comportamiento productivo y de salud en lechones lactantes suplementadas con azúcar fermentado con yogurt. *Livestock Research for Rural Development*. Volume 30, Article #72. Retrieved April 2, 2018. < <http://www.lrrd.org/lrrd30/4/agust30072.html>>.
19. Beruvides, R. A. 2019. Efecto del aditivo zootécnico VITAFERT en la respuesta biológica de crías y recebas porcinas. Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. P-100.
20. Blagojev, N., Škrinjar, M., Vesković-Moračanin, S. and Šošo, V. 2012. Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 17, No. 3, 7219 - 7226.
21. Brea, O. 2015. Obtención de un alimento energético-proteico a partir de la fermentación en estado sólido de la harina del fruto del árbol del pan (*Artocarpus altilis*) y su empleo en dietas para conejos y cerdos. Tesis

- presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. p. 72.
22. Caicedo, W. 2015. Valoración nutritiva del ensilado de tubérculos de papa china (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) y su uso en la alimentación de cerdos en crecimiento ceba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad de Granma, Bayamo, Cuba. p. 43.
  23. Caicedo, W., Valle, S. 2017. Ensilaje líquido de subproductos agrícolas para la alimentación animal. Editorial Académica Española. Deutschland, Alemania. p. 45.
  24. Calderón, J. 2005. Procesos biotecnológicos en residuales avícolas y sus efectos sobre el valor nutritivo y el comportamiento animal. Tesis en Opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias, ICA, La Habana, Cuba. p. 58.
  25. Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., Fitzgerald, J. R., de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. BMC veterinary research, 18(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>.
  26. Chávez, L. 2015. Los probióticos en la nutrición porcina. Disponible: <[http://agrovetmarket.com/resources/investigacion\\_y\\_desarrollo/articulos\\_tecnicos/uso-de-probioticos-en-nutricion-porcina-2111d07e2.pdf](http://agrovetmarket.com/resources/investigacion_y_desarrollo/articulos_tecnicos/uso-de-probioticos-en-nutricion-porcina-2111d07e2.pdf)> [Consultado: 25 de octubre de 2016].
  27. Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., Yuan, Z. 2014. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. Antimicrobials, Resistance, and Chemotherapy, Frontiers in Microbiology, Vol. 5, No. 217.
  28. Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L.M.T. 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. Current Opinion in Biotechnology, Vol. 49, 23 - 28.
  29. De Jesús, De B.C.A. 2016. Producción y recuperación de sustancias bioconservantes a partir de cultivos iniciadores de productos cárnicos curados. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València. Valencia, España.
  30. De Mann, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Bacteriol. 23: 130-135.
  31. Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., Robledo, Y. C. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

32. Djadouni, F. and Kihal, M. 2012. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 55, No. 3, 435 - 443.
33. Dong, H., Liu, B., Li, A., Iqbal, M., Mehmood, K., Jamil, T., Chang, Y. F., Zhang, H., Wu, Q. 2021. Microbiome Analysis Reveals the Attenuation Effect of *Lactobacillus* From Yaks on Diarrhea via Modulation of Gut Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 610781. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.610781>.
34. Dowarah, R., Kumar, A., Agarwal, N., Singh, P., Raj, B. 2018. Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLoS One* 13 (3): 26.
35. Duncan, D. B. 1955. Multiple ranges and multiple F test. *Biometrics* 11:1.
36. EcuRed. 2022. *Pseudomonas aureaginosa*. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Pseudomonas\\_aureaginosa#:~:text=La%20Pseudomonas%20aureaginosa%20produce%20trastornos%20en,se%20presenta%20en%20todas%20las%20edades.&te](https://www.ecured.cu/Pseudomonas_aureaginosa#:~:text=La%20Pseudomonas%20aureaginosa%20produce%20trastornos%20en,se%20presenta%20en%20todas%20las%20edades.&te). Fecha de consulta: 2 de diciembre de 2022.
37. Egan, K., Field, D., Rea, M.C., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. 2016. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7, 461.
38. Elías, A., Herrera, F. 2008. Producción de alimentos para animales a través de procesos biotecnológicos sencillos con el empleo de microorganismos beneficiosos activados (MEBA). *VITAFERT*. p. 8-13.
39. Erginkaya, Z., Ünal, E. and Kalkan, S. 2014. Microbial metabolites as biological control agents in food safety. In: Malik, A., Erginkaya, Z., Ahmad, S. and Erten, H. (Eds.), *Food processing: strategies for quality assessment*, 225 - 259. Food engineering series. Springer Science+Business Media New York.
40. EURFA. 2018. European Union Register of Feed Additives Reg (EC) No 1831/2003. Edition 4/2018 (264). Appendixes 3e, 4 03.08.20 18. European Union legislation on feed additives. Disponible: <<https://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed/feed-additives>>. [Consultado: 20 de febrero de 2019].
41. European Parliament and Council. 2003. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22nd September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Offic. J. Eur. Union*. L268/36.
42. 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00782>.

43. Evivie, S. E., Abdelazez, A., Li, B., Lu, S., Liu, F., & Huo, G. 2020a. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KLDS 1.0207 Exerts Antimicrobial and Cytotoxic Effects *in vitro* and Improves Blood Biochemical Parameters *in vivo* Against Notable Foodborne Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 11, 583070. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.583070>.
44. Evivie, S. E., Ogwu, M. C., Abdelazez, A., Bian, X., Liu, F., Li, B., & Huo, G. (2020b). Suppressive effects of *Streptococcus thermophilus* KLDS 3.1003 on some foodborne pathogens revealed through *in vitro*, *in vivo* and genomic insights. *Food & function*, 11(7), 6573–6587. <https://doi.org/10.1039/d0fo01218a>.
45. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) & WHO (World Health Organization). 2016. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canada. Disponible: <[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)> [Consultado: 12 de octubre de 2016].
46. Flores-Manchano, L.G., García-Hernández, Y., Proaño-Ortiz FB, Caicedo-Quinche, W.O. 2015. Evaluación de tres dosis de un preparado microbiano, obtenido en Ecuador, en la respuesta productiva y sanitaria de cerdos en posdestete. *Rev.Cien. Agri.* 12 (2): 59-70.
47. Gonçalves, J. L., Tomazi, T., Barreiro, J. R., Beuron, D. C., Arcari, M. A., Lee, S. H., Martins, C. M., Araújo Junior, J. P., dos Santos, M. V. 2016. Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. *Veterinary journal* (London, England: 1997), 209, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.009>.
48. González, D. 2009. Empleo de un producto biológicamente activo (VITAFERT) en las reproductoras y crías porcinas. Tesis presentada en opción al Título de Máster en Producción Animal para la Zona Tropical. ICA. La Habana. p. 53.
49. Gutiérrez, D. 2012. Efecto del aditivo biológico VITAFERT en dietas de forrajes de baja calidad para la alimentación de cabras lecheras. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. ICA. La Habana. Cuba. p. 76.
50. Hassan, M. U., Nayab, H., Rehman, T. U., Williamson, M. P., Haq, K. U., Shafi, N., Shafique, F., De Guía Córdoba, M. 2020. Characterisation of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus* spp. Isolated from the Traditional Pakistani Yoghurt and Their Antimicrobial Activity against Common Foodborne Pathogens. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8281623>.



51. Hernández-Barrera JC., Angarita-Merchán M., Prada-Quiroga CF. 2017. Impacto del uso de antimicrobianos en medicina veterinaria. *Rev. Cien. Agri.* 14(2): 27-38.
52. Humphreys, G. J., & McBain, A. J. 2019. Antagonistic effects of *Streptococcus* and *Lactobacillus* probiotics in pharyngeal biofilms. *Letters in applied microbiology*, 68(4), 303–312. <https://doi.org/10.1111/lam.13133>.
53. INSST (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo). 2022. *Streptococcus* spp. Disponible en: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/streptococcus-spp>. Fecha de consulta: 2 de diciembre de 2022.
54. Karpiński, T.M., Szkaradkiewicz, A.K. 2016. Bacteriocins. In: Caballero, B., Finglas, P.M. and Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*, Vol. 1, 312 - 319. Academic Press, Elsevier.
55. Khalil, S., Jawdat, S., Ali, H.H. 2017. Antimicrobial Effect of *Lactobacillus* as a Probiotic Isolated from Yoghurt Products Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia.coli*. *Journal For Pure and Applied Science* 5:135-142. <https://doi.org/10.30526/2017.IHSCICONF.1781>.
56. Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi, AKM. 2018. Shigellosis. *The Lancet.*, 391(10122), 801–812. Disponible en ingles: <https://bit.ly/3x8zew>.
57. Kunkel, D. 2021. *Lactobacillus bulgaricus* yogurt bacterium. Fineartamerica. Disponible en: <https://fineartamerica.com/featured/3-lactobacillus-bulgaricus-yogurt-bacterium-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>. Fecha de consulta: 24 de noviembre de 2022.
58. Le, T. M. 2015. The effects of probiotic supplementation on growth performance of weaning pigs in the Mekong Delta of Viet Nam, *Can Tho University Journal of Science* 1: 33-38.
59. León, M.F. 2012. Evaluación in vitro de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico. Tesis de grado (Licenciatura en Bioquímica). Montevideo-Argentina: Universidad de la República. Facultad de Ciencias. p. 25.
60. Li, J., Wen, Q., Gu, F., An, L., Yu, T. 2022. Non-antibiotic strategies for prevention and treatment of internalized *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 13, 974984. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.974984>.
61. Manu, D.K. 2012. Antimicrobial effectiveness of phenyllactic acid against foodborne pathogenic bacteria and *Penicillium* and *Aspergillus* molds. Graduate Theses and Dissertations. Iowa State University. Iowa, United States.
62. Martin, H., Maris, P. 2012a. Synergism between hydrogen peroxide and seventeen acids against six bacterial strains. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 113, No. 3, 578 - 590.

63. Masumuzzaman, M., Evivie, S. E., Ogwu, M. C., Li, B., Du, J., Li, W., Huo, G., Liu, F., Wang, S. 2021. Genomic and in vitro properties of the dairy *Streptococcus thermophilus* SMQ-301 strain against selected pathogens. *Food & function*, 12(15), 7017–7028. <https://doi.org/10.1039/d0fo02951c>.
64. Medline Plus. (15 de enero de 2019). Información de salud para la población peruana. Obtenido de Blog: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000344.htm>.
65. Mokoena, M. P., Omatola, C. A., Olaniran, A. O. 2021. Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(22), 7055. <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>.
66. Mousavi, A., Seidavi, S., Dadashbeiki, M., Kilonzo-Nthenge, A., Nahashon, S.N., Laudadio, V. Tufarelli, V. 2015. Effect of a synbiotic (Biomin® IMBO) on growth performance traits of broiler chickens. *Eur. Poult. Sci.* 79: 1-15.
67. Mutaguchi, Y., Kobayashi, J., Oikawa, T., Ohshima, T. 2016. D-Amino acids in fermentative foods. In: Yoshimura, T., Nishikawa, T. and Homma, H. (Eds.), *D-Amino acids. Physiology, metabolism, and application*. Springer Japan.
68. Naz, S., Cretenet, M. and Vernoux, J.P. 2013. Current knowledge on antimicrobial metabolites produced from aromatic amino acid metabolism in fermented products. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Vol. 1, 337 - 346.
69. NC -ISO 4832: 2010. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la enumeración de coliformes. Método de referencia.
70. NC -ISO 4833-1: 2014. Microbiología de la cadena alimentaria- Método horizontal para la enumeración de microorganismos- Parte 1: Conteo de colonias a 30°C por la Técnica de placa vertida.
71. NC ISO 6579: 2008. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.
72. NC ISO 6887-1. 2002. Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal. Preparación de la muestra de ensayo, la suspensión inicial y las diluciones seriadas decimales. Parte 1.
73. NRC. 2012. *Nutrients Requirements of Pigs*, 10th Edition, National Research Council. National Academy Press, Washington. DC. p. 96.
74. Panda, S. H., Goli, J. K., Das, S., Mohanty, N. 2017. Production, optimization and probiotic characterization of potential lactic acid bacteria producing siderophores. *AIMS microbiology*, 3(1): 88–107. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.88>.

75. Papagianni, M. 2012. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4): e201210003.
76. Pérez, M., Milián, G., Boucourt, R. & Alemán, R. 2016. Evaluación in vitro de prebióticos en hidrolizados de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) preparados por diferentes métodos. *Revista La Técnica*. p. 12-16.
77. Pérez, R.H., Perez, M.T., & Elegado, F.B. 2015. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Fermentative Production, Uses, and Prospects. DOI:10.18191/2015-08-2-027.
78. Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., Penna, A.L.B. 2012. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, Vol. 4, No. 2, 124 -140.
79. RENAPRA. 2022. Shigelosis. Enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Shigelosis.pdf>. Fecha de consulta: 2 de diciembre de 2022.
80. Revollo, L. 2013. Alternativas para el control de la Salmonelosis en las aves. XXIII Congreso Latinoamericano de Avicultura. Alimentación, Tecnología y Sostenibilidad. El Salvador. p. 49.
81. Roces, C., Rodríguez, A., Martínez, B. 2012. Cell wall active bacteriocins and their applications beyond antibiotic activity. *Probiotic and Antimicrobial Proteins*, Vol. 4, 4, 259 -272. Springer Science+Business Media, New York, United States.
82. Rodríguez, C. 2022. Impacto de los ácidos orgánicos y MOS en la inmunidad en cría de reproductoras. Avicultura. Ergomix. Disponible en: <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/impacto-acidos-organicos-mos-t51017.htm>. Fecha de consulta: 2 de diciembre de 2022.
83. Roján, L.E. 2009. Empleo de un producto biológicamente activo VITAFERT en precebas porcinas. M.Sc. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. p. 53.
84. Ruiz Gil, A. K; Pena Rodríguez, J. y Ramón Díaz, D. 2016. Mastitis bovina en Cuba. Artículo de revisión. *Rev. prod. anim.* [online]. 2016, vol.28, n.2-3 [citado 2022-12-05], pp.39-50. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-79202016000200006&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202016000200006&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 2224-7920.
85. Ryu, J. H., Kim, S., Park, J., & Choi, K. S. (2020). Characterization of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from pre-weaned calves in the Republic of Korea. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00543-1> [ Links ].
86. Sánchez Miranda, L. y Pena Rodríguez, J. 2016. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis

- bovina. Rev Salud Anim. [online]. 2016, vol.38, n.2 [citado 2022-12-01], pp.85-92. Disponible en: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2016000200003&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2016000200003&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0253-570X.
87. Şanlıbaba, P., Güçer, Y. 2015. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. Agriculture & Food, Journal of International Scientific Publications, Vol. 3, 451 - 457.
  88. Sapountzis, P., Segura, A., Desvaux, M., Forano, E. 2020. An overview of the elusive passenger in the gastrointestinal tract of cattle: The Shiga toxin producing *Escherichia coli*. Microorganisms, 8(6), 877. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060877> [ Links ].
  89. Schillinger, U., Lücke, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and environmental microbiology, 55(8), 1901–1906. <https://doi.org/10.1128/aem.55.8.1901-1906.1989>.
  90. Shokouhfard, M., Kermanshahi, R. K., Feizabadi, M. M., Teimourian, S., & Safari, F. 2022. *Lactobacillus* spp. derived biosurfactants effect on expression of genes involved in *Proteus mirabilis* biofilm formation. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 100, 105264. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105264>.
  91. Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., Ribeiro, S. C. 2018. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. Frontiers in microbiology, 9, 594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>.
  92. Silvestre, Lisamary. 2021. Efecto del aditivo zootécnico VITAFERT en la respuesta productiva y la salud de conejos (*Oryctolagus cuniculus*). Trabajo de diploma para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. P-75.
  93. Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K. and Matošić, S. 2010. Antimicrobial activity – the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technology and Biotechnology, Vol. 48, No. 3, 296 - 307.
  94. Szczerbiec, D., Piechocka, J., Głowacki, R., Torzewska, A. 2022. Organic Acids Secreted by *Lactobacillus* spp. Isolated from Urine and Their Antimicrobial Activity against Uropathogenic *Proteus mirabilis*. Molecules (Basel, Switzerland), 27(17), 5557. <https://doi.org/10.3390/molecules27175557>.
  95. Vásquez, M.S.M., Suárez, M.H. y Zapata, B.S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición, Vol. 36, No. 1, 64 - 71.

96. Vega, C., Pichiuha, B., Peña, C. Zavaleta, A. 2013. Efecto simbiótico del extracto de *Smilax sonchifolius* (yacón) y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*. Ciencia e Investigación 16 (2): 77-82.
97. Vélez, J., Gutiérrez, L., Montoya, O. 2015. Evaluación de la actividad bactericida de bacterias ácido lácticas aisladas en calostro de cerdas frente a *Salmonella typhimurium*. Revista Facultad Nacional de Agronomía 68 (1): 7481-7486.
98. Vitaluña, O.V.M. 2014. Evaluación de diferentes niveles de VITAFERT en crecimiento – engorde de cerdos. Trabajo de Titulación para Ing. Zootecnista. Riobamba, Ecuador. p. 48.
99. Wu, C., Dai, C., Tong, L., Lv, H., Zhou, X. 2022. Evaluation of the Probiotic Potential of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. indicus WDS-7 Isolated from Chinese Traditional Fermented Buffalo Milk In Vitro. Polish journal of microbiology, 71(1), 91–105. <https://doi.org/10.33073/pjm-2022-012>.
100. Yu, H.-S., Lee, N.-K., Jeon, H.-L., Eom, S.J., Yoo, M.-Y., Lim, S.-D. and Paik, H.-D. 2016. Benzoic acid production with respect to starter culture and incubation temperature during yogurt fermentation using response surface methodology. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, Vol. 36, No. 3, 427 - 434.
101. Zhang, X., Ali Esmail, G., Fahad Alzeer, A., Valan Arasu, M., Vijayaraghavan, P., Choon Choi, K., Abdullah Al-Dhabi, N. 2020. Probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens. Saudi journal of biological sciences, 27(12), 3505–3513. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.022>.

*Anexos*



## ANEXOS

**Anexo 1.** Elaboración del aditivo zootécnico VITAFERT a escala de laboratorio.



**Anexo 2.** Análisis químico de las muestras. Determinación de la materia seca. Del VITAFERT.



**Anexo 3.** Evaluación de la cinética del pH por 96 h del VITAFERT.



**Anexo 4.** Halos de inhibición producidos por el aditivo zotécnico VITAFERT en presencia de *Staphylococcus aureus*.

