



ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN DEL ADITIVO PROBIÓTICO CON *LACTOBACILLUS PENTOSUS* LB-31 DESTINADO A LA PRODUCCIÓN ANIMAL

STABILITY AND PRESERVATION OF THE PROBIOTIC ADDITIVE WITH *LACTOBACILLUS PENTOSUS* LB-31 FOR ANIMAL PRODUCTION

DAILYN SOSA COSSIO¹, YANEISY GARCÍA HERNÁNDEZ^{1*},
 JULIO C. DUSTET MENDOZA², AREADNE SOSA CEIJAS¹, YANELYS GARCÍA CURBELO¹,
 YOLEISY GARCÍA HERNÁNDEZ¹, NEREYDA ALBELO DORTA¹

¹Instituto de Ciencia Animal (ICA), C. Central, km 47½, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

²Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría (CUJAE), Facultad de Ingeniería Química, Ave. 114 No. 11901 entre Ciclovía y Rotonda, Marianao, La Habana, Cuba

*Email: yaneisyg@gmail.com

Se determinó el tiempo de estabilidad y condiciones de almacenamiento del aditivo probiótico con *Lactobacillus pentosus* LB-31 destinado a la producción animal. Se utilizaron diseños completamente aleatorizados con seis repeticiones para monitorear la viabilidad microbiana durante un mes (0, 7, 14, 21 y 30 días) al conservar el aditivo en condiciones ambientales (24 ±2 °C) y durante seis meses (0, 30, 60, 90, 120 y 180 días) cuando se almacenó en refrigeración (4±2 °C). Se determinó, además, la concentración celular, el pH y la pureza del cultivo. Los resultados mostraron que la bacteria ácido láctica mantuvo su viabilidad durante los primeros 14 días de conservación a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la concentración microbiana disminuyó de 7.64 a 7.02 log ufc/mL (p=0.0028) y se mantuvo en 91 % de viabilidad hasta los 30 días. En condiciones de refrigeración, LB-31 se comportó estable hasta los 60 días de conservación con una concentración de 3.74x10⁷ ufc/mL, y posteriormente disminuyó a 10⁶ ufc/mL (p<0.0001) con una viabilidad de 78 % al finalizar el estudio. En ambas condiciones, el pH disminuyó y se comprobó que las colonias mantenían sus características morfológicas y culturales. Se concluye que el aditivo probiótico con *Lactobacillus pentosus* LB-31 sin conservantes es estable durante 14 días a temperatura ambiente (24±2 °C), y por 60 días en condiciones refrigeradas (4±2 °C).

The stability time and storage conditions of the probiotic additive with *Lactobacillus pentosus* LB-31 for animal production were determined. Completely random designs with six repetitions were used to monitor microbial viability for a month (0, 7, 14, 21 and 30 days) when the additive was stored under ambient conditions (24 ±2 °C) and for six months (0, 30, 60, 90, 120 and 180 days) when stored under refrigeration (4±2 °C). Cell concentration, pH and purity of the culture were also determined. The results showed that the lactic acid bacteria maintained its viability during the first 14 days of storage at room temperature. After this time, the microbial concentration decreased from 7.64 to 7.02 log cfu/mL (p=0.0028) and remained at 91 % viability until 30 days. Under refrigeration conditions, LB-31 was stably up to 60 days of storage with a concentration of 3.74x10⁷ cfu/mL, and subsequently decreased to 10⁶ cfu/mL (p<0.0001) with a viability of 78 % at the end of the study. Under both conditions, the pH decreased and the colonies maintain their morphological and cultural characteristics. It is concluded that the probiotic additive with *Lactobacillus pentosus* LB-31 without preservatives is stable for 14 days at room temperature (24±2 °C), and for 60 days under refrigerated conditions (4±2 °C).

Palabras clave: alimentación animal, bacteria, preservación

Key words: animal feeding, bacteria, preservation

Recibido: 21 de diciembre de 2023

Aceptado: 20 de febrero de 2024

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos.

Declaración de contribución de autoría CRediT: Dailyn Sosa Cossio: **Conceptualización, Investigación, Metodología, Redacción-borrador original.** Yaneisy García Hernández: **Conceptualización, Investigación, Metodología, Redacción-revisión y edición.** J.C. Dustet Mendoza: **Conceptualización, Metodología, Redacción-revisión y edición.** Areadne Sosa Ceijas: **Conceptualización, Investigación, Metodología.** Yanelys García Curbelo: **Conceptualización, Metodología.** Yoleisy García Hernández: **Metodología, Análisis formal.** Nereyda Albelo Dorta: **Investigación, Curación de datos.**



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



Introducción

El uso de aditivos microbianos, como los probióticos, en la alimentación animal contribuye a la mejora de la salud y mayor aprovechamiento de los alimentos (Rondón et al. 2020 y Milián et al. 2022), lo que permite incrementar los rendimientos productivos y, en consecuencia, la disponibilidad y calidad de leche, carne y huevos destinados a la población (García et al. 2016). En los estudios con animales se utilizan microorganismos cultivados en el laboratorio o probióticos comerciales. Los aspectos de mayor importancia para su producción son la selección adecuada de la cepa o cepas, el medio de cultivo y las condiciones fermentativas que permitan obtener un alto nivel de viabilidad microbiana durante el proceso (FAO 2016 y Fenster et al. 2019). La estabilidad del aditivo probiótico durante la formulación y el almacenamiento es un requisito indispensable para una producción comercial exitosa (Ramlucken et al. 2021).

La selección de la cepa o cepas microbianas es el primer paso para la concepción de un producto probiótico. Estos deben ser microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés), capaces de sobrevivir en el tracto gastrointestinal y tolerar pH bajos y altas concentraciones de sales biliares (Vinderola et al. 2017). Otras características deseadas son la capacidad de adherencia de las cepas probióticas al epitelio intestinal para su posterior colonización (Endo y Gueimonde 2016), ser microorganismos estables genéticamente y poseer altas velocidades de crecimiento. Además, la cepa elegida debe mantener su viabilidad y actividad probiótica durante los procesos de fabricación, transporte y almacenamiento (Molina 2019 y Kieps y Dembczynski 2022).

En Cuba, el Instituto de Ciencia Animal (ICA) desarrolló durante varios años un grupo de investigaciones encaminadas a la obtención y evaluación de probióticos con efectos benéficos en la salud y comportamiento productivo de los animales. A partir de los principales resultados de estas investigaciones, se seleccionó un grupo de cepas como las de mayor interés para el desarrollo de aditivos microbianos y se depositaron en la Colección de Microorganismos, perteneciente al Banco de Microorganismos para la Producción Animal (BAMIPA) del ICA (Sosa et al. 2017). Una de estas cepas es *Lactobacillus pentosus* LB-31, de origen aviar, aislada de excretas fermentadas de pollos de ceba. La cepa LB-31 en ensayos *in vitro* mostró las mayores potencialidades probióticas. Su acción benéfica se confirmó en pollos de ceba (García et al. 2016), truchas arco iris (García y Pérez 2015), cerdos en crecimiento (Ayala et al. 2014) y corderos pelibuey (Gutiérrez et al. 2020). Además, LB-31 se utilizó como aditivo para mejorar el contenido proteico de ensilajes mixtos destinados a animales rumiantes (Rodríguez et al. 2020).

En estudios recientes, se definió el proceso de obtención del probiótico líquido con *L. pentosus* LB-31 para su futura producción a escala industrial (Sosa 2021). Para ello se seleccionó un medio de cultivo económico que permite sustituir el medio tradicional De Man-Rogosa-Sharpe (MRS, pH 6.2±0.2), diseñado por De Man et al. (1960), que es muy costoso para su utilización a escala industrial. También se evaluaron diferentes condiciones de operación en biorreactores de laboratorio y se escaló la fermentación a 30 L. Además, se comprobó que las nuevas condiciones de obtención del aditivo no afectaron la actividad de la cepa probiótica en pollos de ceba (Sosa et al. 2021). Sin embargo, es necesario realizar estudios de estabilidad y conservación del aditivo que permitan garantizar alta viabilidad de los microorganismos durante el proceso de almacenamiento y, consecuentemente, que puedan conservar su efecto probiótico en el tracto gastrointestinal del hospedero. Por estas razones, el objetivo de la presente investigación fue determinar el tiempo de estabilidad y las condiciones de almacenamiento del aditivo probiótico con *Lactobacillus pentosus* LB-31 destinado a la producción animal.

Materiales y Métodos

El experimento se realizó en el Laboratorio de Producción de Alimentos del Instituto de Ciencia Animal. Este centro se encuentra situado en el km 47 ½ de la Carretera Central, a 22° 53' de latitud norte, 82° 02' de longitud oeste y 92 m.s.n.m, en el municipio de San José de las Lajas, provincia de Mayabeque, Cuba.

Diseño y tratamientos experimentales: Se utilizaron diseños completamente aleatorizados con seis repeticiones para evaluar la estabilidad y conservación del aditivo probiótico en condiciones ambientales (24±2 °C) por un mes (0, 7, 14, 21 y 30 d) y de refrigeración (4±2 °C) durante seis meses (0, 30, 60, 90, 120 y 180 d). En cada horario se tomaron seis muestras para los análisis que posteriormente se eliminaron.

Microorganismo y preparación del aditivo probiótico: Se utilizó la cepa *Lactobacillus pentosus* LB-31, perteneciente al Banco de Microorganismos para la Producción Animal (BAMIPA) del Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba). LB-31 se identificó por secuenciación del gen 16S ARN ribosomal y su secuencia se encuentra depositada en el GenBank con número de acceso: FR717464 (García et al. 2016). El aditivo probiótico se obtuvo de tres lotes de fermentación en un biorreactor (BIONET, España) de 11 L con volumen efectivo de 8 L de un medio de cultivo diseñado con melaza de caña de azúcar, urea, acetato de sodio y citrato de amonio. Las condiciones de operación del equipo se establecieron según metodología propuesta por Sosa (2021).

Estabilidad y conservación del aditivo probiótico: Se utilizó un cultivo líquido a partir de la cepa de *Lactobacillus pentosus* LB-31 con concentración de 4.33×10^7 ufc/mL. El aditivo se envasó en frascos de cristal estériles de 100 mL con tapas plásticas y se colocaron a temperatura ambiente y en refrigeración. Se determinó la viabilidad celular, pureza y pH. Se tomaron muestras y se realizaron diluciones seriadas en solución salina (0.85 %, p/v) y siembras del cultivo en placas con agar Rogosa. Estas se incubaron de 24-48 h para determinar la concentración de células viables (ufc/mL) por conteo visual de colonias. Se realizaron tinciones de Gram para comprobar la pureza del cultivo y se midió el pH con pHmetro digital (Sartorius, Alemania) de precisión ± 0.01 unidades.

Análisis estadístico: Los datos experimentales se procesaron con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo et al. 2012). Todas las variables cumplieron los supuestos teóricos y siguieron una distribución log normal. En los casos necesarios, se utilizó la dócima de comparación múltiple de Duncan (1955) para discriminar diferencias entre medias a $p < 0.05$.

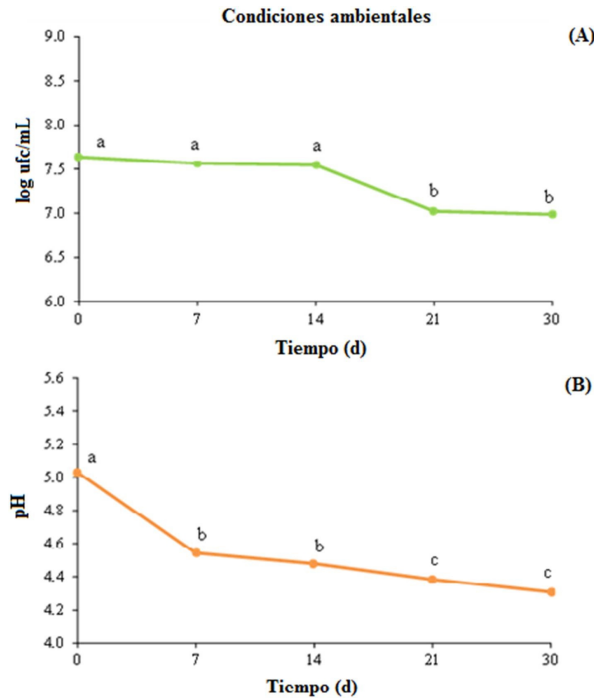
Resultados y Discusión

En la figura 1 se muestra el comportamiento de la concentración microbiana (A) y el pH (B) del aditivo probiótico con *Lactobacillus pentosus* LB-31 durante un

mes de conservación a temperatura ambiente. No hubo diferencias en la viabilidad de la bacteria ácido láctica para los primeros 14 d de conservación (figura 1A). Después de este tiempo, la concentración microbiana disminuyó de 4.33×10^7 a 1×10^7 ufc/mL (7.64 a 7.02 log ufc/mL) y se mantuvo en 91 % de viabilidad hasta los 30 d. En lo que respecta al pH (figura 1B), se observó disminución a los 7 d y a partir de este momento se mantuvo estable.

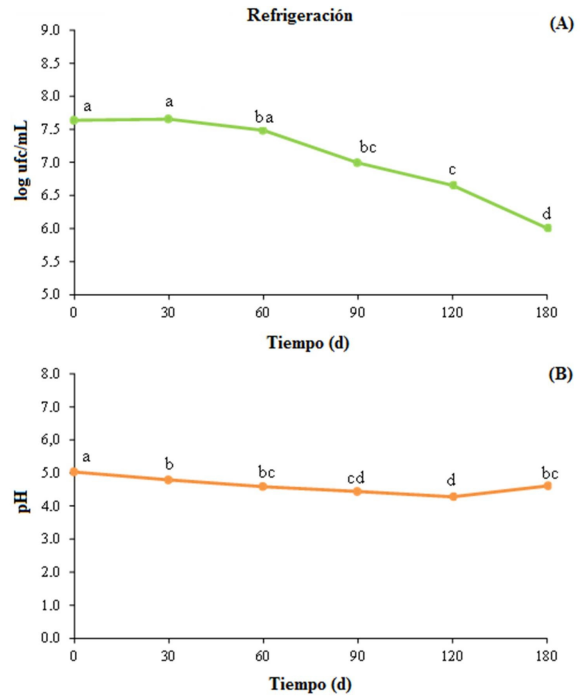
La figura 2 muestra la estabilidad del aditivo durante seis meses de conservación en refrigeración. No hubo diferencias en la concentración de la bacteria ácido láctica durante los primeros 60 d de conservación (figura 2A), ya que mantuvo valores de 4.33×10^7 ufc/mL (7.64 log ufc/mL) y posteriormente disminuyó a 10^6 ufc/mL (6.01 log ufc/mL) y alcanzó 78 % de viabilidad al finalizar el estudio. El pH disminuyó a los 30 d y se mantuvo estable hasta los 180 d (figura 2B).

La FAO/WHO (2002) sugirieron que los probióticos deben tener una concentración mínima de 10^6 - 10^7 células/mL o g de producto para garantizar su eficacia. El presente estudio demuestra que el aditivo con *Lactobacillus pentosus* LB-31 mantiene una concentración adecuada para que se utilice como probiótico y que, además, es estable hasta los 14 d a temperatura ambiente (4.33×10^7 ufc/mL) y 60 d en condiciones refrigeradas (3.74×10^7 ufc/mL).



^{a, b, c} Letras distintas por gráfico difieren a $p < 0.05$ (Duncan 1955)

Figura 1. Comportamiento de la estabilidad del aditivo probiótico con *L. pentosus* LB-31 durante 30 d a temperatura ambiente (24 ± 2 °C): (A) Concentración microbiana ($EE \pm 0.13$, $p = 0.0028$) y (B) pH ($EE \pm 0.03$, $p < 0.0001$)



^{a, b, c, d} Letras distintas por gráfico difieren a $p < 0.05$ (Duncan 1955)

Figura 2. Comportamiento de la estabilidad del aditivo probiótico con *L. pentosus* LB-31 durante 180 d a 4 ± 2 °C: (A) Concentración microbiana ($EE \pm 0.44$, $p < 0.0001$) y (B) pH ($EE \pm 0.08$, $p < 0.0001$)

En ambas condiciones de conservación, con las observaciones macroscópicas y microscópicas del cultivo, se comprobó que las colonias mantenían sus características morfológicas y de cultivo. Además, se descartó la presencia de contaminantes (figura 3).

Brizuela (2003) y Rondón (2009) evaluaron en frascos de cristal la estabilidad de aditivos probióticos con diferentes cepas de lactobacilos a temperatura ambiente y en condiciones de refrigeración durante 180 d. Ambas investigaciones informaron que los aditivos eran estables hasta los 30 d, y que a partir de este momento la viabilidad del microorganismo disminuía en condiciones ambientales como refrigeradas.

La literatura científica internacional informa varios estudios de estabilidad de microorganismos probióticos que utilizan diferentes tipos de sustratos y tiempos de estabilidad inferiores a los del presente estudio. Entre ellos se encuentran los de dos Santos et al. (2019), quienes estudiaron la estabilidad de *Lactobacillus casei*, cultivado en jugo de cocoa durante el mismo tiempo y en iguales condiciones, e informaron que la concentración microbiana disminuía de 10^8 a 10^7 ufc/mL. Fernández et al. (2019) evaluaron la estabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* DTA 79 y *Lactobacillus paracasei* DTA 83 en leche desnatada a los 20 y 40 d de almacenamiento en condiciones de refrigeración (7 °C). Los autores citados destacaron que, aunque una de las cepas disminuyó su viabilidad a los 40 d, ambas se mantuvieron en una concentración superior a 10^8 ufc/mL. Asimismo, Tavares et al. (2018) demostraron que una bebida probiótica basada en maíz fermentado con el probiótico comercial *Lactobacillus paracasei* LBC-81, de forma individual y en co-cultivo con varias cepas de levaduras, mantenían su viabilidad durante 28 d en condiciones de refrigeración (4 °C) y que la concentración se encontraba en el intervalo recomendado para su uso como probiótico.

Las bases de datos de patentes internacionales también protegen estudios de estabilidad de algunos productos probióticos líquidos. La patente ES2674353 T3 (2018), por ejemplo, aborda un método para preparar cultivos iniciadores líquidos con alta estabilidad y actividad fermentativa. Estos cultivos alcanzan concentraciones

superiores a 10^9 ufc/mL y son estables solo durante 6 d entre 3 y 5 °C.

Los resultados del presente estudio son alentadores y comparables con otros productos probióticos conservados en refrigeración, que tienen tiempos de estabilidad inferiores al aditivo con LB-31. Se debe destacar, además, que al aditivo probiótico no se le agregó ningún conservante que pudiera mejorar la supervivencia de LB-31. Sin embargo, a pesar de estas ventajas y que el sistema contenedor-cierre utilizado (frascos de cristal con tapa plástica) es el más empleado para los estudios a nivel de laboratorio (Rondón 2009, García et al. 2013 y Freire et al. 2017), es necesario evaluar otros tipos de envase que faciliten los procesos de transporte y almacenamiento cuando se produce industrialmente este tipo de producto. Otro aspecto a tener en cuenta es la temperatura de almacenamiento, ya que el valor ambiente promedio de Cuba es 30 ± 2 °C y el presente estudio se realizó a temperaturas más bajas, debido, fundamentalmente, a la época del año y a las condiciones climáticas donde tuvo lugar. También se debe considerar que varias investigaciones señalan que las condiciones de fermentación pueden afectar la viabilidad, estabilidad y funcionalidad de la cepa (Farnworth y Champagne 2016 y Aragón et al. 2018), por lo que en cada etapa del proceso de escalado se deben comprobar todos estos parámetros.

Conclusiones

El probiótico con *Lactobacillus pentosus* LB-31, sin conservantes, es estable en frascos de cristal durante 14 d, a temperatura ambiente, y por 60 d en condiciones refrigeradas.

Referencias

Aragón, S., Ruiz, R.Y., Hernández, H. & Quintanilla, M.X. 2018. Optimization of the production and stress resistance of the probiotic *Lactobacillus fermentum* K73 in a submerged bioreactor using a whey-based culture medium. *Journal of Food*, 16(1): 1064-1070, ISSN: 1947-6345. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1527785>.

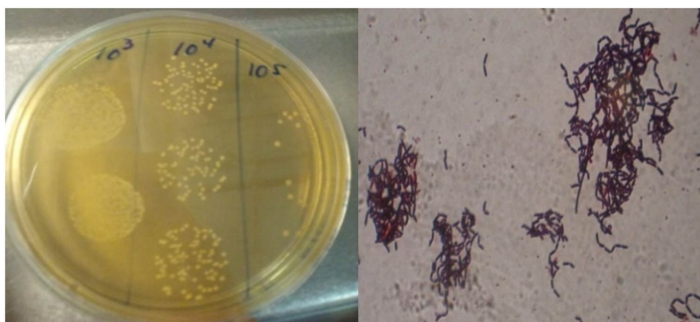


Figura 3. Observación macroscópica y microscópica de la pureza del cultivo probiótico con *L. pentosus* LB-31

- Ayala, L., García, Y., Savón, L.L., Boucourt, R., Castro, M. & Herrera, M. 2014. Evaluación de la actividad probiótica del *Lactobacillus pentosus* en indicadores de salud y productivos de cerditos destetados. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 21(3): 130-133, ISSN: 1026-9053. http://www.iip.co.cu/RCPP/213/213_artLAyala.pdf.
- Brizuela, M.A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. La Habana, Cuba.
- De Man, J.C., Rogosa, M & Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Microbiology*. 23(1): 130-135, ISSN: 1365-2672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available in: <http://www.infostat.com.ar>.
- dos Santos Filhoa, A.L., Veloso Freitas, H., Rodrigues, S., Gonçalves Abreu, V.K., de Oliveira Lemos, T., Faria Gomes, W., Naraind, N. & Fernandes Pereira, A.L. 2019. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*, 99: 371-378, ISSN: 0023-6438. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.007>.
- Duncan, D.E. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11: 1-42, ISSN: 0006-341X. <http://dx.doi.org/10.2307/3001478>.
- Endo, A. & Gueimonde, M. 2016. Isolation, identification and characterization of potential new probiotics. In: *Advances in Probiotic Technology*. Foerst, P. & Santivarangkna, C. Taylor & Francis Group, LLC, p. 45. ISBN: 978-1-4987-3458-5.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2016. Probiotics in animal nutrition-Production, impact and regulation by Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome, ISSN: 0254-6019. <http://www.fao.org/3/a-i5933e.pdf>.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2002. 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. April 30 and May 1. London Ontario, Canada. (Consulted: October 25). http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.
- Farnworth, E.R. & Champagne, C.P. 2016. Production of Probiotic Cultures and Their Incorporation into Foods. In: *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. PART II: Probiotics in Food*, Chapter 20. Elsevier Inc, ISBN: 978-0-12-802189-7. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00020-4>.
- Fenster, K., Freeburg, B., Holland, C., Wong, C., Laursen, R.R. & Ouwehand, A.C. 2019. The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 83: 1-17, ISSN: 2076-2607. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7030083>.
- Fernandes Lemos Junior, W.J., Fioravante Guerra, A., Tarrah, A., da Silva Duarte, V., Giacomini, A., Helena Luchese, R. & Corich, V. 2019. Safety and Stability of Two Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains After *in vitro* Gastrointestinal Transit. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, # Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, ISSN: 1867-1314. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09565-2>.
- Freire, A.L., Ramos, C.L. & Schwan, R.F. 2017. Effect of symbiotic interaction between a fructooligosaccharide and probiotic on the kinetic fermentation and chemical profile of maize blended rice beverages. *Food Research International*, 100: 698-707, ISSN: 0963-9969. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.070>.
- García, M., Vidal Fonteles, T., Tibério de Jesus, A.L. & Rodrigues, S. 2013. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*, 139: 261-266, ISSN: 0308-8146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.059>.
- García, Y. & Pérez, T. 2015. Obtención de microorganismos con actividad probiótica para animales monogástricos. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 5(3): 1-19. <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/download/225/225>.
- García, Y., Pérez, T., Boucourt, R., Balcázar, J.L., Nicoli, J.R., Moreira, J., Rodríguez Z., Fuertes H., Núñez O., Albelo N. & Halaihel, N. 2016. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in Veterinary Science*, 108: 125-132, ISSN: 1532-2661. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.08.009>.
- Gutiérrez, D., García, Y. & Sosa, D. 2020. El efecto de *Lactobacillus pentosus* LB-31 como aditivo microbiano en la alimentación de corderos. *Livestock Research for Rural Development*, 32(3), Artículo No. 43, ISSN: 2521-9952. <http://www.lrrd.org/lrrd32/3/yanei32043.html>.
- Kieps, J. & Dembczynski, R. 2022. Current Trends in the Production of Probiotic Formulations. *Foods*, 11: 2330, ISSN: 2304-8158. <https://doi.org/10.3390/foods11152330>.
- Milián, G., Rondón, A.J., Rodríguez, M., Beruvides, A. & Pérez, M. L. 2022. Endospores of *Bacillus*

- subtilis* with probiotic potential in animals of zootechnical interest. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 56(3): 145-153, ISSN: 2079-3480. <https://cjasience.com/index.php/CJAS/article/view/1052>.
- Molina, A. 2019. Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2): 601-611, ISSN: 2215-3608. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34432>.
- Ramlucken, U, Ramchurana, S.O., Moonsamya, G., Jansen van Rensburg, C., Thantshab, M.S. & Lallooa, R. 2021. Production and stability of a multi-strain *Bacillus* based probiotic product for commercial use in poultry. *Biotechnology Reports*, 29: e00575, ISSN: 2215-017X. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00575>.
- Rodríguez, R., Ontivero, Y., García, Y., Sosa, D. & Gómez, S. 2020. Empleo del tubérculo de boniato (*Ipomoea batatas* L.) y la cepa *Lactobacillus pentosus* LB-31 como aditivos a ensilajes mixtos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 32 (7), Artículo No. 117, ISSN: 2521-9952. <http://www.lrrd.org/lrrd32/7/rodri32117.html>.
- Rondón, A. J., Socorro, M., Beruvides, A., Milián, G., Rodríguez, M., Arteaga, F. & Vera, R. 2020. Probiotic effect of PROBIOLACTIL®, SUBTILPROBIO® and their mixture on productive and health indicators of growing pigs. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54 (3): 1-10, ISSN: 2079-3480. <https://www.cjasience.com/index.php/CJAS/article/view/972>.
- Rondón, A.J. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Matanzas, Cuba.
- Sosa, D. 2021. Proceso para la obtención de un probiótico con *Lactobacillus pentosus* LB-31 destinado a la producción animal. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Mayabeque, Cuba.
- Sosa, A., González, N., García, Y., Marrero, Y., Valiño, E., Galindo, J., Sosa, D., Alberto, M., Roque, D., Albelo, N., Colomina, L. & Moreira, O. 2017. Collection of microorganisms with potential as additives for animal nutrition at the Institute of Animal Science. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(3): 311-319, ISSN: 2079-3480. <http://www.cjasience.com/index.php/CJAS/article/view/759/780>.
- Sosa, D., García, Y., Dustet, J.C., García, Y., Martínez, M., Sosa, A. & García, D. 2021. Efecto del aditivo probiótico *Lactobacillus pentosus* LB-31 en pollos de ceba. *Revista MVZ Córdoba*, 26(1): e2037, ISSN: 0122-0268. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2037>.
- Tavares A.G., Lacerda, C., Ribeiro, D. & Freitas, R. 2018. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. *Food Research International*, 111: 187-197, ISSN: 1873-7145. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.065>.
- Vinderola, G., Gueimonde, M., Gomez-Gallego, C., Delfederico, L. & Salminen, S. 2017. Correlation between *in vitro* and *in vivo* assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 68: 83-90, ISSN: 1879-3053. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.005>.