

Obtención de un candidato a probiótico de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC a partir de un medio de cultivo natural con materias primas agroindustriales



Obtaining a probiotic candidate of *Lactobacillus plantarum* 22 LMC from a natural culture medium with agro-based raw materials

<http://revistas.censa.edu.co/index.php/RSA/article/view/1176>

¹Ronald Vera Mejía¹, ²Lilian Sánchez Miranda^{2*}, ¹Patricia Zambrano Gavilares¹, ¹Yanet Rodríguez Perdomo²

¹Universidad Técnica de Manabí (UTM), Avenida Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Manabí, Ecuador

²Grupo de Investigación Farmacéutica, Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, 32700, Mayabeque, Cuba

RESUMEN: El presente trabajo tuvo como objetivo obtener un candidato a probiótico de *L. plantarum* 22 LMC a nivel de laboratorio en un medio de cultivo con residuos agroindustriales. Se empleó un medio natural a partir de melaza (20 %), suero de leche (33,0 %) y levadura hidrolizada (10,36 %) (MLS) para el crecimiento de *L. plantarum*; como control se empleó el medio de referencia Man Rogosa Sharpe (MRS). Se evaluaron la cinética de crecimiento, la determinación del pH y la producción de ácido láctico. En ambos medios se obtuvieron valores de crecimiento superiores a 12 Log UFC mL⁻¹ a las 48 h; se observó una disminución del pH de 3,11 ± 0,01 en el medio MLS, 4,01 ± 0,05 en MRS y de ácido láctico 3,28 ± 0,12 g.L⁻¹ y 2,69 ± 0,12 g.L⁻¹, respectivamente. Luego se obtuvo el biopreparado a nivel de laboratorio y se establecieron, como controles de proceso, la pureza del cultivo y la viabilidad de la cepa en dicho medio. Se evaluó la estabilidad en anaquel a la temperatura de 5 ± 3°C, a dos concentraciones del probiótico (1x10⁹ y 1x10¹⁰ UFC/mL) durante 60 días, y se observó la estabilidad en la viabilidad bacteriana y en el pH, por lo que el medio resultó idóneo para este fin.

Palabras clave: probiótico, *Lactobacillus* spp., medio de cultivo natural, crecimiento, estabilidad.

ABSTRACT: The present work was aimed at obtaining a probiotic candidate of *L. plantarum* 22 LMC at laboratory level in a culture medium with agroindustrial residues. A natural medium based on molasses (20 %), milk serum (33.0 %) and hydrolyzed yeast (10.36 %) (MLS) was used for the growth of *L. plantarum*. Man Rogosa Sharpe (MRS) reference medium was used as a control. Growth kinetics, pH determination and lactic acid production were evaluated. Growth values higher than 12 Log CFU mL⁻¹ were obtained in both media at 48 h. A decrease in pH of 3.11 ± 0.01 in MLS medium, 4.01 ± 0.05 in MRS and lactic acid 3.28 ± 0.12 g.L⁻¹ and 2.69 ± 0.12 g.L⁻¹, was respectively observed. Biopreparation was then obtained at laboratory level. Culture purity and strain viability in such medium were established as process controls. Shelf stability was evaluated at a temperature of 5 ± 3°C, at two concentrations of the probiotic (1x10⁹ and 1x10¹⁰ CFU/mL) for 60 days, observing stability in bacterial viability and pH, thus making the medium suitable for this purpose.

Key words: probiotic, *Lactobacillus* spp., natural culture medium, growth, stability.

INTRODUCCIÓN

En investigaciones descritas por diferentes autores, se muestra que el medio Man Rogosa y Sharpe (MRS) es un medio de cultivo adecuado para la recuperación de *Lactobacillus* spp. en condiciones de laboratorio; sin embargo, su costo se eleva cuando se produce a una escala mayor para obtener grandes cantidades y producir un probiótico comercial (1, 2, 3).

Para la formulación de un medio de cultivo de tipo industrial es necesario que este cumpla con todos los requerimientos nutricionales (nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales) para el buen crecimiento del microorganismo; se requiere que estén biodisponibles en una materia prima obtenida como subproducto de

algún otro proceso, o sea, abundante en el mercado y de bajo costo de producción (4).

Investigaciones anteriores descritas por Vera *et al.* (5) y Sánchez *et al.* (6), demostraron las características probióticas *in vitro* y la seguridad biológica de una cepa de *L. plantarum* 22 LMC aislada de intestino de cerdo. Para demostrar su efecto *in vivo* se necesita su inclusión en la alimentación de los lechones, de ahí que se debe desarrollar un probiótico con materias primas nacionales de bajo costo y lograr altos rendimientos de células viables sin afectar su actividad biológica, por lo que el objetivo fue obtener un candidato a probiótico de *L. plantarum* 22 LMC a nivel de laboratorio en un medio de cultivo natural con residuos agroindustriales.

*Autor para correspondencia: Lilian Sánchez Miranda. E-mail: lilian@censa.edu.co

Recibido: 19/05/2021

Aceptado: 13/12/2021

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento de *L. plantarum* en un medio de cultivo natural

Cepa: *L. plantarum* (22 LMC), aislada de la mucosa del ciego de cerdos de 30 días de edad, clínicamente sanos e identificada mediante técnicas moleculares por el laboratorio de Biotecnología Aplicada Concepto Azul (7). Conservada en el cepario del Laboratorio de Biología molecular de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador (ESPAM) y seleccionada por sus mejores características probióticas *in vitro*: resistencia a pH ácido y a sales biliares, buenas propiedades hidrofóbicas, autoagregantes y actividad antimicrobiana frente a patógenos.

Medios de cultivos empleados

Se diseñó un medio natural, según los requerimientos nutricionales de *L. plantarum* y lo descrito por varios autores (8, 1). Se conformó con melaza de caña 20 %, suero de leche 33,0 % y autolizado de levadura 10,36 %, a pH 6,5 (MLS).

Se utilizó como control el Medio Mann Rugosa Sharpe (MRS, Difco™ EUA).

Condiciones de crecimiento en cada medio evaluado

Preparación del inóculo: *L. plantarum* (22 LMC) se multiplicó en caldo MRS a pH 6,7 a 37°C durante 24 a 48 h y, posteriormente, en agar del mismo medio. Para ello se empleó una incubadora (ESCO CelCulture®, EUA) con una atmósfera de CO₂ de 5 % a 37°C durante 48 a 72°C, para establecer condiciones anaeróbicas.

Las colonias resultantes de la cepa *L. plantarum* 22 LMC se inocularon en dos frascos de 250 mL con 150 mL del medio MRS y se incubaron a 37°C por 20 a 24 h, correspondiente a la fase logarítmica de crecimiento con una concentración de 10⁸ UFC/mL para disponer del inóculo.

Volumen de inoculación: se inoculó el 10 % del volumen final para cada medio de cultivo, según lo referido por Vargas *et al.* (9).

Evaluación del crecimiento: se emplearon tres Erlenmeyer con tapas de rosca de 500 mL con 400 mL de líquido por medio de cultivo y se incubaron a 37°C durante 48 h en cultivos estáticos, para establecer las condiciones anaeróbicas en cultivos líquidos.

Se realizó una cinética de crecimiento hasta la entrada de la fase estacionaria crecimiento para evaluar los dos medios de cultivo durante 48 h y se tomaron muestras cada ocho horas para la cuantificación del número de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹). Las corridas se realizaron por duplicado.

Determinación del número de unidades formadoras de colonias de los cultivos

Para efectuar el conteo de colonias se tomó 10 mL de cada cultivo y se realizaron diluciones seriadas de las muestras en una relación de 1/10 (v/v) en agua peptonada (OXOID, EUA), desde 10⁻¹ hasta 10⁻¹². Las tres últimas diluciones se inocularon individualmente en placas Petri con agar MRS. Esta operación se replicó tres veces y las placas se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis en una incubadora (ESCO CelCulture®, EUA) de CO₂ al 5 % por 48 h. Posteriormente, se realizó el conteo de las colonias en un contador de colonias digital (BOEGO modelo CC-1, Alemania).

Determinación de la velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (td)

A partir del programa de Microsoft Excel y los datos obtenidos en la cinética de crecimiento, se confeccionaron las curvas de dispersión; mediante la aplicación del método de ajuste se obtuvieron los polinomios correspondientes y los valores de μ. El td se determinó a través de la siguiente fórmula: $td = \mu / \text{Log } 2$ (10).

Determinación de pH: se tomaron muestras de los cultivos cada 8 h y se midieron los valores de pH mediante un pHmetro digital (Sartorius, México).

Determinación de ácido láctico: se tomaron muestras de los cultivos a las 40 h de crecimiento correspondiente al final de la fase logarítmica de crecimiento y se determinó la producción de ácido láctico según lo descrito por Santos *et al.* (3).

Preparación del probiótico a nivel de laboratorio

Se prepararon cultivos de *L. plantarum* 22 LMC en Erlenmeyer de 5 L con 4 L de volumen de trabajo del medio MLS, para obtener dos concentraciones 1x 10⁹ y 1x 10¹⁰ UFC mL⁻¹. Las concentraciones de los microorganismos se comprobaron mediante conteo de UFC en placas de agar MRS.

Se conformó un flujo de producción del candidato a probiótico a dos concentraciones representadas en la Figura 1.

Estudio de estabilidad en anaquel

La estabilidad en anaquel del probiótico se realizó a la temperatura de 5 ± 3°C durante 60 días. La selección de la temperatura se estableció según las recomendaciones establecidas por AGROCALIDAD (11) y el centro para el control estatal de medicamentos, equipos y dispositivos médicos (CEDMED) (12) de Cuba.

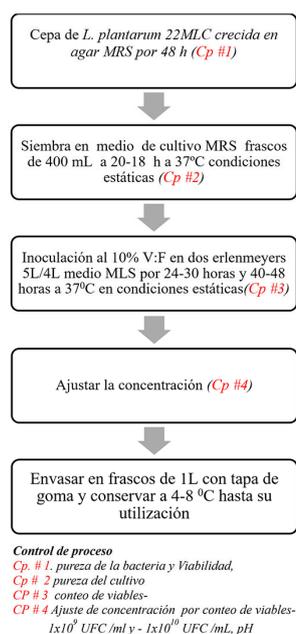


Figura 1. Diagrama de bloque para la producción del probiótico de *L. plantarum* 22 LMC a nivel de laboratorio. / Block diagram for the production of *L. plantarum* 22 LMC probiotic at laboratory level.

Para ello se produjeron dos lotes de 5 L del probiótico de *L. plantarum* 22 LMC para cada concentración (1×10^9 y 1×10^{10} UFC mL⁻¹), los cuales se distribuyeron en 24 frascos estériles con tapas de goma con 250 mL de volumen total. Se tomaron tres muestras para su análisis los días 1, 15, 35 y 60.

La estabilidad de este producto biológico se determinó por la viabilidad, la pureza microbiana y la determinación del pH hasta los 60 días.

Análisis estadístico

El paquete estadístico utilizado fue INFOSAT Versión 2,0 2017 (13). Se realizaron los análisis de varianza y la prueba de Duncan (14) para comparar los resultados en la capacidad de crecimiento microbiano entre los cultivos, la producción de ácido y el pH en cada tiempo de muestreo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de crecimiento de la cepa *L. plantarum* en dos medios de cultivo

En la Figura 2 se muestran las características del crecimiento de *L. plantarum* 22 LMC en dos medios de cultivo. En ambos medios se obtuvieron valores de crecimiento superiores a 12 Log UFC mL⁻¹ a las 48 h. Al comparar el crecimiento de la cepa en el medio MLS, no existieron diferencias con respecto al crecimiento en el medio de referencia MRS.

Se observa que la fase logarítmica o exponencial de crecimiento comienza a las 10 h. Esta se prolonga

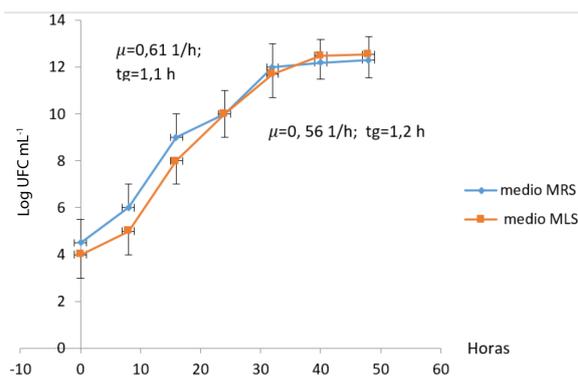


Figura 2. Cinética de crecimiento de la cepa de *L. plantarum* 22 LMC en dos medios de cultivo MRS y melaza, autolizado de levadura, suero de leche (MLS) durante 48 h de incubación. μ - velocidad específica de crecimiento; tg tiempo de duplicación. $n = 2$. Media \pm EE. / Growth kinetics of *L. plantarum* 22 LMC strain in two culture media MRS and molasses, autolyzed yeast, whey (MLS) during 48 h of incubation. μ - specific growth rate; tg doubling time. $n = 2$. Mean \pm SE.

hasta las 30 h; a partir de las 32 h se muestra una fase de desaceleración de crecimiento y a las 40 h entra el cultivo en la fase estacionaria de crecimiento. Al comparar los índices de crecimiento como la μ y el t_d en ambos medios, se comprobó que no existieron diferencias entre los valores hallados.

Estas características concuerdan con las descritas para las bacterias ácido lácticas (BAL), que son microorganismos que se reproducen por fisión binaria, con altas velocidades de crecimiento y tiempos de duplicación entre 30-90 min, en óptimas condiciones de cultivo (15); en este caso, el tg se obtiene a los 66 min.

Además, son aspectos muy importantes a tener en cuenta para la selección de los microorganismos probióticos, los que deben poseer elevada velocidad de crecimiento para competir por los nutrientes y los sitios de adhesión dentro del ecosistema gastrointestinal, adherirse y colonizar la mucosa para ejercer su efecto beneficioso en el hospedero y disminuir su expulsión durante el paso por el tracto gastrointestinal (16).

En la Figura 3 se observa una disminución del pH en el cultivo durante las 48 horas de crecimiento. Se encontraron valores de $3,11 \pm 0,01$ en el medio MLS y de $4,01 \pm 0,05$ en el medio MRS.

Se demuestra la alta capacidad de la cepa para acidificar el medio MLS, por lo que se infiere que se producen sustancias inhibitorias y, dentro de ellas, el ácido láctico. En este caso, a las 48 horas de crecimiento se encontraron valores de este ácido $3,28 \pm 0,12$ g.L⁻¹ en el medio MLS y $2,69 \pm 0,12$ g.L⁻¹ en MRS con diferencias significativa para $p \leq 0,05$.

Las BAL se caracterizan por la producción de ácido láctico a niveles elevados. Varios autores refieren que estas son los microorganismos que más se utilizan como probióticos, donde hay un predominio de la producción de ácido láctico (17,18).

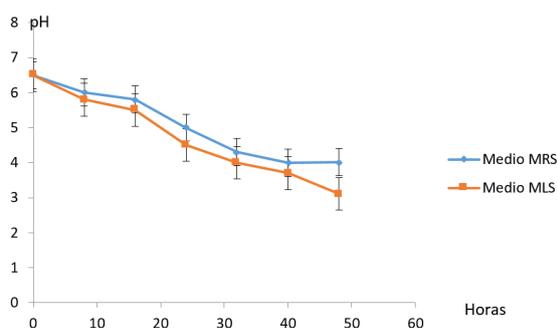


Figura 3. Cinética del pH en los dos medios de cultivo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). $n=2$ Media \pm EE. / PH kinetics in the two culture media. Different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$). $n = 2$ Mean \pm SE.

Obtención del probiótico a nivel de laboratorio

Después de crecida la cepa de *L. plantarum* 22 LMC en el medio MLS, se estableció la obtención del probiótico en mayores volúmenes a nivel de laboratorio.

Se precisaron los puntos de control de proceso que se debe realizar para producir a escala de laboratorio el probiótico y mantener la consistencia del mismo. Se elaboraron tres lotes para cada concentración y, a partir de estas producciones, se evaluó en cerdos en crecimiento. Se demostró su efecto de tipo probiótico en atención al comportamiento de la salud y bioproduktividad de los mismos (18).

Los resultados demuestran que la composición del medio MLS cubre los requerimientos nutricionales para la cepa *L. plantarum* 22 LMC, de forma similar al medio MRS, debido a sus componentes como la miel final o melaza, rica en azúcares fermentables, así como sales, minerales, vitaminas y factores de crecimiento (8); el suero de leche que aporta fuente de nitrógeno orgánico en forma de aminoácidos, dentro de los cuales se reportan cisteína, metionina, triptófano, isoleucina y valina, además de vitaminas como el complejo B y minerales como calcio, fósforo y magnesio (19), el autolizado de levaduras proporciona aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y oligosacáridos.

En este sentido, Jurado *et al.* (1) emplearon medios de cultivo naturales compuestos por azúcar, leche de soya comercial y suero de leche para caracterizar el crecimiento de *L. plantarum* y obtuvieron 12 Log UFC mL⁻¹ de células viables con pH 3,7, con fines probióticos en lechones como una alternativa al tratamiento con antibiótico. Estos resultados son similares a los encontrados con el medio de MLS.

Flores *et al.* (20), para la obtención de preparados de lactobacilos y levaduras, utilizaron el suero de leche en la formulación del medio de cultivo y obtuvieron 6,7 Log UFC mL⁻¹ de células viables. Con la utilización del medio MLS, las concentraciones de células viables de *L. plantarum* 22 LMC fueron superiores a las que refirieron estos autores, posiblemente, por

la utilización de la melaza de caña y del autolizado de levadura que aportan carbohidratos fermentables, vitaminas y minerales, por lo que los resultados validan el uso del medio de cultivo MLS conformado con materia prima agroindustrial para la elaboración del probiótico a escala de laboratorio y, posteriormente, su aplicación por vía oral en lechones.

La prueba de estabilidad es la principal herramienta para evaluar la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento para productos biológicos. En este sentido, el probiótico con dos concentraciones de *L. plantarum* permanecieron estables durante el tiempo evaluado, ya que en la prueba de pureza microbiana realizada no se observaron contaminaciones con otros microorganismos. En el estudio de la de viabilidad (Figura 4) se observó una disminución del recuento de células viables a partir de los 35 días en las dos concentraciones analizadas.

Sin embargo, no hubo diferencias entre los tiempos evaluados. Las concentraciones requeridas de células viables durante los 60 días de almacenamiento se mantuvieron por encima de los niveles recomendados por la FAO (21), que es entre 10⁶ y 10⁷ UFC mL⁻¹ de microorganismos viables para un alimento probiótico.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Betancur *et al.* (22), quienes evaluaron algunos parámetros de estabilidad de un probiótico con cepas de *L. plantarum* con fines probióticos para cerdos. Estudios similares realizó Beruvides (23), con un aditivo VITAFER compuesto de BAL y levaduras para crías y cerdos en crecimiento. Estos autores comprobaron que a partir de los 30 días se afecta la viabilidad de las BAL, debido a que en estas condiciones se agotan los nutrientes esenciales para su desarrollo.

El pH obtenido en esta investigación se mantuvo dentro de los rangos establecidos para productos biológicos de esta categoría (Figura 5).

Según Benedetti y Palacios (24), los mecanismos de acción de los productos biológicos con valores de pH igual o inferior a 4, implican la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, la producción de ácido láctico, la disminución de la permeabilidad intestinal, el aumento de la actividad de la lactasa y la estimulación de la inmunidad, de manera que la disminución del pH en los productos obtenidos es indicador de la viabilidad de las bacterias lácticas; en este caso permanecen viables las bacterias de *L. plantarum*.

Es importante mencionar que se debe continuar la evaluación de la estabilidad en anaquel del probiótico en el tiempo a dos temperaturas (temperatura ambiente y 5 \pm 3 °C) debido a la importancia de la viabilidad del producto final.

Además, se recomienda el uso de este medio en la producción de otros probióticos, ya que presentan componentes de bajo costo que podrán sustituir el uso del medio MRS comercial como medio de referencia para el crecimiento de lactobacilos.

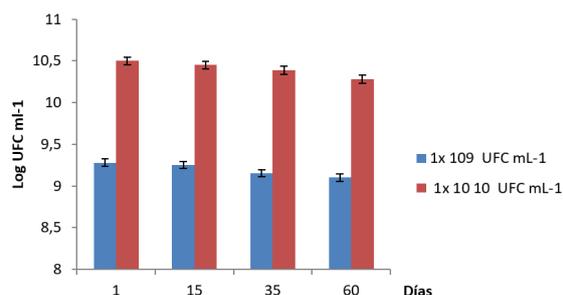


Figura 4. Viabilidad de los probióticos de *L. plantarum* durante 60 días de almacenamiento a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Media \pm EE. / Viability of *L. plantarum* probiotics during 60 days of storage at $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Mean \pm SE.

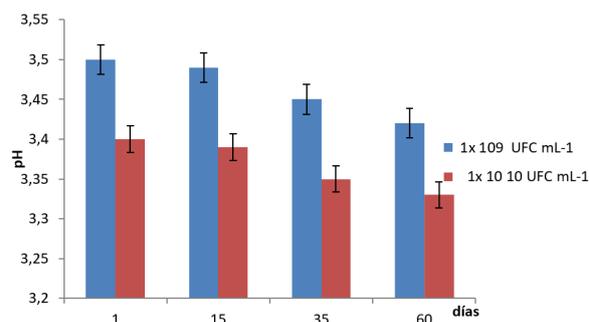


Figura 5. Comportamiento del pH en los probióticos de *L. plantarum* durante los 60 días de almacenamiento. Media \pm EE. / PH behavior of *L. plantarum* probiotics during 60 days of storage. Mean \pm EE.

CONCLUSIONES

Se demostró que el medio de cultivo natural compuesto por materias primas agroindustriales (MLS) constituye un medio adecuado para el crecimiento de *L. plantarum* 22 LMC, ya que presenta una velocidad de crecimiento y concentraciones de células viables similares a las que se obtienen cuando se utiliza el medio MRS o medio de referencia. El probiótico de *L. plantarum* 22 LMC, a dos concentraciones de células viables, presentó estabilidad en anaquel en la viabilidad microbiana y el pH a temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 60 días de almacenamiento.

REFERENCIAS

- Jurado GHA, Romo SI, Benavides DVC. Evaluación del efecto probiótico de *Lactobacillus plantarum* en la alimentación de lechones en fase de precebo como una alternativa del uso de antibióticos. Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Universidad de Nariño, Pasto. Revista Investigación Pecuaria Colombia. 2013;2(1):55-62.
- Sánchez L, Tromps J. Caracterización *in vitro* de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. Rev Salud Anim. 2014;(2):124-129.
- Santos CMA, Pires MCV, Sánchez L, Martins F, Nicolí J. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. Microbiology. 2016;162:1195-1207.
- Mbarga MJA, Zangué SCD, Tatsadjieu LN, Zargar M, Albert E, Bayat M. Producing probiotic beverage based on raffia sap fermented by *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium bifidum*. Res. Crops. 2019;20(3):629-634.
- Vera R Ormaza J, Muñoz J, Arteaga MF, Sánchez L. Cepas de *Lactobacillus plantarum* con potencialidades probióticas aisladas de cerdos criollos. Rev Salud Anim. 2018;40(2):1-12.
- Sánchez L Vera R, Agüero F, Vega E. Seguridad biológica de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC con potencialidad probiótica. Rev Salud Anim. 2020;42(2):1-9.
- Concepto Azul SA. Informe de análisis taxonomía molecular de cepas bacteriana y de hongos de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Guayaquil Ecuador. 2013:9.
- Ossa JA, Vanegas MC, Badillo ÁM. Evaluation of cane molasses as substrate for *Lactobacillus plantarum* growth. Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica. 2010;13(1):97-104.
- Vargas EM, Gómez CJ, Parra ME, Romero MA. Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (primera parte). Revista de Ingeniería2004; (19):167-178.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 8th Edition, Prentice Hall International, Inc., New York. 1997:153-154.
- Agrocalidad. Resolución, N. D. A. J. 2013 ec-0201.0099. Instructivo de la Normativa General para Promover y Regular la Producción Orgánica-Ecológica-Biológica en el Ecuador. Ecuador. 2013:64.
- CECMED Regulaciones 23-2000: Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos CECMED. Cuba, 2000:27.
- Di Rienzo JA, Macchiavelli R, Casanoves F. Modelos lineales generalizados mixtos aplicaciones en InfoStat. 2017.
- Duncan DB. Multiple Range and Multiple F Tests. Biometrics.1955;11(1):1-42. doi:10.2307/3001478.
- Sosa D, Garcia Y, Dustet JC. Desarrollo de probióticos destinados a la producción animal: experiencias en Cuba. Cuban J. Agric. Sci 2018;52(4):357-373.
- Rojas C, Ochoa G, Alfaro R, Querevalú J, Sánchez H. Producción y evaluación de inóculos lácteos probióticos obtenidos del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domesticus*) propuestos para alimentación porcina. Rev. mex. de cienc. pecuarias. 2021;12(1):120-137. Disponible en: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i1.5445>.

17. Saavedra S, Alejandro-Paredes L, Flores-Santos JC, Flores-Fernández CN, Arellano-García H, Zavaleta AI. Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* strain Huil in a medium containing sugar cane molasses. *Agronomía Colombiana*. 2021;39(1):98-107. Disponible en <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v39n1.89674>
18. Vera Mejía RR, Vega Cañizarres E, Bulnes C, Agüero Díaz F, Zambrano Aguayo MD, Sánchez Miranda L. Actividad probiótica de *Lactobacillus plantarum* en los indicadores bioproductivos y de salud en lechones. *Livestock Research for Rural Development*. 2019;31(11):31-37.
19. Yoo H, Rheem I, Rheem S, Oh S. Optimizing Medium Components for the Maximum Growth of *Lactobacillus plantarum* JNU 2116 Using Response Surface Methodology. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2018;38(2):240-250. doi:10.5851/kosfa.2018.38.2.240
20. Flores LG, García Y, Usca JE, Caicedo WO. Estudio comparativo de tres aditivos zootécnicos en el comportamiento productivo y sanitario de cerdos en el período post-destete. *Ciencia y Agricultura*. 2016;13(2):95-105.
21. Bajagai YS, Klieve AV, Dart PJ, Bryden WL. Probiotics in animal nutrition: production, impacts and regulation. En Harinder P.S. Makkar (Eds). *FAO. Probiotics in animal nutrition Paper No. 179*. 2017. Roma. ISBN: 978-92-5-109333-7.
22. Betancur CA, Rondón AJ, Martínez Y, Rodríguez R. Formulación y caracterización de un biopreparado con *Lactobacillus plantarum* CAM-6, procedente del tracto digestivo de cerdos criollos. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 2020;54(3):1-10.
23. Beruvides A. Efecto del aditivo zootécnico VITAFERT en la respuesta biológica en crías y precebas porcinas. [Tesis presentada en opción al grado científico en Doctor en Ciencias Veterinarias]. Instituto de Ciencias Animal. Mayabeque, Cuba. 2019:pp.100.
24. Benedetti DC, Palacios JA. Los probióticos y su uso en el tratamiento de enfermedades. *Revista Ciencias Biomédicas*. 2020;9(1):54-66.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores: **Ronald Vera Mejía:** conformó el diseño del trabajo y la escritura del artículo. **Lilian Sánchez Miranda:** realizó las evaluaciones microbiológicas y participó en la escritura del artículo. **Patricia Zambrano Gavilares:** realizó los análisis bioestadísticos de los resultados. **Yanet Rodríguez Perdomo:** realizó los estudios bioquímicos y la revisión del artículo. Todos los autores revisaron y aceptaron la versión final del manuscrito.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)