

Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Departamento de Agronomía.

# Trabajo de diploma

Título: Efecto de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77 multiplicados en leche de soya sobre indicadores productivos y de salud en terneros.



Autora: Yisell Hernández Torres.

Sancti Spíritus, 2017.



Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Departamento de Agronomía.

# Trabajo de diploma

Título: Efecto de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophiles* SS77 multiplicados en leche de soya sobre indicadores productivos y de salud en ternero.

Autora: Yisell Hernández Torres.

Tutor: Dr.C. Juan Emilio Hernández García.

MSc. Ibrahin Calero Herrera

Sancti Spíritus, 2017.

## **DEDICATORIA:**

*Dedicado con todo mi corazón y muy especial:*

*A mi madre Grisel por todo el amor y sacrificio,*

*A mi padre Gilberto por toda su espera y confianza y a su esposa Bebi,*

*A mi hermano Yariel por brindarme su carisma,*

*A mi tío Emilio y su hija Dainet por su cariño,*

*A mi primo Orisnel, su esposa Mayelín y a “la maestra” Nieves a ellos gracias por su ayuda y apoyo incondicional,*

*A mi tutor Juan Emilio por permitirme usar de su inteligencia y brindarme su dedicación,*

*Además a mi novio Andy por todo su amor y cariño durante este tiempo,*

*También a Magdiel por estar ahí cuando lo necesitaba.*

*Dedicado también a todos mis demás familiares que me brindaron toda su ayuda y los que no lo son pero que apoyaron en todos los momentos que necesite de ellos,*

*A mis amigos por ser parte especial en mi vida,*

*A mis profesores de la facultad,*

*Yisell Hernández Torres.*

## **AGRADECIMIENTOS:**

*A dios por haberme permitido formarme como futura ingeniera,*

*A la universidad de Sancti Spiritus por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de culminar mis estudios,*

*A mis profesores por haberme brindado todo su apoyo, experiencias y conocimiento durante toda la carrera,*

*A mi tutor por revisar mi trabajo y lograr que este cumpliera con todos los requisitos establecidos y a los profesores que me brindaron su ayuda,*

*A mi madre, a mi padre, mi hermano y toda mi familia y todos mis amigos en general,*

*Y además a todos los que me ayudaron de una forma u otra a culminar mi carrera.*

*Yisell Hernández Torres.*

## RESUMEN:

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Empresa de Productos Lácteos Rio Zaza y en la UEB “Dos Ríos” de la Empresa Pecuaria Managuaco. Primeramente se evaluó el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77 en medios a base de infusión de soya y enriquecido con extracto de levadura y el monitoreo del pH de la fermentación de la leche de soya por las cepas. En un segundo momento se comprobó el efecto del probiótico (*L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77 multiplicados en leche de soya sobre indicadores productivos y de salud en terneros. Se utilizaron 35 terneros Holstein divididos en dos grupos homogéneos (control 19 y tratados 16); los tratados recibieron 15 mL del probiótico con intervalos de 3 días de un tratamiento a otro. Como resultado se obtuvo que ambas cepas fueron capaces de multiplicarse en los medios a base de infusión de soya pero con mayor abundancia de crecimiento cuando este es enriquecido con extracto de levadura. El pH final en el proceso de fermentación favorece a *L. acidophilus* al compararlo con *S. thermophilus* (3,78 vs 5,71). En el ensayo de campo no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos cuando se analizaron las variables incremento de peso, ganancia media diaria y hematocrito. Durante el experimento no se presentó diarrea ni muerte en ninguno de los grupos. Se concluye que el probiótico utilizado bajo el diseño de aplicación, no muestra efecto significativo en los indicadores de producción y salud.

**SUMMARY:**

The following work, entitled *Lactobacillus acidophilus* SS80 and *Streptococcus thermophiles* SS77 multiplied in soy milk on production and health indicators in calves was carried out in the UEB "Dos Ríos" of the company Pecuaría Managuaco, Sancti Spíritus. Sixty Holstein calves (*Bos taurus*) were used with an average age of 45-50 days of life. The objective of this study was to evaluate the effect of *Lactobacillus acidophilus* SS80 and *Streptococcus thermophiles* SS77 grown in soy milk on productive and health indicators in calves in artificial aging. Laboratory tests were performed to observe the growth of the strains *Lactobacillus acidophilus* SS80 and *Streptococcus thermophylus* SS77 in media based on soy infusion and also adding yeast extract, in addition to obtaining soy milk and preparing the Probiotic the pH value and acidity of the same. As a result no significant differences were obtained from the group to which the probiotic was applied with respect to the control group in which the dose used was 15 ml of probiotic with an interval of 3 days from one treatment to another, during the experiment did not occur No death or sick animals from diarrhea or other illness. The use of this product in raising calves also facilitates the assimilation of important nutrients for animal health, achieving a greater increase in live weight, height and resistance against diseases.

## ÍNDICE

Contenido	Página
1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	4
2.1 Soya. Características generales	4
2.2 Leche de soya	5
2.3 Funciones de la microbiota intestinal	7
2.4 Microbiota intestinal de terneros y utilización de antibióticos	8
2.5 Enfermedades infecciosas más comunes en terneros	10
2.6 Evolución del término probiótico	10
2.7 Mecanismos de acción de los probióticos	11
2.8 Clasificación <i>Lactobacillus</i>	12
2.9 Especies de microorganismos comúnmente usadas como probióticos	13
2.10 Beneficios y usos de los probióticos	13
2.11 Prohibición de antibióticos	14
2.12 Experiencias del uso de probióticos en Cuba	15
2.13 Vehículos de cepas probióticas	16
3. Materiales y métodos	
3.1 Ensayos a nivel de laboratorio	18
3.1.1 Capacidad de crecimiento de <i>Lactobacillus</i> y <i>Streptococcus</i> en medio a base de infusión de soya	19
3.1.2 Obtención de la leche de soya	19
3.1.3 Preparación del probiótico	19
3.1.4 Monitoreo del pH y acidez durante la fermentación	
3.2 Ensayos de campo	20
3.2.1 Animales e instalaciones	20
3.2.2 Composición de los alimentos	20
3.2.3 Conformación de los grupos	20

3.2.4 Identificación de los animales	20
3.2.5 Dosis y suministro del probiótico	20
3.2.6 Control de parámetros productivos	21
3.2.7 Control de parámetros de salud	21
3.2.8 Análisis de datos	21
4.Resultados y discusión	22
4.1 Crecimiento de las cepas	22
4.2 Efecto del probiótico en terneros	25
5.Conclusiones	29
6.Recomendaciones	30
7. Bibliografía	31

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades entéricas son de gran importancia para la industria pecuaria, debido a la pérdida de productividad, al incremento de la mortalidad y la contaminación de productos para consumo humano. Es por ello que en los sistemas de producción animal intensiva se introducen nuevos productos y tecnologías que permiten la obtención de alimentos más seguros y que al mismo tiempo contribuyan a producciones con una sostenibilidad económica adecuada (Sánchez y col., 2015).

La crianza artificial en el periodo de lactancia trae aparejado la presentación de trastornos gastrointestinales asociados a diferentes microorganismos causando altos niveles de mortalidad y morbilidad y con ello pérdidas económicas (Kawakami y col., 2010).

La pérdida de terneros en granjas lecheras obedece, en muchos casos, a la mala administración y alimentación, causa de infecciones y depresión de su sistema inmunológico. Estas pérdidas han incrementado el uso de antibióticos para proteger los animales y tratar las diarreas. El uso extensivo y prolongado de antibióticos puede dañar el balance de la flora intestinal e incrementar la susceptibilidad de los terneros ante algunos microorganismos patógenos, que ganan en resistencia a estos antibióticos (Bittar y col, 2016); también puede incrementar el riesgo de diarrea y de mala absorción en los intestinos (Higginbotham y Bath 1993).

Los alimentos destinados para la producción animal requieren, además del empleo de fórmulas adecuadas para la satisfacción de los requerimientos nutricionales, del uso óptimo de los mismos y un mejoramiento en la salud de los rebaños. Esto se puede lograr, entre otras medidas, con la aplicación de los denominados promotores del crecimiento y aditivos alimentarios, los que han cobrado fuerza en su uso, con énfasis en que tales aditivos cumplan con su requisito primario de elevar la eficiencia productiva de los animales (Brizuela y col., 2009).

El uso profiláctico de antibióticos como promotores del crecimiento ha sido cuestionado por la resistencia de las bacterias a estos y por razones de seguridad alimentaria. La resistencia de las cepas de bacterias a antibióticos

puede provocar en los humanos enfermedades transmitidas por los animales mediante determinados productos.

En la actualidad muchos países han prohibido el uso de antibióticos como preventivos y terapéuticos en los animales domésticos utilizados en la alimentación humana. Por lo que existe la necesidad de disminuir o eliminar los problemas gastrointestinales que se producen durante los primeros meses de vida de los terneros, utilizando productos diferentes a los antibióticos que no afecten su normal desarrollo (Chongo y col., 1985: 23).

En el caso de las afecciones gastrointestinales de los animales jóvenes criados en condiciones artificiales, la utilización de probióticos provenientes de la microbiota indígena puede prevenir la colonización del tubo digestivo por patógenos, estimular el desarrollo del sistema inmunológico y contrarrestar el efecto negativo de dichas enfermedades (Rosmini y col., 2004).

Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en forma adecuada al huésped producen efectos benéficos sobre su salud” (FAO, 2002). Las bacterias del género *Lactobacillus* y las levaduras han sido las más estudiadas con esos fines.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son comúnmente usados como probióticos en productos lácteos y a base de leche de soya (Ahmed y col., 2013; Champagne y col., 2009; Chiang y Pan, 2012; Wang y col., 2010), aunque la experiencia es mucho menor en la leche de soya (Feng y co.,/2012).

El Departamento de Veterinaria de la Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez” ha evaluado por varios años el comportamiento clínico práctico de animales jóvenes de diferentes especies, al administrarles oralmente diversos preparados biológico multiplicados en medio natural a base de levadura y miel con resultados significativos (Hernández y col 2009). Sin embargo, no se tienen referencia de la utilización como sustrato de multiplicación de las cepas a la leche de soya y su evaluación en terneros como alternativa a los antibióticos. .

**Problema científico:**

¿Cómo incrementar los indicadores productivos y de salud de los terneros de la cría de la UEB Dos Ríos con la utilización *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophiles* SS77 multiplicados en leche de soya?

**Hipótesis:**

La adición en la alimentación de terneros de cría artificial de cepas probióticas multiplicado en leche de soya (*L. acidophilus* SS80 y *S. thermophiles* SS77), influye en los índices productivos y de salud.

**Objetivo general:**

Evaluar el efecto de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophiles* SS77 crecidos en leche de soya sobre indicadores productivos y de la salud en terneros de crianza artificial.

**Objetivos específicos:**

Determinar el crecimiento de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophiles* SS77 en medios a base de soya.

Evaluar el efecto de *L. acidophilus* SS80 *S. thermophiles* SS77 crecidos medio a base de soya sobre indicadores productivos y de la salud en terneros de crianza artificial.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

### **2.1 Soya. Características generales.**

La soya (*Glycine max*) pertenece a las leguminosas y por su elevado contenido de aceite se incluye, junto con el cártamo, el algodón, el girasol, la aceituna y el cacahuate, en las oleaginosas. En muchos países occidentales, esta semilla se utiliza para la extracción de aceite y el residuo o pasta, rico en proteína, se emplea para la alimentación animal; por otra parte en el Oriente, la soya es fundamental en la dieta de un gran sector de la población debido a sus propiedades nutritivas, principalmente por su proteína, en los últimos años ha habido un gran desarrollo científico y tecnológico para su aprovechamiento integral (BADUI, 1999).

La soya es el grano más importante de las leguminosa del continente oriental, la cual viene dado por la alta calidad de su proteína y aminoácidos esenciales, fundamentalmente lisina (Liu y *col.*, 2011). Es además rica en ácidos grasos insaturados e isoflavenoides, no contiene colesterol ni lactosa, por lo que puede ser consumida por pacientes intolerantes a lactosa (Lin y *col.*, 2004).

Puede ser preparada tanto como poroto, germinada (brotes) y en una variedad increíble de subproductos: leche de soya, tofu, salsa de soya, lecitina de soya y confitería. (IESN, 2001). No obstante, a pesar de esos méritos, el desagradable sabor y la indigestibilidad de oligosacáridos tales como rafinosa y estaquinosa limitan el consume de mayor diversidad de productos a base de soya.

#### **Características generales**

En forma general, la soya está anatómicamente constituida por tres fracciones principales: la cascarilla, que representa 8% del peso total de la semilla, el hipocotilo (2%) y el cotiledón (90%); en este último, se localiza el aceite en unos pequeños compartimentos, llamados esferosomas, de 0,2 a 0,3  $\mu\text{m}$  y que a su vez están dispersos entre los cuerpos proteínicos denominados aleuronas de mayor tamaño (2 a 20  $\mu\text{m}$ ) integrados por aproximadamente 98% de proteínas y algo de lípidos y de ácido fítico (Badui, 1999).

Según el Instituto de Estudios Salud Natural de Chile (2001), el poroto de soya proporciona proteínas de alto valor biológico y aminoácidos esenciales: fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano y valina. También posee una buena proporción de otros cuatro aminoácidos

denominados esenciales, tales como, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, prolina, serina entre otros.

La soya (*Glycine max. L*), se caracteriza por ser una leguminosa de ciclo corto extensamente cultivada constituyendo una de las materias primas más empleadas en la agroindustria y en la alimentación humana, aprovechando su alto contenido de proteínas que fluctúa entre el 38 – 42% y aceites que va del 18 al 22% (Chávez et al 2017).

La soya además es rica en vitaminas, especialmente del complejo B: vitamina B1 (tiamina), B2 (riboflavina), ácido fólico. Además posee vitaminas liposolubles como las vitaminas A, E y K. También posee minerales como calcio, fósforo, hierro, magnesio y potasio.

## **2.2 Leche de soya.**

La leche de soya, o extracto acuso del grano de soya es considerado un coloide el cual contiene partículas proteicas, proteínas hidrosolubles y minerales, etc. La leche de soya es rica en aminoácidos esenciales y vitaminas. Es un alimento concentrado en proteínas, recomendable para el metabolismo celular. Dada su concentración se recomienda en muy pocas cantidades o porciones algo diluidas a los niños, salvo para reemplazar la leche de vaca por prescripción médica (IESN, 2001).

La norma cubana define la leche de Soya como el producto obtenido de la trituración en medio acuoso caliente del cotiledón del frijol de soya, al cual se le inactivan las enzimas y se le reducen a niveles mínimos los carbohidratos indeseables y otras sustancias no apropiadas mediante un proceso tecnológico adecuado y un tratamiento térmico severo (NRIAL 174:2008).

Hoy en día existe un porcentaje alto de la población adulta en África (72%), América (19% en personas de raza blanca y 72% de raza negra) y Asia (60%) que producen menos cantidad de  $\beta$ - galactosidasa (lactasa) intestinal que los europeos, consecuentemente, se produce una mala absorción de la lactosa (azúcar de la leche) por esta población. Los síntomas de la mala absorción de la lactosa son diarreas, formación de gases intestinales y retortijones, con ello se postula a que la leche de soya puede ayudar a resolver estos problemas, debido a que no contiene lactosa, siendo a su vez una excelente fuente de proteínas de alta calidad (Fennema, 2000).

Existen actualmente dos métodos populares para preparar leche de soya, el método tradicional propuesto por (Shurtleff y Aoyagi, 1979) y el método “pulverización en caliente” propuesto por (Wilkens, 1967). El método tradicional involucra el remojo de la semilla y luego la molienda en frío para producir leche de soya con un sabor astringente el cual lo prefieren las personas de oriente. En comparación con el método de molienda en caliente el cual involucra el remojo y posterior molienda en caliente de las semillas produciendo leche de soya con un reducido sabor astringente, el cual no es preferido por las personas occidentales (Kao y col., 2003).

Kwok y col., 2002, concluyeron que para producir una leche de soya comercialmente estéril con una satisfactoria inactivación de esporas bacterianas y una degradación mínima de la calidad sensorial (color y sabor altamente aceptables) y nutricional (retención de tiaminas entre un 90 y 93%), es necesario una combinación de temperatura y tiempo de 143 °C /60 s.

La fermentación ha sido una opción tradicional para sobreponerse a estas limitaciones hacienda más palatable el producto (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010). Durante el proceso de fermentación por la acción de los microorganismos muchos metabolitos son transformados y mejoran el sabor y le dan un valor añadido, al incidir benéficamente sobre la salud del consumidor. Las características de aroma y sabor del proceso de fermentación del grano de soya son generados particularmente por LAB; las cuales son comúnmente usadas en forma simple o en simbiosis (Chou y Hou, 2000).

Nutricionalmente (LIM y col., 1990), indican que las proteínas de la leche de soya varían entre 47,93 a 54,40% y que el pH de la leche se encuentra entre 6,42 a 6,55. Por otro lado, la mayor concentración de proteínas se localiza en la nata de la leche de soya, encontrándose en 100 g de producto seco 47g de proteínas, siendo por esto ampliamente utilizada como sustituto cárnico (Yongqiang y col., 2005).

Sun y Breene, 1991, señalan que debido a que la leche de soya es baja en calcio y amino ácidos sulfurados en comparación a la leche de vaca, se postula que al utilizar la leche de soya como un sustituto tradicional de la leche de vaca es necesaria una fortificación de la misma con calcio, vitaminas y minerales, es por esto que (Yacizi y col., 1997) proponen la fortificación con calcio de la leche de soya, con un límite máximo de 38 mg/g de proteína.

### **2.3 Funciones de la microbiota intestinal.**

Los animales sanos poseen en su tracto gastrointestinal una microbiota típica que después de la colonización durante los primeros días de vida, alcanza un estado de simbiosis. En un momento dado, una región específica del intestino puede contener más de 400 especies bacterianas, incluyendo la microbiota residente y las especies transientes que ocupan temporalmente un nicho vacío (Lu y Walker, 2001).

La flora habitante del tracto gastrointestinal tiene influencia sobre la bioquímica, inmunología, fisiología y resistencia no específica del huésped contra enfermedades infecciosas (Salminen y Wright, 1998).

La mucosa intestinal representa la primera línea de defensa contra patógenos, garantizando la defensa inmunológica mediante el tejido linfoide asociado al intestino (Britti y *col.*, 2006). Los linfocitos B y T migran desde los sitios de inducción (placa de Peyer y folículos linfoides que rodean las células M) a través de la linfa y sangre periférica, hacia los sitios efectoros (lámina propia y compartimentos epiteliales) donde se hace efectiva la respuesta inmune. Los linfocitos B producen anticuerpos IgA que reconocen y remueven los antígenos de la mucosa sin activar la respuesta inflamatoria. Cuando los antígenos escapan de este primer mecanismo de defensa y alcanzan la lámina propia, ocurre una respuesta inflamatoria mediada por la activación del complemento con producción de IgG (Britti y *col.*, 2006).

La colonización normal del intestino por las bacterias comensales y la interacción con las células epiteliales es fundamental para el correcto desarrollo del sistema inmune de mucosas (Rhee y *col.*, 2004). Estas interacciones entre el sistema inmune de mucosas y los microorganismos mantienen una activación del tejido linfoide asociado al intestino fisiológicamente controlado a lo largo de la vida. También se sabe que los microorganismos que colonizan el intestino de los mamíferos neonatos pueden incrementar la circulación de anticuerpos antimicrobianos específicos (Cebra, 1999).

Las reacciones del centro germinal de las placas de Peyer, que preferentemente generan IgA y células B específicas de antígeno, dependen de la estimulación por parte de los antígenos bacterianos entéricos (Shroff y *col.*, 1995). Los estudios en animales gnotobióticos mostraron que en ausencia de

microbiota, el sistema inmune intestinal Soto, LP (2010) Introducción está subdesarrollado y la morfología del intestino está alterada. La ausencia de bacterias intestinales se asocia con reducciones en la renovación celular de la mucosa, la vascularización, el grosor de la pared muscular, la motilidad, la producción de citocinas, la actividad de las enzimas digestivas y con una defectuosa inmunidad mediada por células (Canny y McCormick, 2008). La capacidad funcional del sistema inmune adquirido es similar en animales gnotobióticos que en los convencionales, pero el número de linfocitos intestinales es reducido en los primeros. En la mayoría de los casos, en los animales gnotobióticos se produce predominantemente IgM, poca IgG y nada de IgA. Cuando los animales gnotobióticos son expuestos a las condiciones normales o alimentados con probióticos, su morfología intestinal y el sistema inmune de mucosas comienza a desarrollarse rápidamente y a producir una gran variedad de isotipos de anticuerpos, incluyendo anticuerpos específicos para las bacterias intestinales residentes (Lu y Walker, 2001).

Además, la microbiota normal, inhibe a los patógenos por diferentes mecanismos. Uno de éstos es la exclusión competitiva, que consiste en la competencia por nutrientes esenciales o los sitios de unión al epitelio (Al-Zenki y col., 2009) y otro, es la constitución de un ambiente desfavorable para ciertos patógenos (Corr y col., 2007).

Otra función benéfica de la microbiota es la contribución a la salud del hospedador a través de la producción de vitaminas (Tappenden y Deutsch, 2007), ácidos grasos de cadena corta (De Boeber y col., 2000), desconjugación de sales biliares (Pereira y col., 2003) y la detoxificación de metabolitos hepáticos e ingeridos (Humblot y col., 2005).

#### **2.4 Microbiota intestinal de terneros y utilización de antibióticos**

Al momento del nacimiento, el tracto gastrointestinal de los terneros es estéril. Los microorganismos se introducen durante el parto, a partir de la microbiota fecal, vaginal y del ambiente. Esta microbiota se mantiene relativamente estable a lo largo de la vida, aunque ocurren algunos cambios periódicamente, principalmente al momento del destete, por el uso de antibióticos o por la introducción de probióticos (Ewaschuk y col., 2004).

El impacto de la flora intestinal es de vital importancia en el estado nutricional del hospedador y es de especial interés en animales de granja que son criados

en sistemas intensivos (Rosmini y col., 2004). El equilibrio del ecosistema se puede ver alterado en los sistemas intensivos de crianza debido a la separación de sus madres, la alimentación con sustitutos lácteos, la eliminación de los beneficios de la leche de vaca, la falta de calostro, situaciones de stress y por el uso de antibióticos. Este desbalance que provoca morbilidad y mortalidad de los terneros jóvenes, produce, en consecuencia grandes pérdidas económicas.

Este desequilibrio deja a los animales en un estado de mayor susceptibilidad a las infecciones, que pueden provocar perturbaciones en la cadena alimentaria. Estos patógenos presentes en los animales, pueden ser los causantes de brotes de enfermedades en humanos, ya sea por el consumo de productos cárnicos o sus derivados (enfermedades transmitidas por alimentos, ETAs) o por el contacto con los animales o sus desperdicios (Callaway y col., 2004). Los patógenos causantes de ETAs pueden ser encontrados en el tracto gastrointestinal de los animales pero son a menudo difíciles de diagnosticar en el campo ya que producen bajo a nulo impacto en la sanidad del animal y/o en la producción y son liberados esporádicamente.

El tratamiento pre-faena es de vital importancia, ya que en muchos casos, las prácticas post faena utilizadas, no son suficientes para evitar dichas enfermedades (Callaway y col., 2002).

Los antibióticos han sido utilizados en la alimentación de terneros desde 1950. Muchos investigadores han reportado que esta práctica mejora la performance del ternero (Heinrichs y col., 1995; Monticello y Rusoff, 1961), la eficiencia fagocítica y disminuye el scorefecal (Quigley y col., 1997; Monticello y Rusoff, 1961) y la mortalidad (Berge y col., 2005). Por otro lado, la utilización de antibióticos en forma masiva, tiene consecuencias indeseables, tales como el desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes (Langford y col., 2003) y la permanencia de residuos antibióticos en la carne de consumo y productos derivados (Seymour y col., 1988; Jones y Seymour, 1988), lo cual tiene un efecto directo sobre la salud humana. Por tales motivos, el uso de antibióticos podría ser reducido o eliminado totalmente en un futuro (Abu-Tarboush y col., 1996). Como consecuencia, la demanda de tratamientos alternativos no tradicionales que controlen las infecciones entéricas agudas, se ha visto aumentada (Ewaschuk y col., 2004).

## **2.5 Enfermedades infecciosas más comunes en terneros.**

Los patógenos bacterianos poseen procesos adaptativos que le permiten modificar las funciones de las células epiteliales para aumentar su penetración en el epitelio intestinal del hospedador y causar la enfermedad.

Un paso necesario para el éxito de la colonización y la producción de la enfermedad, es la habilidad de los patógenos bacterianos para adherirse a la superficie del hospedador, lo cual es un importante factor determinante de la virulencia. Generalmente, la unión a las células intestinales, es esencial para que la bacteria resista el flujo de los fluidos del contenido luminal y las contracciones peristálticas. Una vez unida a la superficie intestinal, puede colonizar y establecer una residencia permanente. Los patógenos necesitan para su adhesión un sitio blanco apropiado. Algunos de los constituyentes de la superficie de las células de los mamíferos, incluyendo glicoproteínas y glicolípidos, pueden servir como receptores para uniones bacterianas. Por otro lado, el hospedador ha desarrollado estrategias especializadas para resistir tales infecciones. Estas interacciones definen el proceso de enfermedad o su inhibición (Lu y Walker, 2001)

Entre los patógenos bacterianos más comúnmente encontrados en terneros destacan: *Escherichia coli* (Callaway y col., 2004, Van Diemen y col., 2005, Naylor y col., 2007) y *Salmonella* (Paulin y col., 2002).

## **2.6 Evolución del término probiótico**

A principios del siglo pasado, Metchnikoff en 1907 describió los efectos beneficiosos de la ingestión de bacterias ácido lácticas, presentes en la leche fermentada, en la flora del tracto gastrointestinal (García, 2005).

El médico pediatra francés Henry Tissier, destacó la importancia de las Bifidobacterias, al notar la baja cantidad en niños con episodios diarreicos, no así en niños sanos, en quienes encontraba una cantidad significativa, con esta investigación postulo que la administración de Bifidobacterias a pacientes con diarrea podría ayudar a restaurar su flora intestinal. Lilly y Stilwell en 1965, introdujeron por primera vez el término “probiótico” refiriendo que son “sustancias secretadas por un organismo y capaces de estimular el crecimiento de otro “(Moreno, 2012).

Parker en 1974, definió a los probióticos como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal”. Fuller en 1989 postuló a los probióticos como “suplementos microbianos que influyen beneficiosamente en el huésped animal mejorando su balance microbiano”. Este concepto ha evolucionado con el tiempo y Gunther en 1995 ofrece un concepto más amplio, el cual define a los probióticos como organismos microbianos, vivos o muertos o como producto de la fermentación microbiana, nucleótidos y sus productos metabolizables, metabolitos de las proteínas y sustancias, ácidos orgánicos, además de enzimas de tipo hidrolíticas que influyen beneficiosamente al hospedero (García, 2005).

Con la consecuente investigación en torno al tema y teniendo en cuenta los postulados y las definiciones anteriormente enunciadas, se ha ampliado y actualizado el concepto que se tiene de probióticos, como un producto que contiene un número suficiente de microorganismos vivos, puros o mixtos, con un efecto beneficioso sobre la salud, a través de una alteración positiva de la microbiota por colonización del intestino. Finalmente según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como “Organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped” (Moreno, 2012).

Entre los microorganismos más utilizados para estos fines se encuentran las bacterias ácido lácticas, especialmente *Lactobacillus* sp. y *Bifidobacterium* sp., y las levaduras, fundamentalmente las del género *Saccharomyces* (García, 2005).

## **2.7 Mecanismos de acción de los probióticos.**

Adherencia a las células intestinales: El primer paso en la patogénesis es la adhesión a las células epiteliales del intestino; una de las principales propiedades de los probióticos es la capacidad que tienen para adherirse a la mucosa intestinal, la cual tiene gran influencia en la defensa del organismo, ya que las bacterias benéficas conforman una barrera de exclusión a los microorganismos patógenos, fundamentalmente, por la ocupación de los sitios de adhesión y la estimulación del sistema inmune (Chávez, 2014).

Producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, entre otros que reducen el número de células patógenas posibles, perturbando el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas (Marlli, 2013).

Producción de sustancias bacteriostáticas que son activas contra los siguientes agentes patógenos: *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *Cándida albicans*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *L. bulgaricus*, *L. Fermenti*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. leichmannii*, *L. plantarum*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Salmonella typhosa*, *S. schottmuelleri*, *Shigella dysenteriae*, *S. paradysenteriae*, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *S. Lactis*, *Vibrio comma* (Marlli, 2013).

También se plantean otros mecanismos de actuación de los probióticos como lo son la Reducción del pH intestinal. Disminución del potencial de oxidación-reducción en el intestino. Cambios en la flora entérica. Estimulación del sistema inmune. Prevención de la acumulación de aminas tóxicas y amoníaco. Producción de enzimas y/o estimulantes de la secreción. Producción de vitaminas del complejo B. Neutralización de enterotoxinas de bacterias patógenas (Frizzo y col., 2007).

## **2.8 Clasificación Lactobacillus:**

Lactobacillus es el género con más especies ácido lácticas clasificadas de acuerdo a sus propiedades fermentativas, según (Moreno, 2012):

Grupo A: Lactobacilos homofermentativos obligados, fermentan hexosas a ácido láctico vía Embden Meyerhof Parnas (EMP), los microorganismos poseen la enzima fructosa 1,6 bifosfatoaldolasa y no la fosfoacetolasa por lo que no fermentan pentosa ni gluconato. *L. delbruekii* y *L. acidophilus*.

Grupo B: Lactobacilos homofermentativos facultativos, fermentan hexosas hasta ácido láctico vía (EMP), fermentan pentosas y gluconato vía fosfogluconato hasta ácido láctico y ácido acético. *L. casei* y *L. plantarum*.

Grupo C: Lactobacilos heterofermentativos obligados, fermentan siempre las hexosas - ácido láctico, etanol, ácido acético y CO<sub>2</sub> vía fosfogluconato

y fermentan las pentosas a ácido láctico y a ácido acético vía fosfogluconato. Cepas de *Lactobacillus* próximos a *Leuconostoc*. Los *Lactobacillus* son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias ácido lácticas, siendo capaces de crecer a pHs bajos de 4, lo que facilita su aislamiento en medios que contengan ácidos y azúcares; esta resistencia les permite seguir creciendo, aun en pH que hayan descendido tanto, en comparación con otras bacterias lácticas, siendo las únicas capaces de finalizar las fermentaciones lácticas.

Los probióticos disponibles se pueden clasificar en especies “colonizadoras”, como *Lactobacillus* y *Enterococcus* spp, y también en especies de flujo libre “no colonizadoras”, como *Bacillus* spp (esporas) y *Saccharomyces cerevisiae* (Linares, 2015).

## **2.9 Especies de microorganismos comúnmente usadas como probióticos.**

Según García (2005), los probióticos más utilizados son:

- Lactobacillus: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*.
- Streptococcus y otros cocos Gram positivos: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Streptococcus diaacetylactis*, *Streptococcus intermedius*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*.
- Bifidobacterias: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium choerinum*.
- Bacillus: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus breve*.
- Levaduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*.

## **2.10 Beneficios y usos de los probióticos.**

Los principales beneficios que se obtienen del uso de probióticos en la producción pecuaria son tres, uno de ellos es la seguridad sanitaria pues reducen en los animales la concentración de microorganismos peligrosos para los humanos, como es el caso de *Salmonella* o de *E. coli* entero-hemorrágica.

También se tiene en cuenta como segundo beneficio la competitividad de las empresas, ya que ayudan a preservar la salud animal al hacer que estos crezcan mejor y que produzcan más, carne, huevo o leche. Y finalmente, la diferenciación, pues el uso de probióticos podría permitir que las empresas sean un sistema de producción ecológico al producir un probiótico que puede ser considerado como un producto orgánico y por ende natural, creando entonces un desarrollo económico y sostenible (Marlli, 2013).

### **2.11 Prohibición de antibióticos:**

En el terreno de la cría de animales, en 2006 se introdujo la prohibición del uso de antibióticos para estimular el crecimiento. La Comisión ha impulsado legislación sobre el control de la *Salmonella* sp. en todas las fases pertinentes de producción, transformación y distribución, con objeto de disminuir la exposición humana a *Salmonella* sp. posiblemente resistente (Comisión Europea, 2011).

Teniendo en cuenta la legislación internacional reciente y las presiones de los consumidores domésticos a retirar los antibióticos promotores del crecimiento y antibióticos límites disponibles para el tratamiento de infecciones bacterianas, los probióticos pueden ofrecer opciones alternativas. Nuevos avances en la aplicación de los probióticos, están dirigidas a producir cambios significativos en la fisiología intestinal y proporcionar los niveles más altos de salud, así como los parámetros de aumento de rendimiento en aves de corral (Tellez, 2011).

Evolución del repliegue de antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal, según (Guitierrez, 2013).

1945-1960: La Unión Europea (UE) publicó las primeras advertencias del riesgo de desarrollo de resistencia bacterianas y demostración de su transmisión vertical y horizontal.

1960: Comienza el uso de antibióticos en piensos (penicilina, estreptomicina, tetraciclinas).

1969: El comité Swann recomendó imponer restricciones al uso de antimicrobianos en pienso, para permitir solo aquellos no usados como terapéuticos en medicina humana y veterinaria.

1970: La mayoría de las recomendaciones Swann se llevan a la práctica en el Reino Unido.

1975: Relajación de las recomendaciones Swann. Se permite el uso como antibióticos promotores de crecimiento (APC) de espiramicina y tilosina, a pesar de tener análogos en la medicina humana.

1984: Los granjeros suecos solicitan a su Gobierno la prohibición de los APC a causa de las preocupaciones de los consumidores.

1986: Prohibición de los APC en Suecia fundamentada en el desarrollo de resistencias y en sus efectos “inseguros” a largo plazo.

1993: Primeros estudios que muestran una relación entre el uso de avoparcina y el aumento de transición de enterococos resistentes a vancomicina, antibiótico del mismo grupo (glucopéptidos).

1995: Suecia y Finlandia entran en la Unión Europea con permiso para mantener su prohibición de los APC. Prohibición de la avoparcina en Dinamarca.

1996: Prohibición de la virginiamicina en Dinamarca y de la avoparcina en Alemania.

1997: La Unión Europea prohíbe la avoparcina. La OMS concluye que “es esencial sustituir el uso de los APC”.

1998: La Unión Europea prohíbe la ardamicina como APC, por riesgos de resistencias cruzadas, y el uso desde 1999 de otros 4 antibióticos (virginiamicina, bacitracina Zn, fosfato de tilosina, espiramicina), como medida de preocupación. Dinamarca prohíbe todos los APC.

1999: El comité científico permanente de la Comisión Europea (CE) recomienda el abandono de los APC que puedan ser usados en medicina humana o veterinaria y que puedan promover la resistencia cruzada. Se prohíben el uso de inhibidores (Olaquinox, carbadox) por motivos de salud laboral.

2000: La industria farmacéutica se opone judicialmente a la decisión de la CE, sin resultado.

2001- 2004: Retirada de seis sustancias anticoccidias (Amprolio, ídem + etopabato, metilclorpindol, ídem + metilbenzocato, arprinocina, nicarbacina).

2006: Prohibición del uso de los restantes APC (Avilamicina, flavofosfolipol, salinomicina, monensina). Los dos últimos podrán seguir siendo empleados en pollos como coccidiostatos.

## **2.12 Experiencias del uso de probióticos en Cuba.**

Reportan uso de probióticos en terneros (Casanova, 2000), (González, 2001) y (Jiménez, 2002) que utilizan un preparado biológico de bacterias lácticas en terneros con resultados benéficos sobre indicadores de salud y productivos. (Marín y col., 2010), reporta el efecto probiótico del BIOPRANAL sobre los indicadores bioproductivos y de salud en terneros valoran el probiótico Sorbial® en el comportamiento productivo y la salud animal de terneros en pastoreo. (Hernández, 2012) evalúa el SUBTILPROBIO en terneros lactantes de la Recría “Los quinientos”, en la provincia de Matanzas, mientras que (Delgado y col., 2014) lo hace con probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* en parámetros hemáticos y metabólicos de terneros en pastoreo.

### **2.13 Vehículos de cepas probióticas:**

Los alimentos se pueden emplear como vehículo para una amplia gama de aditivos, medicamentos y otras sustancias no nutricias. No es posible proporcionar una lista integral de todos ellos y no podemos recomendar ni avalar productos en lo particular. Es posible que las legislaciones de los distintos países controlen el uso de estos productos. Las clases más importantes de aditivos cuyo uso pudiese considerarse en los alimentos aparecen a continuación (Boletín Ross Tech, 1999)

Enzimas.

Fármacos Medicinales y Profilácticos.

Antibióticos Promotores del Crecimiento y Favorecedores de la Digestión.

Prebióticos.

Ácidos Orgánicos.

Absorbentes.

Antioxidantes.

Agentes Antimicóticos.

El medio natural por excelencia de las bacterias lácticas es la leche, no obstante en su utilización práctica como probiótico en la salud animal se han evaluado diferentes opciones, teniendo en cuenta la no competitividad con el destino principal de la leche que es la alimentación humana (Hernández et al 2009).

Calero (2002) en ensayo con ternero utiliza como sustrato un homogeneizado compuesto por: 30 % de miel final de caña de azúcar, 10 % de levadura torula

seca y 60 % de agua; obteniéndose un producto con aproximadamente 31.5% de materia seca y 4.2 % de proteína bruta en base húmeda.

La soya es una excelente materia prima para el desarrollo de probióticos en alimentos funcionales no lácticos que proyectan atenuar la intolerancia a la lactosa. La preparación de productos fermentados no lácticos a partir de otras materias primas como la soya e inoculada con probióticos y prebiótica es un nuevo campo del conocimiento dentro de los alimentos funcionales (Mishra y Mishra, 2013). Henriksson, Vasiljevic, y Shah (2005) reportan que la proteína de la leche de soya fermentada, puede favorecer el crecimiento de muchas cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*.

BAL son comúnmente usados como probióticos en productos lácteos y en menor medida a base de leche de soya (Ahmed y col., 2013; Champagne y col., 2009; Chiang, y Pan, 2012; Wang y col., 2010), y muchos EPS-producidos por BAL son usados en productos lácteos (Folkenberg y col., 2005; Mende y col., 2013; Vuyst y col., 2003). No obstante, esta experiencia es mucho menor en la leche de soya (Feng y col., 2012).

Un gran aporte a la industria nacional sería la producción de los probióticos a partir de un medio no láctico, con importantes beneficios como:

- Sustitución de importaciones de probióticos para aplicaciones en productos no lácteos.
- Mejor aprovechamiento de los recursos agrícolas y la tecnología disponibles en el país.
- Mejorar el contenido nutricional de alimentos de consumo masivo en el territorio.
- Ampliación de las aplicaciones de los probióticos a otros alimentos ya sea para consumo humano o animal.
- Reducción de costos para los productores.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 Ensayos a nivel de laboratorio.

##### 3.1.1 Capacidad de crecimiento de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophiles* SS77 en medio a base de infusión de soya.

Para comprobar el crecimiento de las BAL en el medio de cultivo Agar Infusión de Soya Sacarosa (AISS) se confeccionó el medio con la composición que se refleja en la tabla 1.

Tabla 1. Medio Agar Infusión de Soya Sacarosa (AISS).

Reactivos	Cantidad
Sacarosa	2,0 g
Infusión de Soya	100 ml
Agar	0,15 g

Una vez preparado el medio en Erlenmeyer de 250 mL, se ajustó a pH 6.5 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min. Bajo flujo laminar el medio fue dispensado en placas Petri que una vez solidificadas fueron sembradas por dispersión con 0.1 mL de cada una de las cepas *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophiles* SS77, utilizando una espátula de Drigalski. La incubación fue en condiciones de anaerobiosis por 72 h. Después de la incubación se comprobó el crecimiento de las cepas, teniendo en cuenta los criterios siguientes: - Ausencia de crecimiento, + Crecimiento débil, ++ Crecimiento moderado, +++ Crecimiento abundante.

En la tabla 2 se ilustra la composición del medio de cultivo Agar Infusión de Soya Sacarosa, enriquecido con Extracto de levadura ((AISS+EL). Los pasos de preparación y siembra fueron los mismos.

Tabla 2. Medio Agar Infusión de Soya Sacarosa más extracto de levadura (AISS).

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Sacarosa	2,0 g
Infusión de Soya	100 ml
Extracto de levadura	0,5 g
Agar	0,15 g

### **3.1.2 Obtención de la leche de Soya.**

La leche de Soya se preparó siguiendo el método descrito por Mishra y Mishra, (2013). Las muestras de leche de Soya así preparadas contenían 9,49 % de sólidos totales, 8 -10 Brix de sólidos solubles, 4.89-5.15 % de proteínas y 1.83-2.23 % de grasa, con pH ajustado de 6.10 - 6.22. Esta leche se esterilizó durante 7 min 121 °C y una atmósfera.

### **3.1.3 Preparación del Probiótico.**

Las bacterias se multiplicaron en leche de soya (LS). Para ello se utilizaron recipientes de 1000 mL transparentes con 500 mL de LS, los cuales fueron esterilizados en autoclave por un período de 7 min a 121 °C y una atmósfera de presión, luego se inoculó al 3% (v/v) del cultivo mixto (*L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77) activado en leche descremada en polvo (LDP). Se incubó por 2.5 h a 43 °C. La concentración de microorganismos en el producto final fue de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia por mL (ufc/mL) y menos de 10 ufc/mL de coliformes, manteniendo su conservación a una temperatura inferior a los 7 °C hasta su utilización y una vida útil hasta 15 días (NRIAL 174:2008).

### **3.1.4 Monitoreo del valor de pH y acidez durante la fermentación.**

El valor del pH la leche de Soya durante la fermentación fue medida en intervalos de una hora usando un pH metro con un vaso de electrodo y se

estandarizó en las temperaturas de experimento, rango de 4.0 a 7 (NRIAL 173 (2001)).

### **3.2 Ensayos de campo.**

#### **3.2.1 Animales e instalaciones.**

El trabajo se realizó en la Cría artificial de la UEB “Dos Ríos”, Empresa Pecuaria Managuaco, Sancti Spíritus. Se utilizaron 35 terneros Holstein (*Bos taurus*) con una edad promedio de 45-50 días de vida. La crianza artificial se realizó en naves techadas de piso de cemento.

#### **3.2.2 Composición de los alimentos.**

Todos los alimentos utilizados en la crianza de los animales no fueron suplementados con antibióticos. La dieta de los alimentos se refleja en la tabla 3. Todos los animales fueron alimentados a lo largo del experimento con concentrado comercial, heno, sustituto lácteo y agua, racionados directamente en el comedero 2 veces al día.

#### **3.2.3 Conformación de los grupos.**

Los terneros se dividieron al azar en dos grupos experimentales homogéneos en su peso y edad: problema (16 animales) y testigo (19 animales).

#### **3.2.4 Identificación de los animales.**

Antes del comienzo del experimento a cada ternero se le asignó un número y fue marcado adecuadamente con una tirilla para facilitar su alimentación y el monitoreo durante la fase experimental.

#### **3.2.5 Dosis y suministro de los probióticos.**

A cada ternero del grupo problema, se le proporcionó 15 mL de probiótico a una concentración de  $8 \times 10^8$  ufc/mL de cada cultivo. La primera dosis de los probióticos se suministró el día de llegada a la nave y las siguientes con un intervalo de 3 días de un tratamiento a otro (Calero 2002). Además de la dieta establecida. El grupo control fue sometido a los mismos procedimientos que los grupos tratados, sólo que se le administró un placebo en vez del preparado biológico. El experimento se extendió por 90 d.

### **3.2.6 Control de parámetros productivos.**

A los 35 terneros de los grupos problema y testigo se realizó controles de peso vivo, ganancia de peso.

El peso vivo se determinó utilizando una balanza de piso y los valores obtenidos fueron expresados en kg; la ganancia media diaria se determinó a partir de las diferencia entre los pesos iniciales y finales y se expresó en gramos por animales por días.

### **3.2.7 Control del estado de salud.**

Se determinó diariamente el consumo de agua y la frecuencia de diarreas, a los 90 días se realizó mediciones de valores hematológicos a 15 terneros de los grupos problema y testigo. Se extrajo de la vena yugular 4 mL de sangre, sin anticoagulante. Entre los valores hematológicos se realizarán mediciones de hemoglobina y hematocrito (Wittwer y *col.*, 1988).

### **3.2.8 Análisis de datos.**

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza de clasificación simple para las variables incremento en peso, peso final, ganancia media diaria y hematocrito utilizando el paquete estadístico SPSS 11.5.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1 Crecimiento de las cepas.

Las cepas de *S. thermophilus* SS77 y *L. acidophilus* SS80 mostraron capacidad de crecimiento en los medios a base de soya, aunque este se hizo más abundante cuando se enriqueció con extracto de levadura.

Tabla 3: Crecimiento de *S. thermophilus* SS77 y *L. acidophilus* SS80 en el Medio Base soya (24 horas de incubación).

Cepas	Agar Sacarosa	Soya Extracto de Levadura	Agar Sacarosa	Soya Extracto de Levadura	Sacarosa-
<i>S. thermophilus</i> SS77	++	+++			
<i>L. acidophilus</i> SS80	++	+++			

LEYENDA: - Ausencia de crecimiento, + Crecimiento muy débil, ++ Crecimiento débil, ++++ Crecimiento abundante.

La generación de biomasa probiótica utilizando medios de cultivo generados con subproductos de la industria cubana debe ser una estrategia a seguir por investigadores que proyecten su uso en el desarrollo ganadero. Para la evaluación de los posibles subproductos de la industria a ser incorporados a un medio de cultivo para las BAL se debe tener en cuenta los siguientes puntos:

- Debe asegurar un crecimiento abundante de las BAL.
- Debe obtenerse fácilmente desde una industria local.
- Debe contener un sustrato similar al que los animales encontrarían en el jarabe administrado en el campo.
- Debe ser capaz de abaratar durante el estudio *in vitro* los costos de laboratorio por concepto de medios de cultivos.

Tomando como consideración que del proceso tecnológico de obtención de la leche de soya, libera la infusión de soya, resultado de la etapa inicial del proceso de hidratación y que existía el antecedente de su posibilidad de uso como medio de cultivo para BAL (Ponce de León, 2008), se propuso el medio ensayado; demostrando su factibilidad en la obtención de masa bacteriana.

Aunque no se tienen referencias del uso de la infusión de soya, si se reporta por varios autores que la leche de soya es usualmente usada como sustituto de medios de cultivo para el crecimiento y actividades bioquímicas de varias BAL (Farnworth y col., 2007). *Lactobacillus* es el género que más comúnmente se usa en la fermentación de la leche de soya. *Lactobacillus casei* (Wang y col., 2010), *Lactobacillus rhamnosus* (Farnworth y col., 2007), *Lactobacillus paracasei* (Chiang y Pan, 2012) y *Lactobacillus acidophilus* (Liong 2009) han demostrado además un buen crecimiento en leche de soya.

La leche de soya fermentada por BAL mejora el aroma y sabor, así como las propiedades de textura y viscosidad aparente (Champagne 2010). Una tendencia es la aplicación de cultivos que posean al menos una cepa con propiedades funcionales y que mejore la textura del producto. Los exopolisacáridos producidos por BAL son cultivos iniciadores funcionales porque ellos contribuyen a la consistencia y reología del producto de leche de soya fermentado (Vuyst y col., 2003). Ello puede modificar las características del flujo del fluido, estabilidad de la suspensión, partículas fluculantes, materiales encapsulados y productos emulsionados. (Charchoghlyan y Park, 2013). Por consiguiente, la incorporación de EPS producidos por LAB en diversos productos basados en sojas tales como salsa de soja y la pasta de soja se han convertido en una tendencia reciente (Mende y col., 2013).

BAL son comúnmente usados como probióticos en productos lácteos y a base de leche de soya (Ahmed y col., 2013; Champagne y col., 2009; Chiang, y Pan, 2012; Wang y col., 2010), y muchos EPS-producidos por BAL son usados en productos lácteos ( Mende y col., 2013; Vuyst y col., 2003). No obstante, esta experiencia es mucho menor en la leche de soya (Feng y col., 2012).

Tabla 4. Variación del pH en leche de Soya para las cepas de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77.

Cepas	T <sub>0</sub> h	T <sub>2</sub> h	T <sub>3</sub> h	T <sub>4</sub> h	T <sub>5</sub> h	T <sub>6</sub> h	T <sub>7</sub> h
<i>L. acidophilus</i>	6,74 <sup>a</sup>	5,78 <sup>ba</sup>	4,44 <sup>b</sup>	4,25 <sup>b</sup>	4,02 <sup>b</sup>	3,78 <sup>b</sup>	3,78 <sup>b</sup>
(80)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,032	0,025	0,078	0,050	0,053	0,184	0,178

S.	6,98	6,91 <sup>ab</sup>	6,75 <sup>b</sup>	6,72 <sup>b</sup>	6,68 <sup>b</sup>	6,43 <sup>b</sup>	5,71 <sup>b</sup>
<i>thermophiles</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
(77)	0,010	0,100	0,05	0,042	0,057	0,07	0,032
Simbiosis de	6,77	5,49	4,60	4,40	4,21	4,16	4,17
cepas	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	0,005	0,081	0,015	0,046	0,025	0,011	0,015

Valores expresados en medias +/- DS. Diferentes letras superiores en una fila denota diferencias significativas entre ensayos ( $p < 0.05$ ).

El proceso de fermentación está determinado principalmente por la temperatura de incubación y la cantidad de inóculo agregado. Mientras mayor sea la diferencia con la temperatura óptima y menor la cantidad de inóculo agregada mayor será el tiempo de fermentación. Normalmente usan temperaturas de incubación entre 42 y 45 °C, de 2 a 3% de cultivo y un tiempo de incubación de 2,30 a 3 h, tiempos que están en corresponden con los empleados en el trabajo. Los resultados obtenidos en el ensayo difieren con lo planteado por (Bauman y col., 2015) quienes plantean un crecimiento más rápido del *S. thermophilus*, la aparición del ácido láctico es el que provoca el descenso del pH y como se observa en la tabla 5, este desciende más rápido en el *L. acidophilus* SS80. Es posible que ese comportamiento sea observado cuando ambos gérmenes estén en sinergia (Radke-Mitchell y col., 1986). En los productos lácteos fermentados, la fermentación culmina cuando se alcanza un valor de 4,2 a 4,5 de pH aproximadamente (Souza y col., 1991), rango observado en la leche de soya en nuestro trabajo. Los valores de pH del medio disminuyó a valores por debajo de 5 en 18 horas, lo que se corresponde con el encontrado por (Jurado y col., 2014) donde en su estudio las cepas redujeron el pH a valores  $\leq 5,5$  en 24 hs. Con estas características las cepas trabajadas tendrán mayores beneficios ya que se conoce que la mayoría de los enteropatógenos inhiben su crecimiento en valores cercanos a un pH de 5,5 (Rondón, 2009).

Las BAL juegan un rol importante en la industria de alimentos por la producción de ácidos orgánicos, incluyendo ácido láctico y ácido acético producido por estas bacterias que puede ser un conservante natural y mejora de sabor;

además tienen amplia aceptación por su rol como probiótico, los cuales son capaces de estimular la respuesta del sistema inmune, actividad anticancerígena y previene el crecimiento de patógenos (Axelsson, 2004; Castellano et al., 2010). Por su seguridad en el uso durante mucho tiempo se consideran a las BAL como bacterias GRAS (generalmente reconocidas como seguras) para el consume humano y animal (Liu y col., 2011).

#### 4.2 Efecto del probiótico en terneros.

El comportamiento de la administración del probiótico sobre el incremento de peso y la ganancia media diaria se refleja en la tabla 5, mostrándose que no existieron diferencias significativas con el grupo control.

Tabla 5: Efecto del probiótico (*S. thermophilus* SS77, *L. acidophilus* SS80) sobre el incremento en peso en los terneros (g).

Grupos	n	PI	PF	IP	GMD
I (control)	19	73,2± 5,83 a	92,3 ± 5,05 a	19,1± 7,17 a	0,54±0,20 a
Probiótico	16	74,8 ± 7,63 a	92,4 ± 9,89 a	17,6 ± 5,11a	0,50±0,20 a

Legenda: Letras desiguales en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ .

PI: Peso Inicial, PF: Peso Final, IP: Incremento de peso, GMD: Ganancia Media Diaria.

Este comportamiento no coincide con lo informado por (German y col., 2001), quienes señalaron que las bacterias probióticas ejercen los siguientes efectos positivos: la protección de la digestión de la lactosa; la modulación del sistema inmune; beneficios en la salud estomacal, intestinal y del tracto urinario, y la disminución de las diarreas, entre otros. Así mismo, (Schneider y col., 2000) les atribuyen efectos sobre la mejor integración de los tejidos del cuerpo y el incremento de la regeneración de la sangre y otros.

Los análisis de indicadores de salud refleja que con la administración del producto probiótico no se produjeron efectos significativos en ninguno de los casos (tabla 6), durante el período del experimento no se presentaron casos de diarrea, ni se observaron diferencias entre los análisis coprológicos entre

ambos grupos; tampoco se evidenció variación en la conducta animal de esta especie.

Abril (2015) en investigación para evaluar el efecto de un aditivo zootécnico de origen natural en la dieta de terneras Holstein en pre y post destete encontró diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ) para la ganancia de peso corporal, sin embargo, los niveles de proteínas plasmáticas totales y de cuadro hemático no mostraron diferencias significativas entre los valores obtenidos; concluyendo que el uso de aditivos de origen natural en la dieta de terneras permiten incrementar la ganancia diaria de peso, sin modificaciones significativas en el cuadro hemático y proteínas totales.

Tabla 6: Efecto del probiótico (*S. thermophilus* SS77, *L. acidophilus* SS80) sobre el hematocrito.

Grupos	N	Hto1	Hto2	Inc. Hto
Control	7	26,2 ± 3,94 <b>a</b>	23,5 ± 8,63 <b>a</b>	-2,7 ± 9,15 <b>a</b>
Probiótico	7	22,2 ± 3,83 <b>a</b>	26,7 ± 5,73 <b>a</b>	4,5 ± 6,74 <b>a</b>

LEYENDA: Las letras desiguales en la misma columna difieren para  $p < 0.05$ .

López (2016), evaluó el efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* adicionada como probiótico a la dieta basal de terneros sobre la Condición Corporal (CC), Alzada, Ganancia Diaria de Peso (GDP), Parámetros Hematológicos y Metabólicos. Los resultados de GDP y Alzada no mostraron diferencias estadísticas y al analizar los parámetros hematológicos se encontró diferencia estadística solo en glucosa.

El efecto de los probióticos sobre el incremento de peso y la ganancia media diaria ha sido comunicada por diversos autores, por ejemplo en un experimento con 80 terneros Holstein de 1 a 7 días de edad fueron distribuidos en dos grupos y tratado uno con bacterias ácido lácticas ( $10^6$  UFC/g) de sustituto lácteo) durante 8 semanas, se encontró que la ganancia de peso por ternero fue de 9.06kg más y la GMD se incrementó en 35.7% (Probiotic, 1994).

En un estudio donde se comparó la utilización de antibióticos y probiótico y se encontró que la ganancia media diaria fue superior en 161g con respecto a los animales que recibieron antibióticos (Roth y Conklin 2001).

Por otra parte, al evaluar el probiótico “Paciflor” en terneros se determinó que los animales tratados tuvieron un peso final superior en 11.7% con respecto al control, resultados que también varios investigadores reportan donde se muestra mejoras en el comportamiento (De los Santos y col 1990, Gilliland y Speck 1997, Hooper 1989). Mientras que otros, no observaron diferencias significativas, pero se vieron favorecidos los animales tratados (Jenny y col 1991).

Calero (2002) reportó el efecto probiótico de un preparado de bacterias lácticas (*Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*) sobre la salud y ganancia de peso en terneros en vaquerías y centros de desarrollo de la Empresa Pecuaria Managuaco de la Provincia Sancti Spíritus. Los resultados mostraron una mejora del 50% en la ganancia media diaria en los animales tratados con respecto a los controles, mientras la incidencia de diarrea se redujo entre un 20 y 25%. La mortalidad se vio igualmente reducida en los animales tratados con respecto a los controles. Hallazgos que no se corresponden con los nuestros, destacándose que en este caso el sustrato empleado difiere del utilizado en nuestro trabajo.

Los diferentes resultados en el uso de probióticos pueden atribuirse a las diferencias en las condiciones de crianza y al ternero como tal. Los efectos beneficiosos de los probióticos en la salud y vitalidad animal se atribuyen, generalmente, a sus efectos de estimulación en la respuesta inmunológica específica a antígenos y patógenos. Nuestros resultados no se corresponden con los encontrados por (Donovan y col., 2002 ), el que confirma los efectos beneficiosos de probióticos en la salud y vitalidad.

Giraldo y col., 2015, sostienen que los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en la cantidad adecuada, le generan un efecto benéfico al huésped, disminuyen los problemas de salud y pueden aumentar la productividad, gracias a que con ellos se pueden afectar las proporciones de las diferentes especies de bacterias en la microbiota del tracto gastrointestinal.

No obstante, en cuanto a su efecto como promotores de crecimiento los resultados son contradictorios, en gran medida por la diversidad de cepas, especies de microorganismos, dosis, la forma de administración; así como también la diferente composición de las dietas utilizadas en los bioensayos.

## 5. CONCLUSIONES.

- ❖ Las cepas de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *S. thermophiles* SS77 mostraron crecimiento en medios a base de soya, siendo más abundante el crecimiento cuando se enriqueció el medio con extracto de levadura.
- ❖ El suministro de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophiles* SS77 crecidos en leche de soya, no mostró efecto significativos sobre indicadores productivos y de la salud en terneros de crianza artificial.

## **6. RECOMENDACIONES.**

- ❖ Proyectar el uso de medios de cultivo generados o enriquecidos con subproductos de la industria de la soya.
- ❖ Repetir los ensayos en terneros diseñando otros esquemas de tratamiento con el probiótico que incluya dosis y frecuencia.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- Abu-Tarboush, H.; Al-Saiady, M. y Keir El-Din, A. 1996. Evaluation of diet containing Lactobacilli on performance, fecal coliform, and lactobacilli of dairy calves. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 57: 39-49.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A., & Khan, S. T. (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir e part II. *Food Hydrocolloids*, 30, 343e350.
- Al-Zenki, S; Al-Nasser, A.Y.; Al-Saffar A.; Abdullah, F.; Al-Bahouh, M.; Al-Haddad, A., Alomirah, H. y Mashaly, M. 2009. Effects of using a chicken-origin competitive exclusion culture and probiotic cultures on reducing *Salmonell* in broilers. *Appl. Poult., Res.* 18: 223-29.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Salminen, A. V. Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (pp. 1e66). New York: Marcel Dekker.
- Bauman G. Longo G. (2015). El Yogurt: Un Alimento Esencial. [http://www.anmat.gov.ar/CODIGO/CAPITULO%20VIII%20\(actualiz%206-7-02\).pdf](http://www.anmat.gov.ar/CODIGO/CAPITULO%20VIII%20(actualiz%206-7-02).pdf) ).
- Berge, A.C.B; Lindeque, P.; Moore, D.A. y Sischo, W.M. 2005. A Clinical Trial Evaluating Prophylactic and Therapeutic Antibiotic Use on Health and Performance of Preweaned Calves. *J. Dairy Sci.*, 88: 2166 - 2177.
- Bittar, Carla Maris Machado; Silva, Fernanda Lavínia Moura; Paula, Marília Ribeiro de; Silva, Jackeline Thaís; Gallo, Mariana Pompeo Camargo; Oltramari, Carlos Eduardo; Napoles, Gustavo Guilherme Oliveira; Soares, Marcelo Cezar (2016). Desempenho e parâmetros sanguíneos de bezerros em sistema de desaleitamento precoce suplementados com probiótico de bactérias ruminais. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.17, n.2, p.249-261 abr. /jun., 2016  
<http://www.rbspa.ufba.br> ISSN 1519 9940  
<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402016000200012>.
- Boletín Ross Tech 99/37, Antibióticos Promotores del Crecimiento; 1999.

- Britti, M.S.; Roselli, M.; Finamore, A.; Merendino, N. y Mengheri, E. 2006. Regulation of immune response at intestinal and peripheral sites by probiotics. *Biologia*, 61: 735-740. Chávez, L. (2014). Evaluación de cepas probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei* y *E. faecium*) como inmunomoduladores nutricionales en pollos de engorde. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. [http://www.bdigital.unal.edu.co/49641/1/43977835\\_2014.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/49641/1/43977835_2014.pdf).
- Brizuela MA, Serrano P, Almazán O, Rodríguez JA, Camps D, Bueno G, 2009 Probióticos y enzimas. Una alternativa natural al empleo de antibióticos. *ICIDCA*; XLIII (2):30-39.
- Calero I, H. (2002). Evaluación de la aplicación oral de un preparado biológico mixto de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* a rumiantes jóvenes. Tesis presentada en opción al Título Académico de Master en Medicina Preventiva. Directores: Dr. C. Juan E. Hernández García. MSc. Juan Carlos Rodríguez Fernández. Universidad Central de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Villa Clara.
- Callaway, T.R.; Anderson, R.C.; Edrington, T.S.; Elder, R.O.; Genovese, K.J.; Bischoff, K.M.; Poole, T.L.; Jung, Y.S.; Harvey, R.B. y Nisbet, D.J. 2002. Preslaughter 153 intervention strategies to reduce food-borne pathogens in food animals. *J. Anim. Sci.*, 81: 17-23.
- Callaway, T.R.; Anderson, R.C.; Edrington, T.S.; Genovese, K.J.; Bischoff, K.M.; Poole, T.L.; Jung, Y.S.; Harvey, R.B. y Nisbet, D.J. 2004. What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *J. Anim. Sci.*, 82: E93-99.
- Canny, G.O. y McCormick, B.A. 2008. Bacteria in the Intestine, Helpful Residents or Enemies from Within? *Infect. Immun.*, 76: 3360 - 3373.
- Casanova Deivis. 2000. Utilización de un preparado biológico de bacterias lácticas en terneros. Trabajo presentado para la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista. Sede Universitaria Sancti Spíritus. p38.
- Castellano, P., González, C., Carduza, F., & Vignolo, G. (2010). Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged

- raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Science*, 85, 394e401.
- Cebra, J.J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clinical Nutrition*; 69: 1046S - 1051S.
  - Comisión Europea. 2011. Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo.
  - Corr, S.; Li, Y.; Riedel, C., O'Toole, P.; Hill, C. y Gahan, C. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Microbiol.*, 104: 7617-7621.
  - Champagne, C. P., Green-Johnson, J., Raymond, Y., Barrette, J., & Buckley, N. (2009). Selection of probiotic bacteria for the fermentation of a soy beverage in combination with *Streptococcus thermophilus*. *Food Research International*, 42, 612e621.
  - Charchoghlyan, H., & Park, H. (2013). Characteristics of a novel bacterial polysaccharide consisted of glucose and mannose as major components. *Food Hydrocolloids*, 30, 512e518.
  - Chiang, S., y Pan, T. (2012). Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 903e916.
  - Chongo, Berta, Marrero, Dolores, A. Zamora y R. Garcia. 1985. Avances en la crianza de terneros y novilas. Mesa Redonda. Evento científico 20 Aniversario del ICA. Rumiantes. Octubre.
  - De Boever, P.; Deplancke, B. y Verstraete, W. 2000. Fermentation by Gut Microbiota Cultured in a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem Is Improved by Supplementing a Soygerm Powder. *J. Nutr.*, 130: 2599-2606.
  - Delgado R. F., De la Caridad Herlinda R., Barreto G., Vázquez R. 2014. Efecto probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* en parámetros hemáticos y metabólicos de terneros en pastoreo. *Rev. prod. anim.*, 26 (3): ISSN 2224-7920.
  - De los Santos, H. S.; Gordian, M. A. y Villegas, R. Evaluación del uso de probióticos contra el uso de becerros Holstein Friesian en el

- Antiplano. Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Habana. Cuba. (19): 106, 1990.
- Donovan, D.C., Fraklin, S.T., Chase, C.C.L. & Hippen, A.R. 2002. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or enterogurad. *J.Dairy Sci.* 85:947
  - Ewaschuk, J.B.; Naylor, J.M.; Chirino-Trejo, M. y Zello, G.A. 2004. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Can. J. Vet. Res.*, 68:249-253.
  - Farnworth, E., Mainville, R. I., Desjardins, M. P., Gardner, N., Fliss, I., & Champagne, C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 174e181.
  - FAO/WHO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Expert consultation report:Córdoba, Argentina: Food and agriculture organization of the United Nations and World Health Organization, 1-4 October. Higginbotham, G.E.; Robison, J.D.; Atwill, E.R.; Das Gracas, M. y Pereira, C. 1998.Effect of a Direct-Fed Microbial Product on Calf Performance and Fecal Flora.
  - FAO/WHO. 2002.Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Working Group Report, 1-11.
  - García, Y. 2005. Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 39, núm. 2, 2005,pp.129140.<http://www.redalyc.org/pdf/1930/193017845001.pdf>.
  - Germán, A.J. y col., 2001. Immune cell populations within the duodenal mucosa of dogs with enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.
  - Gilliland, S. y Speck, M. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. of Food Prot.* (40): 820-823; 1977.

- González Yuniór M. 2001. Comportamiento bioprodutivo de terneros que reciben agentes probióticos. Trabajo presentado para la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista. Sede Universitaria Sancti Spíritus. p42.
- Görgülü,M; Siuta,A; Yurtseven,S. 2003. Efecto de Probióticos en el Comportamiento y Salud de terneros en crecimiento. Revista Cubana de Ciencias Agrícolas tomo-37 No-2 p- 125.
- Gutiérrez, L. 2013. Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. Heinrichs, A.J.; Heinrichs, B.S.; Harel, O.; Rogers, G.W. y Place, N.T. 1995. A Prospective Study of Calf Factors Affecting Age, Body Size, and Body Condition Score at First Calving of Holstein Dairy Heifers. J. Dairy Sci., 88: 2828-2835.
- Jenny Andrea Cocío Olmos (2006). Elaboración de Quesillo de Leche de Soya (Glycine max) con Adición de Bacterias Probióticas (Lactobacillus casei shirota y Bifidobacterium lactis Bb12). Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de licenciado en Ciencia de los Alimentos. VALDIVIA – CHILE.
- Hernández, P. Y. 2012. Evaluación del SUBTILPROBIO en terneros lactantes de la Recría ‘Los quinientos’. Tesis de Ingeniería Agrónoma. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Facultad de Agronomía. p. 22-26.
- Hernández, J.E.; Calero I. Reyes, J.; Rodríguez, J.C 2001. Evaluation of the practical clinical effect of feed supplements with lactic bacteria in young calves. Rev. NEWSLETTER, 3/.
- Hernández, J. E.; Calero, I.; López, O. F.; Reyes, F.; Ledesma, María; Rodríguez, J. C.; Reyes, J. Evaluación del suministro de un preparado biológico de bacterias lácticas en bovinos jóvenes. Revista electrónica INFOCIENCIA, CITMA. Sancti Spiritus; 1999.
- Humblot, C.; Combourieu, B.; Väisänen, M.L.; Furet, J.P.; Delort, A.M. y Rabot, S. 2005. 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy-Based Studies of the Metabolism of Food-Borne Carcinogen 2-Amino-3-

- Methylimidazo[4,5-f]Quinoline by Human Intestinal Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 5116-5123.
- Higginbotham, G.E.; Bath, D. L. Evaluation of *Lactobacillus* fermentation cultures in calf feeding systems. *J. Dairy Sci. (E.U.)* (76): 615-620; 1993.
  - Hooper, P. The role of probiotics (Intestinal inoculants) in production animals. Proceedings. World association of veterinary food Hygienists Xth (Jubilee) International Symposium in Stockholm. p. 27- 30; 2- 7 July; 1989.
  - Jenny, B. F.; Vandijk, H. J. y Collins, J. A. Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. J. Dairy Sci. (74):1968; 1991.
  - Jiménez Irina I. 2002. Comportamiento bioproduktivo de terneros que reciben agentes probióticos. Trabajo presentado para la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista. Sede Universitaria Sancti Spíritus. p44.
  - Jones, G.M. y Seymour, E.H. 1988. Cowside Antibiotic Residue Testing. *J. Dairy Sci.*, 71: 1691-1699.
  - Kawakami, S.I., T. Yamada, N. Nakarishi, Y. Cai and H. Ishizahi, 2010 c . Leucocyte phagocytic activity with or without probiotics in Holstein Calves. *Res . J. Biol. Sei.*, (In press).
  - Langford, F.M.; Weary, D.M. y Fisher, L. 2003. Antibiotic Resistance in Gut Bacteria from Dairy Calves: A Dose Response to the Level of Antibiotics Fed in Milk. *J.Dairy Sci.*, 86: 3963-3966.
  - Linares, L. 2015. Los desafíos nutricionales frente a las restricciones de uso de aditivos: eliminación de uso de antibiótico. XXIV Congreso Latinoamericano de Avicultura 2015. [http://www.engormix.com/MA-avicultura/nutricion/articulos/los-desafios-nutricionales-frente-t7474/141-p0.htm#\\_=\\_](http://www.engormix.com/MA-avicultura/nutricion/articulos/los-desafios-nutricionales-frente-t7474/141-p0.htm#_=_).
  - Liang, M., Easa, A. M., Lim, P., & Kang, J. (2009). Survival, growth characteristics and bioactive potential of *Lactobacillus acidophilus* in a soy-based cream cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1382e1391.
  - Liu, S., Han, Y., & Zhou, Z. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44, 643e651.

- Lu, L. y Walker, W.A. 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(suppl): 1124S-30S.
- Marín, A. y col., 2010. Efecto probiótico del BIOPRANAL sobre los indicadores bioproductivos y de salud en terneros. *Revista Virtual Amazónica*.  
<http://www.uea.edu.ec/revista/articulos/R1N12010Art5.pdf>.
- Marlli, A. 2013. Uso de probióticos en la nutrición de monogástricos como alternativa para mejorar un sistema de producción. Tesis. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD.  
[http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/1075/1/524\\_24223.pdf](http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/1075/1/524_24223.pdf).
- Mende, S., Peter, M., Bartels, K., Rohm, H., & Jaros, D. (2013). Addition of purified exopolysaccharide isolates from *S. thermophilus* to milk and their impact on the rheology of acid gels. *Food Hydrocolloids*, 32, 178e185.
- Mishra, S., & Mishra, H. N. 2013. Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk. *Food Bioprocess Technology*, Springer.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11947-012-1021-4>.
- Monticello, S.A. y Rusoff, L.L. 1961. Effect of a New Antibiotic, Spiramycin, on Young Dairy Calves. *J. Dairy Sci.*, 44: 1316-1321.
- Moreno, L. 2012. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Tesis. Universidad Nacional de Colombia.  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/8647/1/lizethjohannamorenogalarza.2012.pdf>.
- Muscato, T.V., Tedeschi, L.O. & Russel, J.B. 2002. The effects of ruminal fluid preparations on growth and health of newborn, milk-fed dairy calves. *J. Dairy Sci.* 85:648.
- NRIAL 174:(2008). Yogur de soya aromatizado requisitos de calidad.
- NRIAL 173 (2001). Productos de soya métodos de ensayo.

- Naylor, S.W.; Nart, P.; Sales, J.; Flockhart, A.; Gally, D.L. y Low, J.C. 2007. Impact of the Direct Application of Therapeutic Agents to the Terminal Recta of Experimentally Colonized Calves on *Escherichia coli* O157:H7 Shedding. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 1493-1500. Probiotic/Nutritional Program for Young Calves Bio-Vet Calf Trial 121994NA. <http://www.bio-vet.com/trial121994na.html>.
- Probiotic/Nutritional Program for Young Calves Bio-Vet Calf Trial 121994NA. <http://www.bio-vet.com/trial121994na.html>.
- Radke-Mitchell, L. C., & Sandine, W. E. 1986. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*, 69, 2558–2568.
- Roberts, F.H.S. y O'Sullivan, P.J. 1950 Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Austr. J. Agric. Res.* 1: 99-102.
- Rodríguez J.C., Carmenate María del Carmen, Hernández J.E., Guerra A., Calero I., Álvarez J.M., Martín E. y Suárez Madeleine. 2009. Evaluación del suministro de un preparado biológico de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* en cerdos en crecimiento. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. Volumen 16 (número 1). 54-58.
- Rosmini, M.R.; Sequeira, G.J.; Guerrero-Legarreta, I.; Martí, L.E.; Dalla-Santina, R.; Frizzo, L. y Bonazza, J.C. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 3: 181-191; 2004.
- Schneider, R. *et al.* 2000. Aplicación de técnicas de RAPD y análisis del 16S rDNA para la identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota aislada de terneros criados en condiciones artificiales. VI Congreso Latinoamericano de Microbiología de los Alimentos. Buenos Aires, Argentina.
- Souza, G. 1991. Fatores de Qualidade do iogurte. *Coleta* nea do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, Brazil), 21, 20–27.
- Siuta, A. 1997. The role of probiotics in the organism. *Acta Agraria et Silvestria. Series ZooTechnica*. 35:33

- Ortiz, A. 2013. Efecto de Ecobiol probiótico en el rendimiento de pollos de engorde. Conferencia: 19 de Simposio Europeo sobre los pollos de Nutrición, Alemania.
- Paulin, S.M.; Watson, P.R.; Benmore, A.R.; Stevens, M.P.; Jones, P.W.; VillarrealRamos, B. y Wallis, T.S. 2002. Analysis of *Salmonella enterica* Serotype-Host.
- Pereira, D.; McCartney, A. y Gibson, G. 2003. An *In Vitro* Study of the Probiotic.
- Quigley, J.D.; Drewry, J.J.; Murray, L.M. y Ivey, S.J. 1997. Body Weight Gain, Feed Efficiency, and Fecal Scores of Dairy Calves in Response to Galactosyl-Lactose or Antibiotics in Milk Replacers. *J. Dairy Sci.*; 80: 1751-1754.
- Rhee, K.J; Sethupathi, P.; Driks, A.; Lanning, D.K. y Knight, K.L. 2004. Role of Commensal Bacteria in Development of Gut-Associated Lymphoid Tissues and Preimmun Antibody Repertoire. *J. Immunol.*, 172: 1118-1124. Roth, L. y Conklin, C. The uses of fastrack® direct-fed microbial products by the dairy industry. <http://users.1st.net/asone/Dairydfm.htm>; 2001.
- Rosmini, M.R.; Sequeira, G.J.; Guerrero-Legarreta, I.; Martí, L.E.; Dalla-Santina, R.; Frizzo, L. y Bonazza, J.C. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3: 187-197.
- Salminen, S. y von Wright, A. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd edn., Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Soto, LP (2010) *Bibliografía* 169.
- Sánchez L, Omura M, Lucas A, Pérez T, Llanes M, Ferreirall C.L 2015. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev. Salud Anim.* Vol. 37 No. 2 (Mayo.-ago. 2015): 94-104. ISSN: 2224-4700.-Soca Mildrey, Ojeda F. Canchila E.R. Soca Maylin (2011). Efecto del probiótico Sorbial® en el comportamiento productivo y la salud animal de terneros en pastoreo. *Pastos y Forrajes*, Vol. 34, No. 4, octubre-diciembre, 463-472, 2011.

- Tellez, G. 2011. Probióticos / microbios alimentados directos para el control de Salmonella en aves de corral. Food Research International Volume 45, Issue 2, Pp 628–633.
- Van Diemen, P.M.; Dziva, F.; Stevens, M.P. y Wallis, T.S. 2005. Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- Genes Required for Intestinal Colonization in Calves. Infection and Immunity, 73: 1735–1743.
- Vanbelle, M., Teller, E., Focant, M. 1990. Probiotics in animal nutrition. Arch. Tirerenahr. 40:542.
- Vuyst, L. D., Zamfir, M., Mozzi, F., Adrianya, T., Marshall, V., Degeest, B., et al. (2003). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. International Dairy Journal, 13, 707e717.
- Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, Y., Chen, X., et al. (2010). Effect of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on fermentation characteristics of set yogurt. International Journal of Dairy Technology, 63, 105e112.
- Wittwer, F y H. Bohmwald 1988. Manual de Patología Clínica Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. 173 pp.