



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

## **INULINA COMO PREBIÓTICO PARA *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* CON POTENCIAL PROBIÓTICO EN RUMIANTES**

JUAN LUIS GÓMEZ HERNÁNDEZ

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

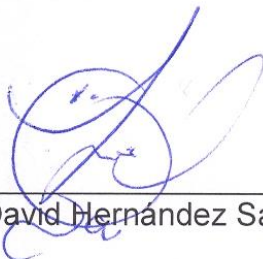
2015

La presente tesis titulada: **Inulina como prebiótico para *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* con potencial probiótico en rumiantes** realizada por el alumno: **Juan Luis Gómez Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

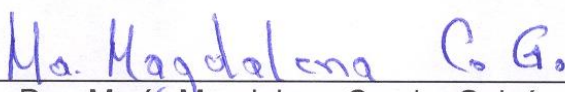
CONSEJERO



---

Dr. David Hernández Sánchez

ASESORA



---

Dra. María Magdalena Crosby Galván

ASESOR



---

Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca

ASESOR



---

Dr. Emilio Manuel Aranda Ibáñez

ASESORA



---

Dra. Ana María Hernández Anguiano

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2015.

# INULINA COMO PREBIÓTICO PARA *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* CON POTENCIAL PROBIÓTICO EN RUMIANTES

Juan Luis Gómez Hernández, MC

Colegio de Postgraduados, 2015

## RESUMEN

La producción de leche en México es deficiente, los hatos no cumplen con el proceso de recría de manera eficiente y las becerras lactantes presentan serios problemas de diarreas. El uso de antibióticos como medida preventiva para los procesos diarreicos se ha vuelto común, dejando problemas de resistencia a estos productos. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son habitantes comunes del tubo digestivo posterior y ejercen un efecto antagónico contra enteropatógenos. El control de la flora intestinal mediante la alimentación se puede dar a través del uso de prebióticos como la inulina. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* (*Ls*) y *Enterococcus faecium* (*Ef*) en medio MRS con inulina. Se hicieron incubaciones *in vitro* a 37 °C, con sustitución de glucosa por inulina en el medio MRS, se determinó la curva de crecimiento, pH, producción de ácido láctico, amonio, resistencia de las cepas a ácido clorhídrico y sales biliares y antagonismo contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Se observó que la inulina tiene un efecto estimulante en el crecimiento de las cepas evaluadas, con lecturas de absorbancia mayores en MRS-inulina que en MRS-glucosa (*Ls* 2.83 vs. 2.35) (*Ef* 2.67 vs. 2.28) y mayor conteo de bacterias al término de la fase de crecimiento exponencial (*Ls* 13.11 vs. 10.98 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>) (*Ef* 13.63 vs. 10.76 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>), sin afectar las demás variables evaluadas. Se concluye que las BAL evaluadas *Ls* y *Ef*, presentes en el tubo digestivo posterior de becerras son capaces de fermentar inulina, la cual ejerce un efecto estimulante en su crecimiento sin afectar su potencial probiótico.

**Palabras clave:** *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium*, inulina, rumiantes.

# INULIN AS PREBIOTIC FOR *Lactobacillus salivarius* and *Enterococcus faecium* WITH PROBIOTIC POTENTIAL IN RUMINANTS

Juan Luis Gómez Hernández, MC

Colegio de Postgraduados, 2015

## ABSTRACT

Milk production in Mexico is deficient, herd producers not meeting the rearing process efficiently and nursing calves have serious problems of diarrhea. Use of antibiotics as a preventive measure for diarrheal diseases has become common, leaving antibiotic resistance problems. Lactic acid bacteria (LAB) are common inhabitants of the digestive tract and make an antagonistic effect against enteric pathogens. Control of gastrointestinal flora by feeding can be given through the use of prebiotics such as inulin. The aim of this research was to evaluate the influence of inulin on *in vitro* growth performance of *Lactobacillus salivarius* (*Ls*) and *Enterococcus faecium* (*Ef*). *In vitro* incubations were performed at 37 ° C, replacing the MRS glucose for inulin, and was determined the growth curve, pH, production of lactic acid, ammonium, strains resistance to hydrochloric acid and bile salts and antagonism against *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. It was observed that inulin has a stimulating effect on the growth of strains, higher absorbance readings in MRS-inulin than MRS-glucose (*Ls* 2.83 vs. 2.35) (*Ef* 2.67 vs. 2.28) and higher bacterial count at the end of the growth curve (*Ls* 13.11 vs. 10.98 Log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup>) (*Ef* 13.63 vs. 10.76 Log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup>), without affecting the other variables evaluated. We conclude that LAB evaluated *Ls* and *Ef* present in the digestive tract of calves are able to ferment inulin and it has a stimulating effect on growth without affecting their probiotic potential.

**Keywords:** *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium*, inulin, ruminants.

## DEDICATORIA

A Dios que me permite un día a la vez.

A mi madre, María Guadalupe Hernández, valiente señora, mujer amorosa.

A mi padre, Agustín Gómez, ejemplo de entrega y amor.

A mis hermanos y hermanas, únicos y hermosos.

A mis cuñados y cuñadas que me cuidan como hermano.

A mis sobrinos que son motivo de esperanza.

A mi abuelos Francisco y Carmen, felices 75 años de matrimonio.

A mis amigos que me regalan alegría y diversión.

*Simplemente, los amo.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Colegio de Postgraduados.

Al Dr. David Hernández Sánchez.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galván.

A la Dra. Ana María Hernández Anguiano.

Al Dr. Efrén Jacinto Ramírez Bribiesca.

Al Dr. Emilio Manuel Aranda Ibáñez.

A la Ing. Margarita Crosby Galván.

A los doctores-profesores que comparten sus conocimientos y vivencias.

Gracias por su tiempo, sus conocimientos y sobre todo su amistad.

*“La verdadera colaboración no es alabar siempre, sino señalar los errores, hablando un lenguaje claro de realidad, de verdad y de amistad. El verdadero amigo es el que aconseja, y si es el enemigo el que habla, es mejor que esté cerca.”*  
*Juan Domingo Perón.*

*Nuestro conocimiento nos ha hecho cínicos,  
nuestra inteligencia, duros y secos.  
Pensamos demasiado y sentimos muy poco.  
Más que máquinas necesitamos humanidad,  
más que inteligencia necesitamos amabilidad y cortesía.  
Sin estas cualidades la vida será violenta  
y todo estará perdido.*

*"El gran dictador", Charles Chaplin.*

# CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Sector lechero en México.....	3
2.1.1. Panorama de la producción de leche en México .....	4
2.2. Cría de reemplazos.....	5
2.2.1. Sistema digestivo de bovinos neonatos .....	5
2.2.2. Rumiante .....	6
2.3. El problema de la diarrea en becerras lactantes .....	6
2.3.1. Bacterias ácido lácticas como antagonistas de enteropatógenos.....	8
2.4. Biotecnología aplicada a la nutrición animal.....	8
2.4.1. Los probióticos y prebióticos .....	9
2.4.2. Uso de probióticos en becerros.....	9
2.5. Inulina .....	12
2.5.1. La inulina como prebiótico.....	17
2.5.2. Uso de inulina en humanos.....	18
2.5.3. Uso de inulina en animales .....	19
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. Objetivo general.....	24
3.2. Objetivos particulares.....	24
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
5.1. Cepas de bacterias con potencial probiótico .....	26
5.1.1. Identificación de las bacterias aisladas de calostro y mucosa oral mediante técnicas moleculares .....	26
5.1.2. Selección de bacterias .....	28



5.1.3. Conservación de las cepas bacterianas .....	28
5.2. Tratamientos .....	29
5.3. Reactivación de las cepas bacterianas .....	30
5.4. Variables evaluadas.....	31
5.4.1. Curva de crecimiento bacteriano.....	31
5.4.2. pH.....	32
5.4.3. Producción de ácido láctico.....	33
5.4.4. Determinación de amonio .....	34
5.4.5. Resistencia de las bacterias a ácido clorhídrico y sales biliares .....	35
5.4.6. Inhibición de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhimurium</i> .....	36
5.5. Diseño experimental y análisis estadístico .....	38
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
6.1. Curva de crecimiento bacteriano.....	39
6.2. pH.....	46
6.3. Producción de ácido láctico.....	48
6.4. Amonio .....	49
6.5. Resistencia a ácido clorhídrico y sales biliares .....	51
6.6. Inhibición de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhimurium</i> .....	53
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>8. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Producción de alimentos de origen animal en México. ....	4
Cuadro 2. Agente causal de diarreas en becerras. ....	7
Cuadro 3. Comparación del efecto del suministro de probióticos en becerros. ....	11
Cuadro 4. Contenido de inulina en base fresca (BF) en diversas plantas y grado de polimerización (GP). ....	13
Cuadro 5. Características de la inulina con base al grado de polimerización. ....	16
Cuadro 6. Estudios de inulina como prebiótico en animales. ....	23
Cuadro 7. Secuencias de los iniciadores para amplificar el gen 16S rADN. ....	27
Cuadro 8. Bacterias con potencial probiótico. ....	28
Cuadro 9. Composición del medio de cultivo líquido. ....	29
Cuadro 10. Tratamientos experimentales. ....	30
Cuadro 11. Población bacteriana a 12 h de reactivación. ....	31
Cuadro 12. Tiempos de lectura de absorbancia y siembra en placa para estimar poblaciones bacterianas. ....	32
Cuadro 13. Lecturas de absorbancia a tiempo final y población bacteriana al término de la fase exponencial (TFE). ....	42
Cuadro 14. Población bacteriana al inicio y al término de la fase exponencial (IFE, TFE, respectivamente) y tiempo de generación. ....	45
Cuadro 15. Lecturas de pH a tiempo inicial, inicio de la fase exponencial (IFE), término de la fase exponencial (TFE) y tiempo final de incubación. ....	47
Cuadro 16. Producción de ácido láctico a tiempo inicial, inicio de la fase exponencial (IFE), término de la fase exponencial (TFE) y tiempo final de incubación. ....	49
Cuadro 17. Producción de amonio al término de la fase exponencial (TFE) y a tiempo final de incubación. ....	50
Cuadro 18. Población bacteriana al término de la fase de crecimiento exponencial (TFE),	

células expuestas a ácido clorhídrico (pH 4) y sales biliares (0.3% p/v) y porcentaje de supervivencia. ....	52
Cuadro 19. Inhibición de bacterias enteropatógenas.....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la inulina. ....	14
Figura 2. Proceso industrial para la obtención de inulina a partir de achicoria. ....	17
Figura 3. Crecimiento de <i>Lactobacillus salivarius</i> (Ls), <i>Enterococcus faecium</i> (Ef) y <i>Lactobacillus casei</i> (Lc) en monocultivo en medio MRS-glucosa (a) y MRS- inulina (b) y en cocultivo en medio MRS-inulina (c). ....	41
Figura 4. Población bacteriana al inicio y término de la fase de crecimiento exponencial (IFE, TFE, respectivamente). ....	46

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de alimentos en México y su crecimiento depende de la disponibilidad nacional de leche. Según cifras del SIAP-SAGARPA (SE, 2012), durante el período 2003-2011 la producción nacional de leche de bovino ha tenido una tasa media de crecimiento de 1.3%, comparado con el aumento del consumo a tasa media anual de 2.4% (Brambila *et al.*, 2013) no cubre la demanda del producto, y se recurre a la importación.

Para que la industria lechera supere el déficit de producción y sea una actividad sustentable, se vuelve prioritaria la implementación de prácticas estratégicas que permitan alcanzar los objetivos de producción a través del manejo de los animales, así como la necesidad de encontrar alternativas para reemplazar las fuentes de alimento para animales, por otras con características nutricionales semejantes.

Las prácticas pecuarias (destete precoz, uso de sustituto de leche, cambio abrupto de dieta) son utilizadas con el objetivo de hacer eficiente el ciclo de recría. Esto tiene implicaciones en la salud de los lactantes provocando alteraciones digestivas y metabólicas debido a que el organismo es susceptible a enteropatógenos que provocan principalmente diarreas (Masanetz *et al.*, 2011). El uso de antibióticos a la par del proceso de destete se ha convertido en una práctica complementaria (Verdonk *et al.*, 2005), pero su uso indiferenciado ha provocado problemas de salud pública con residuos químicos en productos para consumo humano y resistencia bacteriana generada por las dosis utilizadas (Windschitl *et al.*, 1991; Donovan *et al.*, 2002).

Alternativas con las cuales se busca hacer eficientes los procesos dentro del organismo del animal y minimizar el estrés generado de las prácticas pecuarias incluyen el uso de productos biotecnológicos tales como enzimas, ionóforos, levaduras, hormonas, probióticos y prebióticos.

Diversos estudios han documentado el uso de probióticos y prebióticos para estimular el funcionamiento normal del tubo digestivo en las diferentes especies, encontrando resultados variados. Galvão *et al.* (2005) y Magalhães *et al.* (2008) reportan diferencia en días con diarrea en becerros, debido al uso de *Saccharomyces cerevisiae*; en contraste a lo reportado por Lesmeister *et al.* (2004) quienes no encontraron efecto en incidencia de diarreas. Por su parte, Khuntia y Chaudhary (2002) y Nagashima *et al.* (2010) encontraron que la adición de *Lactobacillus* disminuye la incidencia de diarreas, pero Kowalski *et al.* (2009) no encontraron efecto en la salud intestinal e incidencias de diarrea cuando se incluyó a *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* en la dieta. Los estudios anteriores no son concluyentes sobre el efecto de microorganismos como probiótico.

La inulina se ha descrito como prebiótico debido a los beneficios que otorga al organismo que lo consume (Gibson y Roberfroid, 1995). Diversos estudios (Desai *et al.*, 2004; Kunová *et al.*, 2011; García *et al.*, 2012) describen un efecto benéfico de la inulina sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias ácido lácticas de interés en salud humana. Donovan *et al.* (2002) y Verdonk y van Leeuwen (2004) describen el uso de inulina en becerros destetados precozmente con efecto similar al uso de antibiótico.

La evidencia indica un efecto estimulante de la inulina sobre la flora benéfica del tubo digestivo; sin embargo, se requieren estudios donde se evalué el efecto prebiótico que otorga la inulina a los microorganismos deseables en el intestino de becerros lactantes.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

La contribución del sector agropecuario al Producto Interno Bruto (PIB) nacional ha disminuido hasta representar el 3.8% en 2011. Comparado con otros países de América Latina, el progreso del sector agropecuario en los últimos 10 años ha estado por debajo del conjunto de la región (SE, 2012).

Ante este panorama, se recurre a la importación de productos primarios de abasto como leche, carne y cereales, y si bien las compras de alimentos en el exterior no parecen ser un problema en términos financieros, una política de seguridad alimentaria que sea viable económica, social y ambientalmente, precisa definir el grado de autonomía que se pretende alcanzar para mantener disponibilidad de alimentos (FAO, 2013).

### **2.1. Sector lechero en México**

Según datos del SIAP-SAGARPA publicados por la FAO (2013), en el periodo 1990-2011 el valor de la producción de alimentos de origen animal con respecto al componente agrícola ha tenido mayor tasa de crecimiento anual (3.3% vs. 1.5%). Sin embargo, el desarrollo pecuario está basado en el dinámico crecimiento del sector avícola (Cuadro 1).

En cuanto a producción de leche en México, en 2012 se produjo cerca de 10,950 millones de litros, lo que se describe como un aumento del 60% en los últimos 20 años. Este avance se logró con base en las mejoras en el equipamiento de las unidades de producción, así como la aplicación de técnicas en el manejo del ganado y selección de razas especializadas para producción de leche (FAO, 2013).

**Cuadro 1. Producción de alimentos de origen animal en México.**

Periodo	Miles de toneladas					Tasa de crecimiento (%)	
	1990-1992	1995-1997	2000-2002	2005-2007	2009-2011 <sup>a</sup>	1990-2000	2000-2011
Carne bovina	1,183	1,361	1,440	1,602	1,751	2.0	1.8
Carne porcina	796	924	1,053	1,121	1,180	2.8	1.0
Carne de ave	836	1,330	1,968	2,503	2,708	8.9	2.9
Leche <sup>b</sup>	6,743	7,739	9,620	10,266	10,813	3.6	1.1
Huevo	1,104	1,296	1,860	2,202	2,400	5.4	2.3

a. Datos preliminares

b. Millones de litros

FAO, 2013.

Durante el período 2003-2011 la producción nacional de leche de bovino ha tenido una tasa media de crecimiento de 1.3%, mientras el consumo de lácteos aumenta a tasa media anual de 2.4% (Brambila *et al.*, 2013) como consecuencia de un mayor ritmo de crecimiento poblacional y mayor consumo per cápita; debido al aumento del poder adquisitivo y a un cambio en los hábitos de consumo hacia productos que contribuyan a mejorar las condiciones de salud (SE, 2012).

### 2.1.1. Panorama de la producción de leche en México

El alza registrada en los precios internacionales de la leche en el periodo de 2006-2008 ha resultado en mayor demanda de producción nacional de leche fresca por parte del mercado interno y representa un panorama alentador para los productores. La expansión actual de la demanda de productos lácteos para el consumo humano conlleva importantes consecuencias tecnológicas y estructurales para dicho sector. Es necesario



aumentar la productividad ganadera para poder satisfacer la demanda de los consumidores, utilizar eficazmente los recursos y generar ingresos estables para la población dedicada a esta actividad pecuaria (SE, 2012).

Sin embargo, en México la crianza de becerras y vaquillas de reemplazo para producción de leche es insuficiente para mantener y hacer crecer el hato lechero nacional, uno de los principales retos a superar es el desabasto en la recría, siendo este proceso afectado por situaciones de estrés generadas del mal suministro de calostro, alimentación con sustitutos de leche de baja calidad y cambios abruptos en la dieta, en un momento en el que el organismo es susceptible (Bicknell y Noon, 1993; Soto *et al.*, 2011).

## **2.2. Cría de reemplazos**

Las becerras son sensibles a las condiciones de alimentación durante su vida temprana. En México debido al déficit de producción de leche es común la crianza artificial de las becerras para reemplazo. Se plantea, como práctica generalizada, alimentar a base de sustitutos de leche complementado con alimento concentrado desde la primera semana de vida y destetar a partir de la quinta semana de edad (destete precoz) (Ramos *et al.*, 2013). Sin embargo este manejo conlleva el uso de antibiótico como medida preventiva debido al estrés sometido a un organismo con sistema inmune no desarrollado.

### **2.2.1. Sistema digestivo de bovinos neonatos**

El tubo digestivo de la becerria recién nacida es estéril, y es de vital importancia para su rendimiento futuro lograr un suministro de calostro de alta calidad, al parejo de la ingesta del calostro, la flora bacteriana comienza la colonización intestinal. Durante la lactancia la alimentación de las becerras se da con el paso de la leche directo al abomaso a través de la canaladura esofágica; se comportan como no rumiantes debido al poco desarrollo del rumen. La digestión se da principalmente a base de la secreción de jugos gástricos en el abomaso y a la degradación enzimática en la primera porción del intestino

delgado (Gasque, 2008).

La colonización del intestino por parte de la flora bacteriana se da por el contacto del neonato con el canal de parto, el contacto materno y también al momento del amamantamiento (calostro-leche); siendo las bacterias ácido lácticas (BAL) como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* las especies dominantes durante la alimentación basada en leche, y las cuales se consideran benéficas, ya que debido al tipo de fermentación que realizan y a los productos finales de la fermentación, ejercen un efecto inhibitorio contra bacterias patógenas presentes en el intestino de lactantes (Andoh y Fujiyama, 2006; Smetanková *et al.*, 2012).

### **2.2.2. Rumiante**

Una becerra no debe ser destetada hasta que su rumen sea funcional y sea capaz de mantener sus necesidades nutricionales mediante los productos finales de la fermentación ruminal. Las bacterias, protozoarios y hongos del rumen, se establecen de forma natural mediante el consumo de alimento sólido y la interacción con animales adultos; y los productos de la fermentación de carbohidratos (ácidos grasos volátiles) actúan como estimuladores y promotores del desarrollo y función de las papilas ruminales. Una vez colonizado el rumen, la nutrición del rumiante dependerá en mayor grado de la fermentación ruminal y de los productos generados de dicha fermentación: energía de los ácidos grasos volátiles, proteína de origen bacteriano, vitaminas del complejo B (Wattiaux, s.f).

### **2.3. El problema de la diarrea en becerras lactantes**

En EU la mortalidad de becerras de razas lecheras se mantiene a tasa de 11% dentro las 48 h de vida y en 9.6% después de 48 h hasta llegar a reemplazo (Wilson, 2009). A nivel mundial se estima que cerca del 25% de las becerras sufre diarrea y el 23% de las becerras afectadas muere, esto representa entre 50% y 60% de muertes debido a

problemas de diarrea (NDHEP, 1994; Kehoe y Heinrichs, 2005; Lorenz *et al.*, 2011). En lo económico, este problema tiene un impacto alto, ya que se generan pérdidas por la muerte de las becerras, gastos por tratamientos y personal, disminución del potencial productivo y pérdida de reemplazos (Kehoe y Heinrichs, 2005; Hassanpour *et al.*, 2007; Millemann 2008; Lorenz *et al.*, 2011).

En México la muerte de becerras impacta en el desabasto de recría de ganado lechero y en el déficit de producción de leche, y no se logra producir suficientes vaquillas de reemplazo para mantener el hato nacional ya que se tiene alrededor de 25% de desecho en los hatos lecheros (Vitela *et al.*, 2004).

Ocampo *et al.* (2010) describen la etiología de las enfermedades diarreicas multifactorial; siendo *E. coli*-serotipo enterogénico K99+ (Constable, 2004), *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* tipo B y C las bacterias patógenas con mayor incidencia y mayor tasa de mortalidad; además de rotavirus, coronavirus, el parásito *Cryptosporidium*, *Coccidia* y anomalías nutricionales los factores comunes que la desencadenan (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Agente causal de diarreas en becerras.**

Agente	Edad becerras (días)	Morbilidad	Mortalidad
<i>Escherichia coli</i>	1-7	Alta	Alta
<i>Clostridium perfringens</i>	7-28	Baja	Alta
<i>Salmonella</i> spp.	10-90	Variable	Alta
<i>Rotavirus</i>	4-21	Alta	Baja
<i>Coronavirus</i>	4-18	Alta	Media
<i>Cryptosporidium</i>	7-30	Alta	Baja
<i>Coccidia</i>	> 21	Alta	Baja

Se ha recurrido al uso indiscriminado de antibiótico como medida de manejo ante esta problemática, causando problemas de resistencia bacteriana y residuos químicos en productos para consumo humano (Windschitl *et al.*, 1991; Donovan *et al.*, 2002; Verdonk *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2009). Se requieren alternativas para atacar el problema de diarrea en becerras que dejen de lado el uso de antibiótico y den un giro hacia medidas naturales en el manejo del problema.

### **2.3.1. Bacterias ácido lácticas como antagonistas de enteropatógenos**

Se ha reportado que las bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de inhibir el crecimiento de enteropatógenos como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* (Flickinger *et al.*, 2003; Bosscher *et al.*, 2006), causantes de diarreas en becerras. Las BAL generan ambientes poco favorables para el crecimiento de microorganismos patógenos. Debido a su acentuada capacidad antagónica se agrupan dentro de los alimentos funcionales ya que son capaces de generar un efecto benéfico sobre una o más funciones específicas en el organismo huésped, más allá de los efectos nutricionales habituales (Roberfroid, 2000; Guevara, 2011).

### **2.4. Biotecnología aplicada a la nutrición animal**

La biotecnología se puede definir como un conjunto de técnicas en las que se utilizan organismos vivos, partes de ellos o moléculas derivadas de organismos vivos para fabricar o modificar productos con un propósito específico. El objetivo principal de las biotecnologías relacionadas con la producción animal es aumentar la eficiencia, contribuyendo de ese modo a aumentar la producción del sector pecuario (SE, 2012).

En el campo de la nutrición animal se están estudiando aplicaciones de productos biotecnológicos para mejorar el rendimiento y hacer eficientes los procesos dentro de los organismos. Los prebióticos y probióticos son utilizados como una medida natural para controlar microorganismos intestinales patógenos o aumentar la resistencia de los

animales a éstos (Guevara, 2011).

#### **2.4.1. Los probióticos y prebióticos**

La FAO y la OMS describen a los probióticos como microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del huésped. Se puede señalar que la ingestión de probióticos favorece la composición y actividad de la flora normal del intestino e indirectamente modifican y favorecen el estado de salud del huésped (De las Cagigas y Blanco, 2002), de la manera siguiente:

- a) Competencia por la adhesión en los receptores del epitelio intestinal y competencia por nutrientes;
- b) Producción de sustancias antibacterianas;
- c) Estimulación de la inmunidad.

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan benéficamente al huésped mediante la estimulación selectiva de un número limitado de especies bacterianas en el colon las cuales inducen efectos benéficos para la salud (De las Cagigas y Blanco, 2002; Bosscher *et al.*, 2006). La eficacia de un prebiótico debe mostrar varias características:

- a) No deben ser hidrolizados ni absorbidos en estómago ni intestino delgado;
- b) Su fermentación debe ser selectiva por la flora intestinal;
- c) Estimular el crecimiento y/o actividad de un número limitado de bacterias benéficas;
- d) Inducir efectos benéficos para la salud del huésped.

#### **2.4.2. Uso de probióticos en becerros**

El comportamiento animal en respuesta a la adición de probióticos a la dieta ha proporcionado resultados variables expresados en los parámetros productivos; esto puede deberse a la diferencia en las cepas usadas, cantidad de dosis, uso de antibióticos,

composición de la dieta, estrategias de alimentación e interacción con otros aditivos alimenticios en la ración diaria (Bazay, 2010).

Estudios como el de Nagashima *et al.* (2010) reportan diferencias en la presencia de diarreas en becerros suplementados con  $2 \cdot 10^9$  UFC de *Lactobacillus plantarum* cepa Hokkaido con respecto al grupo testigo. Khuntia y Chaudhary (2002) reportan el mismo efecto benéfico al adicionar a la dieta  $100 \text{ mL dia}^{-1}$  de leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* y *L. jugarti* en concentración de  $10^7$ - $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ; esto contrasta con lo reportado por Cruywagen *et al.* (1996), quienes indican que no hay efecto de la suplementación de  $2 \text{ mL dia}^{-1}$  de  $5 \cdot 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  *Lactobacillus acidophilus* sobre la ganancia final de peso de becerros, pero si sobre la salud sin pérdida de peso las dos primeras semanas del estudio. Kowalski *et al.* (2009) no encontraron diferencias en consistencia de heces ni salud de becerros con el uso de esporas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*;  $1.32 \cdot 10^9$  y  $1.13 \cdot 10^9$  UFC  $\text{kg}^{-1}$  de alimento, respectivamente; pero si una mayor ganancia en 2 kg. Galvão *et al.* (2005) reportan diferencia en días con diarrea debido al uso de  $0.5 \text{ g dia}^{-1}$  ( $10 \cdot 10^9$  UFC) de *Saccharomyces cerevisiae* en la alimentación de becerros y coincide con Magalhães *et al.* (2008) quienes utilizaron *Saccharomyces cerevisiae* al 2% de materia seca del alimento y reportan menor intensidad en la diarreas, disminuyendo mortalidad, en contraste a lo reportado por Lesmeister *et al.* (2004) quienes utilizaron 1% y 2% de materia seca del alimento de *Saccharomyces cerevisiae* y no encontraron efecto en incidencia de diarreas, pero si mayor consumo y mayor altura de los animales al término del estudio.

**Cuadro 3. Comparación del efecto del suministro de probióticos en becerros.**

Autor (Año)	Probiótico/dosis	Efecto
Cruywagen <i>et al.</i> (1996)	<i>L. acidophilus</i> 2 mL día <sup>-1</sup> de 5*10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	Sin pérdida de peso las dos primeras semanas
Khuntia y Chaudhary (2002)	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> y <i>L. jugarti</i> 100 mL día <sup>-1</sup> leche fermentada 10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	Disminución en la incidencia de diarreas
Lesmeister <i>et al.</i> (2004)	<i>S. cerevisiae</i> 1% y 2% materia seca del alimento	Sin efecto en incidencia de diarreas
Galvão <i>et al.</i> (2005)	<i>S. cerevisiae</i> 0.5g 10*10 <sup>9</sup> UFC d <sup>-1</sup>	Diferencia en días con diarrea
Magalhães <i>et al.</i> (2008)	<i>S. cerevisiae</i> 2% materia seca del alimento	Menor intensidad en las diarreas, disminución en tasa de mortalidad
Kowalski <i>et al.</i> (2009)	<i>B. licheniformis</i> y <i>B. subtilis</i> (esporas) 1.32*10 <sup>9</sup> y 1.13*10 <sup>9</sup> UFC kg <sup>-1</sup> de alimento	Sin diferencia en consistencia de heces ni en salud de becerros
Nagashima <i>et al.</i> (2010)	<i>L. plantarum</i> 2*10 <sup>9</sup> UFC d <sup>-1</sup>	Disminución en la incidencia de diarreas

## **2.5. Inulina**

La inulina es un oligosacárido presente en la raíz de los vegetales entre los que destacan el ajo, cebolla, achicoria y agave. Este producto se considera el principal carbohidrato de reserva de energía en aproximadamente 36 mil especies de plantas (Niness, 1999; Roberfroid, 2000). Por su estructura química es altamente soluble en agua por lo que puede ser ingerida disolviéndose en agua, jugo o alimentos. Actualmente la inulina se utiliza como alimento funcional ya que ayuda a mejorar la digestión y a controlar algunos factores como la glucosa y el colesterol, además de tener impacto positivo en la flora intestinal. En el Cuadro 4 se describen plantas que contienen cantidades significativas de inulina.

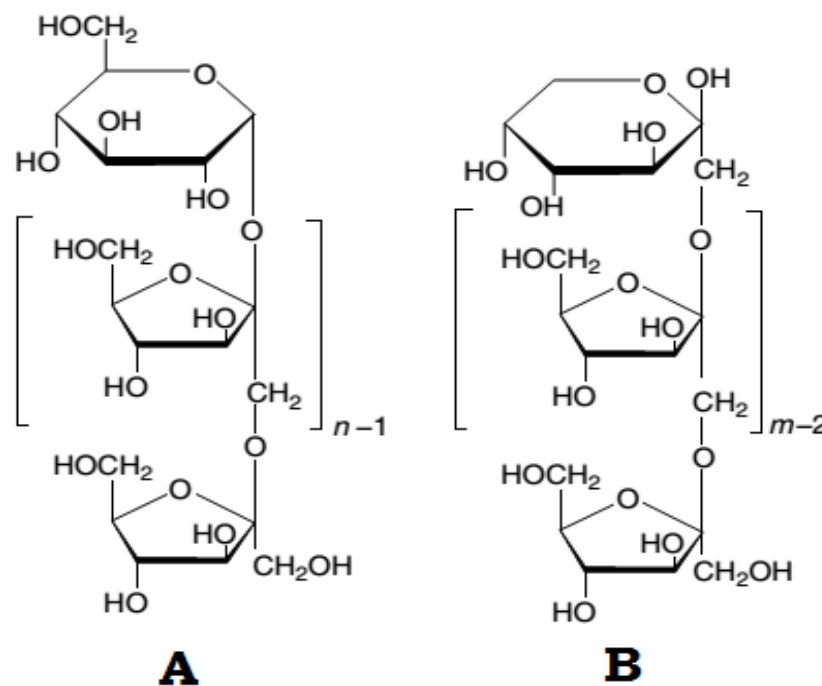


**Cuadro 4. Contenido de inulina en base fresca (BF) en diversas plantas y grado de polimerización (GP).**

Planta	Inulina (g*100gr <sup>-1</sup> BF)	Grado de Polimerización (GP)
Alcachofa ( <i>Cynara scolymus</i> )	2-7	GP ≥ 5 = 95% GP ≥ 40 = 87%
Banana ( <i>Musa cavendishii</i> )	1	GP < 5 = 100%
Cebada-granos tiernos ( <i>Hordeum vulgare</i> )	22	
Achicoria ( <i>Cichorium intybus</i> )	15-20	GP = 2-65 GP < 40 = 83% GP ≥ 40 = 17%
Diente de león-hojas ( <i>Taraxacum officinale</i> )	12-15	
Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	13	GP ≥ 5 = 75%
Topinambur o papa de Jerusalén ( <i>Helianthus tuberosus</i> )	17-20.5	GP = 2-50 GP < 40 = 94% GP ≥ 40 = 6%
Puerro ( <i>Allium ampeloprasum</i> )	3-10	GP = 12
Cebolla ( <i>Allium cepa</i> )	1-7.5	GP = 2-12
Escorzonera ( <i>Scorzonera hispanica</i> )	20	GP ≥ 5 = 75%
Trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	1-4	GP ≤ 5 = 50%

Van Loo *et al.*, 1995.

Estructuralmente, la inulina es un carbohidrato que consiste de enlaces  $\beta$ ,1-2 fructosil-fructosa. El término fructano se usa para denominar este tipo de compuestos. Existen dos posibilidades de encontrar la estructura de la inulina: a) tipo GF, con una terminación en una molécula de glucosa unida por un enlace  $\alpha$ ,1-2 (residuo D-glucopiranosil, como la sacarosa; Figura 1A; y b) tipo F, el monómero terminal es un residuo  $\beta$ -D-fructopiranosil; Figura 1B (Flamm *et al.*, 2001; Franck, 2002; Roberfroid, 2005; Roberfroid, 2007; Madrigal y Sangronis, 2007; Chi *et al.*, 2011; Apolináro *et al.*, 2013).



**Figura 1. Estructura de la inulina.** A: Monómero residual D-glucopiranosil y B: Monómero residual  $\beta$ -D-fructopiranosil (Flamm *et al.*, 2001; Madrigal y Sangronis, 2007).

La inulina es una mezcla de oligo y polisacáridos compuestos por unidades de fructosa con configuración  $\beta$  en el carbono 2-anomérico. Estos enlaces hacen que la inulina sea resistente a la hidrólisis por enzimas digestivas intestinales. En las plantas la inulina incorpora de 2 a 100 unidades de fructosa, con grado de polimerización variable dependiendo de la especie de extracción, las condiciones meteorológicas y de cultivo, madurez de la planta al momento de la cosecha y el tipo de almacenamiento en postcosecha (Chi *et al.*, 2011; Apolináro *et al.*, 2013). Se consideraba a la inulina vegetal

como una molécula lineal, pero recientemente se demostró que la inulina extraída de achicoria nativa presenta cierto grado de ramificación en su composición molecular (Roberfroid, 2005). La inulina se hidroliza con endo y exoinulinasas, las exoinulinasas ( $\beta$ -D-fructohidrolasas, EC 3.2.1.80) hidrolizan los residuos de fructosa terminales del extremo no reductor de la cadena y las endoinulinasas (2,1- $\beta$ -D fructan fructanohidrolasas, EC 3.2.1.7) hidrolizan los enlaces internos (Chi *et al.*, 2011; Apolináro *et al.*, 2013).

El grado de polimerización y las ramificaciones son propiedades que influyen en la funcionalidad de la inulina (Cuadro 5). La fracción de cadena corta (oligofructosa) es más soluble y dulce que las de cadena larga (Inulina e inulina HP). La fracción de cadena larga (inulina HP) es menos soluble, más viscosa y termoestable que la cadena media (inulina). La inulina modifica propiedades sensoriales y reológicas (fluidez-viscosidad) como sustituto de grasa formando microcristales que interactúan en la textura cremosa y genera una sensación similar a la grasa (Frank, 2002; Apolináro *et al.*, 2013).

**Cuadro 5. Características de la inulina con base al grado de polimerización.**

	Oligofruktosa	Inulina estándar	Inulina HP (cadena larga)
Estructura química	$GF_n + F_n$ ( $2 \leq n \leq 7$ )	$GF_n$ ( $2 \leq n \leq 60$ )	$GF_n$ ( $10 \leq n \leq 60$ )
Grado medio de polimerización	4	12	25
Materia seca (%)	95	95	95
Contenido Inulina/oligofruktosa (%MS)	95	92	99.5
Contenido de azúcar (%MS)	5	8	$\leq 0.5$
pH (10% v/v)	5-7	5-7	5-7
Cenizas sulfatadas (%MS)	$< 0.2$	$< 0.2$	$< 0.2$
Metales pesados (ppm MS)	$< 0.2$	$< 0.2$	$< 0.2$
Apariencia		Polvo blanco	
Sabor	Moderadamente dulce	Neutro	Neutro
Dulzura (sucrosa =100%)	35%	10%	Sin dulzura
Solubilidad en agua a 25 °C (g/L)	$> 750$	120	25
Viscosidad en agua (5%) a 10 °C	$< 1$	1.6	2.4
Funcionalidad en alimentos	Sustituto de azúcar	Sustituto de grasa	
Sinergismo	Sinergismo con edulcorantes	Sinergismo con agentes gelificantes	

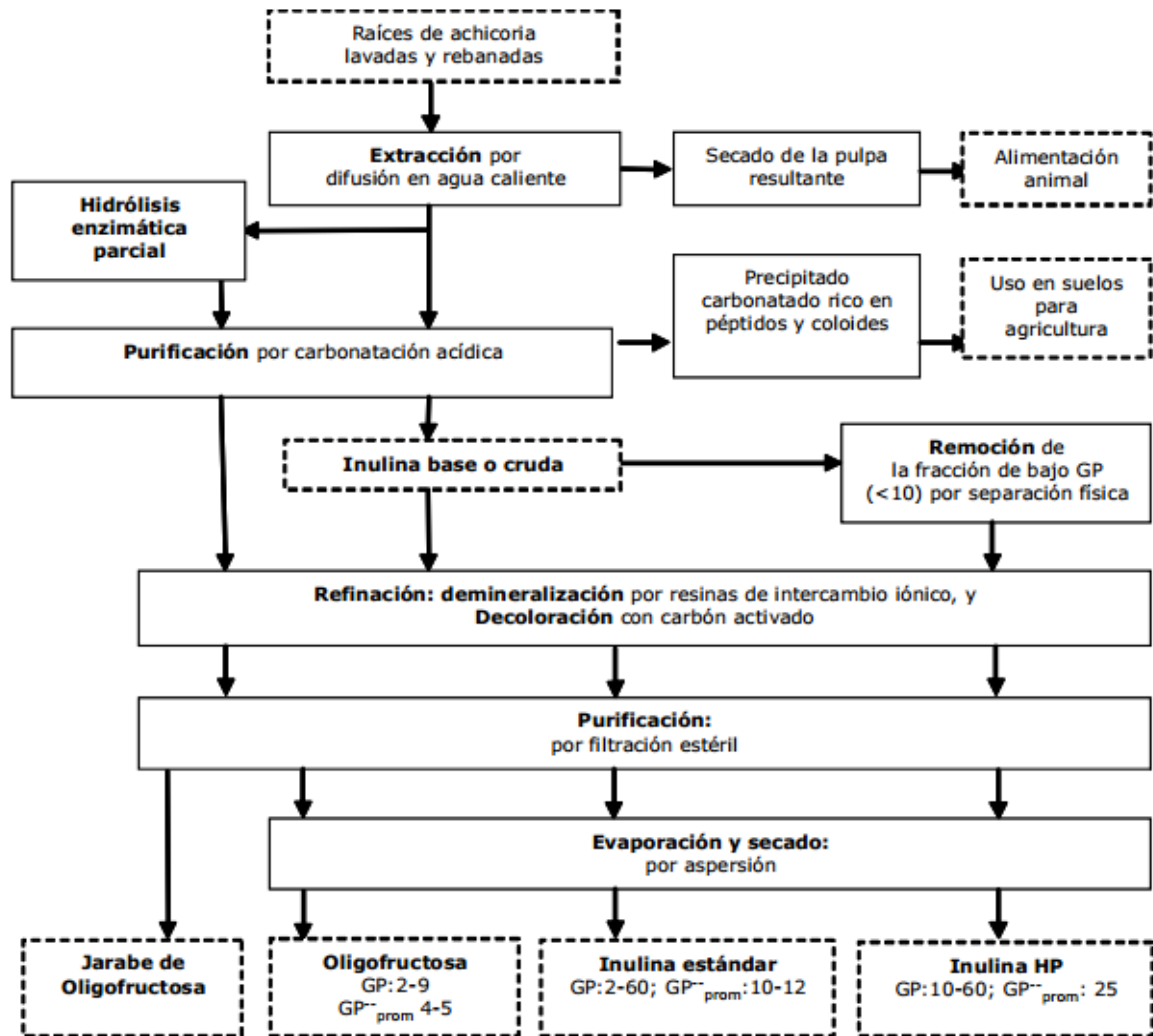
HP. (High Polimerization) Alto grado de polimerización

GF. Monómero residual D-glupiranosil; F. Monómero residual  $\beta$ -D-fructopiranosil

Franck, 2002.

De manera industrial se obtiene para usarla como suplemento dietético a partir de la achicoria, la extracción se hace por difusión en agua caliente; de manera similar al de la sacarosa de la remolacha azucarera, seguido por el refinado utilizando tecnologías de la industria del azúcar y almidón, evaporación y pulverización (Franck, 2002; Madrigal y Sangronis, 2007;

).



**Figura 2. Proceso industrial para la obtención de inulina a partir de achicoria (Madrigal y Sangronis, 2007).**

### 2.5.1. La inulina como prebiótico

En diversas investigaciones se confirmó que la inulina es un compuesto prebiótico de eficacia mayor (Gibson, 1999; Bosscher *et al.*, 2006; Roberfroid, 2007). La inulina y oligofructosa como prebióticos se fermentan en el colon donde promueven el crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a un ambiente sano para el colon. Esta estimulación se produce porque los fructanos son fermentados fácilmente por dichas bacterias y no son utilizados eficazmente por bacterias patógenas. Las bifidobacterias, lactobacilos y eubacterias son consideradas flora benéfica en el colon. Las bacterias ácido

lácticas se identificaron como un factor de resistencia natural contra microorganismos potencialmente patógenos y se asocian con la reducción susceptible a enteropatógenos y enfermedades intestinales (Flickinger *et al.*, 2003).

### **2.5.2. Uso de inulina en humanos**

En humanos el uso de inulina como prebiótico siempre está ligado al uso conjunto con oligofruktosa por el sinergismo que presentan debido al grado de polimerización de ambos productos. Se han asociado propiedades fisiológicas al uso de inulina y oligofruktosa como la modificación favorable de la microflora del colon, disminución de pH en colon, producción de nutrientes como vitaminas del complejo B, aumento en la absorción de minerales (hierro, calcio y magnesio), efecto beneficioso sobre el metabolismo de lípidos y carbohidratos y reducción de riesgo de cáncer (Kiss y Forgo, 2011).

Las cualidades como prebiótico de la inulina y oligofruktosa están establecidas, existen estudios donde se estimuló el crecimiento de lactobacilos, bifidobacterias y en menor grado *Clostridium coccides* y *Eubacterium rectale* que son productores de butirato en el colon. Las bifidobacterias y lactobacilos colonizan superficies del intestino grueso como la mucosa o regiones del lumen que realizan acciones de protección del epitelio de la mucosa (Roberfroid, 2007).

Experimentos *in vitro* han demostrado que las bifidobacterias y lactobacilos como *Lactobacillus plantarum* crecen en medios de cultivo con inulina como únicas fuentes de carbono (Gibson y Roberfroid, 1995; Kaplan y Hutkins, 2000; Rossi *et al.*, 2005; Nazzaro *et al.*, 2012b). El crecimiento de bifidobacterias en inulina se demostró por primera vez en 1993 por Wang y Gibson. Un aumento en la población de estas bacterias se mostró cuando se adiciono inulina al medio, pero no cuando se usaron otros carbohidratos como pectinas, polidextrosa o almidón. A la par se reportó una disminución paralela de agentes patógenos fecales, bacteroides, clostridios y coliformes. Las bacterias ácido lácticas

tienen una enzima  $\beta$ -fructofuranosidasa inducible capaz de hidrolizar enlaces  $\beta$ ,2-1 glicosídicos. Los lactobacilos sintetizan fructosidasas que hidrolizan restos de fructosa permitiéndoles degradar y metabolizar la inulina eficientemente (Bosscher *et al.*, 2006).

Se han reportado efectos antagonistas de bifidobacterias o lactobacilos cuando se cocultivan *in vitro* con enteropatógenos como *E. coli*, *Campylobacter jejuni* y *Salmonella enteritidis* en medios con inulina. Las bacterias productoras de ácido láctico tiene actividad antibacteriana contra patógenos por la producción de ácidos orgánicos que acidifican el medio y el pH bajo permite el crecimiento de estas bacterias pero no las patógenas (Bosscher *et al.*, 2006).

Las especies de bifidobacterias humanas que tienen la capacidad de usar inulina y sus derivados son *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentes*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. pseudocatenulatum*, en contraste *B. bifidum* no tienen la capacidad de fermentar dichos fructanos (Biedrycka y Bielecka, 2004).

Las especies de lactobacilos que se ha documentado tienen la capacidad de utilizar inulina como fuente de energía son *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. bulgaricus* (Kaplan y Hutkins, 2000; Desai *et al.*, 2004; Kunová *et al.*, 2011).

### **2.5.3. Uso de inulina en animales**

El destete en cerdos es una etapa estresante que provoca bajo consumo de alimento, cambios morfológicos e histológicos del intestino delgado, mala digestión y absorción de alimentos, proliferación de bacterias que provocan enterotoxemia causando diarreas. El uso de inulina como complemento en las dietas de destete reducen el impacto de la transición, al propiciar el incremento de bifidobacterias y lactobacilos que disminuyen los patógenos intestinales como *E. coli*. La suplementación de inulina en la dieta o agua de bebida se tradujo en menor número de casos con diarrea y reducción de mortalidad en comparación con los grupos testigo (Verdonk *et al.*, 2005).

Konstantinov *et al.* (2003; según Verdonk *et al.*, 2005) estudiaron los cambios en el tiempo de la predominancia de las comunidades bacterianas fecales en el destete de cerdos alimentados con dietas que contenían inulina y/o pulpa de remolacha azucarera utilizando electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante para analizar y describir la diversidad microbiana en ecosistemas complejos. Los cerdos alimentados con la dieta que contenía pulpa de remolacha (10 g Kg<sup>-1</sup>) o inulina más pulpa (2.5 5 g Kg<sup>-1</sup>) mostraron mejor diversidad bacteriana y una rápida estabilización de la comunidad bacteriana comparada con los animales testigo.

Verdonk *et al.* (2005) describen las diversas investigaciones *in vitro* que demuestran que la inulina afecta la cinética de fermentación cuando se usa como sustrato o afecta el inóculo cuando se incluye en la dieta. Además reduce la adherencia de *E. coli* en el yeyuno y de *Salmonella* spp. en el íleon (Naughton *et al.*, 2001; según Verdonk *et al.*, 2005).

Los estudios en cerdos canulados referentes al incremento de la absorción de minerales por efecto de la suplementación con inulina y/o oligofruktosa indican que no existe efecto. La suplementación con 60 g inulina Kg<sup>-1</sup> no afectó la absorción y retención de calcio, fósforo, magnesio, zinc en íleon. Otro estudio donde utilizaron oligofruktosa a 10 y 40 g Kg<sup>-1</sup> no presentó diferencias en la absorción de calcio, fósforo y magnesio en íleon, pero sí hubo una diferencia significativa en la digestibilidad de cobre y absorción de zinc cuando se suplementó con 40 g de oligofruktosa (Flinkinger *et al.*, 2003).

La alimentación con inulina y derivados es una estrategia práctica para el control de bacterias patógenas en pollos. Investigaciones sobre la colonización de patógenos (*Salmonella* spp. y *Campylobacter jejuni*) en ciegos usando inulina sola o en combinación con probióticos en pollos de engorda se concluye que este tipo de suplementación restringe la colonización de bacterias patógenas (Verdonk *et al.*, 2005).

Verdonk *et al.* (2005) mencionan que varios autores evaluaron el efecto de la



suplementación de inulina en la colonización y difusión de patógenos. En un estudio realizado por Verdonk y van Leeuwen (2004), se evaluó el efecto de la inclusión de 20 g de inulina  $\text{Kg}^{-1}$  de alimento en la colonización y desprendimiento de *S. typhimurium* y *C. jejuni* en pollos de engorda. Se evaluó el efecto de adicionar la inulina en cuatro niveles de inclusión en la aparición de lesiones causadas por *Eimeria acervulina* y *Clostridium perfringens*, concluyendo que la inulina estimuló el rendimiento de los pollos, pero no afectó la colonización y desprendimiento de *S. typhimurium* y *C. jejuni* o la aparición de lesiones por *E. acervulina* y *C. perfringens*.

En rumiantes la fermentación ocurre en el rumen donde predominan bacterias celulolíticas y sacarolíticas que fermentan los fructanos. En heces predominan *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Clostridios*, *Lactobacillus* y *E. coli*, de modo que las diferencias en las poblaciones microbianas y estructuras del tubo digestivo se deben considerar cuando se analiza el uso de inulina como prebiótico en rumiantes (Flinkinger *et al.*, 2003).

Verdonk y van Leeuwen (2004), reportan la evaluación de 20 g  $\text{Kg}^{-1}$  de oligofruktosa, inulina, dextrosa o antibiótico en sustitutos de leche durante las primeras 3 semanas a la llegada al corral de engorde, para el rendimiento del peso semanal de terneros, consumo de alimento diario y consistencia de heces. Los resultados indican que la oligofruktosa y el antibiótico presentaron la mejor ganancia de peso, la inulina propició mejor consistencia de heces durante el periodo del experimento, pero la flora fecal es inestable y no hubo efecto en el patrón de población bacteriana en heces.

Kaufhold *et al.* (2000) evaluaron la suplementación de 0 y 10 g de fructanos  $\text{d}^{-1}$  en terneros de 10 semanas de edad y 117 kg de peso. El consumo de alimento fue similar entre grupos, pero el peso de los terneros suplementados tendió a incrementar. Entre sus conclusiones no encontraron efectos estadísticos por la adición de inulina sobre las características metabólicas y endocrinas como la concentración de glucosa, lactato,

triglicéridos e insulina en sangre.

Donovan *et al.* (2002) evaluó el efecto de la sustitución de inulina por antibióticos en terneros alimentados con sustitutos de leche desde el nacimiento hasta 5 semanas de edad. Evaluaron la ganancia de peso, incidencias de diarreas, eficiencia de la alimentación y puntuaciones fecales. Los resultados indicaron que las ganancias de peso, gravedad de las diarreas y eficiencias de alimentación no presentaron diferencias entre tratamientos. Concluyeron que los antibióticos presentes en los sustitutos de leche se pueden reemplazar con compuestos que actúan como prebióticos como la inulina y sus derivados.

Masanetz *et al.* (2011) evaluaron el efecto de la inulina como sustituto de antibióticos. El efecto de la inulina se evaluó sobre la salud intestinal y constantes hematológicas de terneros. Entre los resultados la inulina redujo significativamente los recuentos de trombocitos en sangre periférica, propició el aumento de la concentración de hemoglobina y hematocrito y redujo proporciones de monocitos.

Flinkinger *et al.* (2003) reportó que la inulina se fermenta más rápido a pH 6 cuando el inóculo proviene de borregos alimentados únicamente con forraje, pero el pH no se ve afectado cuando el inóculo proviene de un borrego alimentado con 50-50% forraje-grano. Mientras que la población bacteriana fecal no se vio afectada dado que la fermentación de la inulina se produjo en rumen.

**Cuadro 6. Estudios de inulina como prebiótico en animales.**

Autor /Año	Especie/Tratamiento	Efecto
Konstantinov <i>et al.</i> (2003)	Destete de cerdos. Pulpa de remolacha (10 g Kg <sup>-1</sup> ) o inulina más pulpa (2.5, 5 g Kg <sup>-1</sup> ).	Aumenta diversidad y estabilización bacteriana.
Naughton <i>et al.</i> (2001)	<i>in vitro</i> tejido de cerdo. 25 g kg <sup>-1</sup> inulina como solución de incubación.	Reduce adherencia de <i>E. coli</i> en yeyuno y de <i>Salmonella</i> spp. en íleon.
Flinkinger <i>et al.</i> (2003)	Cerdos canulados. 40 g de oligofructosa.	Aumenta digestibilidad de cobre y absorción de zinc. Sin efecto en absorción de calcio, fosforo y magnesio.
Bailey <i>et al.</i> (1991); Chambers <i>et al.</i> (1997); Flickinger <i>et al.</i> (2003)	Pollos. Inulina.	Reduce colonización por enteropatógenos.
Verdonk y van Leeuwen (2004)	Pollos de engorda. 20 g de inulina Kg <sup>-1</sup> de alimento.	Aumenta rendimiento. Sin efecto en colonización y desprendimiento de <i>S. typhimurium</i> y <i>C. jejuni</i> o aparición de lesiones por <i>E. acervulina</i> y <i>C. perfringes</i> .
Verdonk y van Leeuwen (2004)	Terneros. 20 g Kg <sup>-1</sup> de OF, inulina o antibiótico en sustituto de leche.	Mejora ganancia de peso y consistencia de heces. Sin efecto en población bacteriana en heces.
Kaufhold <i>et al.</i> (2000)	Terneros. Fructanos 0 y 10 g d <sup>-1</sup> .	Aumenta peso de terneros. Sin efecto en concentración de glucosa, lactato, triglicéridos e insulina en sangre.
Donovan <i>et al.</i> (2002)	Terneros. Inulina y uso de antibiótico.	Sin efecto en ganancia de peso, gravedad de diarreas y eficiencia de alimentación.
Masanetz <i>et al.</i> (2011)	Terneros. Inulina 2% de materia seca.	Aumenta concentración de hemoglobina y hematocrito. Reduce trombocitos y proporciones de monocitos en sangre periférica.
Flinkinger <i>et al.</i> (2003)	Borregos. Inulina.	Sin efecto en población bacteriana fecal, la fermentación se produce en rumen.

Verdonk *et al.*, 2005.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Determinar el potencial de la inulina como estimulante del crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* con capacidad probiótica para rumiantes.

#### 3.2. Objetivos particulares

- Confirmar la identidad de las cepas *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* aisladas de calostro y mucosa oral de becerros mediante técnicas moleculares.
- Comparar el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* en medio de cultivo MRS-glucosa y MRS-inulina.
- Comparar el crecimiento *in vitro* de cocultivos de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* en medio de cultivo MRS-glucosa y MRS-inulina.
- Evaluar la supervivencia de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* cultivadas *in vitro* en medio de cultivo MRS-glucosa y MRS-inulina en resistencia a condiciones de acidez y sales biliares.
- Analizar la actividad *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* a través de la producción de ácido láctico y amonio en medio de cultivo MRS-glucosa y MRS-inulina.
- Evaluar el antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* en medio de cultivo MRS-glucosa y MRS-inulina contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

#### 4. HIPÓTESIS

La adición de inulina estimula el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* con capacidad probiótica para rumiantes.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Nutrición Animal-Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería del Colegio de Postgraduados, carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, Estado de México. La altitud es 2240 m, el clima es templado subhúmedo con lluvias en verano, época seca en invierno, una temperatura promedio anual de 15.2 °C y 650 mm de precipitación promedio anual (García, 1988).

### 5.1. Cepas de bacterias con potencial probiótico

Se evaluó en un sistema *in vitro* el efecto de la inulina en el crecimiento de bacterias con potencial probiótico para rumiantes, clasificadas como bacterias ácido lácticas (BAL). Las bacterias fueron aisladas por Caballero (2014) a partir de muestras de calostro y de mucosa oral de becerros e identificadas mediante el método bioquímico API50 CHL. En este estudio se confirmó su identidad mediante técnicas moleculares. Como control positivo se utilizó *Lactobacillus casei* ATCC donada por la Dra. Blanca E. García Almendarez, Profesor-Investigador del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, DIPA. PROPAC. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

#### 5.1.1. Identificación de las bacterias aisladas de calostro y mucosa oral mediante técnicas moleculares

La extracción de material genómico (ADN) se hizo a partir de cultivos puros de las cepas *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*; y los métodos generales de biología molecular se establecieron según el protocolo de Wizard Genomik DNA Purification (Promega, USA).

El cultivo puro congelado (1.3 mL) se reactivó en 11.7 mL de caldo MRS por 18 h a 37°C y se sembró por estría en agar MRS e incubó por 24 h a 37°C para obtener colonias

aisladas, de las cuales se tomó una muestra con una punta de micropipeta y se colocó en 30  $\mu$ L de amortiguador de lisis contenido en un tubo Eppendorf. Se incubó a 95°C por 5 min, después a 4 °C por 5 min y nuevamente a 95°C por 5 min; se centrifugó a 9391 x g 2 min<sup>-1</sup>, el sobrenadante se colocó en un tubo estéril y se cuantificó la concentración de ADN en el espectrofotómetro Nanodrop (Modelo 2000c, Thermo, USA). Posteriormente, mediante PCR se amplificó el gen 16S rADN, el cual es usado para el análisis e identificación de procariontas. Se utilizó el ADN molde e iniciadores universales 8F y 1492R (Cuadro 7), diseñados para alinear regiones conservadas del gen bacteriano 16S rADN. Se empleó el kit PCR Master Mix.

**Cuadro 7. Secuencias de los iniciadores para amplificar el gen 16S rADN.**

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Tm	GC, %
8F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	20	61.5	50
1492 R	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3'	19	53.7	42.1

El producto de PCR se purificó con el Kit Wizard SV gel and PCR Clean VP-System (Promega, USA) basado en la capacidad del ADN para unirse a membranas de sílice. La minicolumna SV se ensambló y se hicieron lavados de la membrana para recuperar el producto de PCR de la minicolumna SV a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Termo EC Maxicell Primo EC); para esto, se colocaron 340.5  $\mu$ L del producto amplificado y un marcador de 1 Kb. Las bandas de ADN se visualizaron con luz UV en un transiluminador KODAK Gel Logic 100 Imaging System (365 nm).

La secuenciación nucleotídica del segmento de ADN se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de Semillas, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, utilizando el equipo 3130 Genetic Analyzer. La secuenciación nucleotídica del gen 16S rADN se realizó para cada cepa usando cuatro iniciadores 8F, 1492R, U514F, y 800R, una vez obtenidos los resultados en el programa Sequencing Analysis v5.3.1 se crearon

secuencias para cada uno de los aislamientos con el programa BioEdit Sequence Alignment (v.7.0.9.0). Cada una de estas secuencias se compararon con la opción BLAST-Nucleotide del National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

### 5.1.2. Selección de bacterias

Con base en la identificación molecular y a las pruebas de resistencia a pH ácido y sales biliares, realizadas por Caballero (2014), las cepas a utilizar en este estudio se describen en el Cuadro 8.

**Cuadro 8. Bacterias con potencial probiótico (Caballero, 2014).**

Cepas	Origen de la cepa
<i>Lactobacillus casei</i>	Laboratorio (control positivo)
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Mucosa oral de becerros
<i>Enterococcus faecium</i>	Calostro

### 5.1.3. Conservación de las cepas bacterianas

Las muestras se preservaron a -20°C en congelador Frigidaire modelo R134A, USA, en tubos Eppendorf con 650 µL de suspensión bacteriana en caldo Man-Sharpe-Rogosa (MRS) y 650 µL de glicerol al 50% como crioprotector. Se utilizó medio de cultivo MRS (Fluka-Sigma) como medio selectivo para crecimiento de BAL.



## 5.2. Tratamientos

Para determinar el efecto prebiótico de la inulina en BAL con potencial probiótico para rumiantes, se sustituyó en la misma proporción la glucosa por inulina, presente en el medio de cultivo (Cuadro 9) y se hicieron cocultivos de cepas de acuerdo a los tratamientos que se describen en el Cuadro 10.

**Cuadro 9. Composición del medio de cultivo líquido.**

Componente, g L <sup>-1</sup>	Medio	
	MRS-glucosa	MRS-inulina
Proteosa Peptona No. 3	10.0	10.0
Extracto de Carne	10.0	10.0
Extracto de Levadura	5.0	5.0
Glucosa	20.0	-----
Inulina	-----	20.0
Monoleato de Sorbitán	1 mL	1 mL
Fosfato Dipotásico	2.0	2.0
Acetato de Sodio	5.0	5.0
Citrato de Amonio	2.0	2.0
Sulfato de Magnesio	0.2	0.2
Sulfato de Manganeso	0.05	0.05
pH final 6.5±0.2		

### Cuadro 10. Tratamientos experimentales.

Tratamiento	Descripción
T1	MRS-glucosa + <i>L. salivarius</i>
T2	MRS-glucosa + <i>E. faecium</i>
T3	MRS-glucosa + <i>L. casei</i>
T4	MRS-inulina + <i>L. salivarius</i>
T5	MRS-inulina + <i>E. faecium</i>
T6	MRS-inulina + <i>L. casei</i>
T7	MRS-inulina + <i>L. salivarius</i> + <i>E. faecium</i>
T8	MRS-inulina + <i>L. salivarius</i> + <i>L. casei</i>
T9	MRS-inulina + <i>E. faecium</i> + <i>L. casei</i>
T10	MRS-inulina + <i>L. salivarius</i> + <i>E. faecium</i> + <i>L. casei</i>

*L.*= *Lactobacillus*; *E.*= *Enterococcus*.

### 5.3. Reactivación de las cepas bacterianas

Las muestras se reactivaron descongelando gradualmente los viales de -20°C a 4°C a temperatura ambiente, e inoculando el contenido (1.3 mL) en tubos de ensayo con 11.7 mL de caldo MRS-glucosa o MRS-inulina según el tratamiento correspondiente (relación 1/10). Pasado el tiempo de reactivación a 37°C por 12 h, se tomó 1 mL de este medio para hacer diluciones seriadas en agua peptonada, sembrar en agar MRS y determinar la concentración de bacterias por mililitro de inóculo (Cuadro 11).

Para los tratamientos de cocultivos, se reactivó cada cepa por separado como se describió anteriormente y se inoculó cada tratamiento en proporciones que guardaran la relación 1/10 en el volumen final.

**Cuadro 11. Población bacteriana a 12 h de reactivación.**

Medio de cultivo	Cepa	Log <sub>10</sub> UFC mL <sup>-1</sup>
MRS-glucosa	<i>Lactobacillus salivarius</i>	10.52
	<i>Enterococcus faecium</i>	10.03
	<i>Lactobacillus casei</i>	10.25
MRS-inulina	<i>Lactobacillus salivarius</i>	8.78
	<i>Enterococcus faecium</i>	9.79
	<i>Lactobacillus casei</i>	9.83

Todos los ensayos y pruebas de esta investigación se realizaron en campana de flujo laminar Labconco Logic Modclass II Type A2, USA, las incubaciones se hicieron en una estufa marca Riossa modelo 41, México; los materiales y medios de cultivo se esterilizaron en autoclave Lab Med modelo LMV 40, México, a 121°C a 1.5 atmosferas por 15 min. Cada vez que se preparó medio de cultivo (caldo/agar) se incubó durante el periodo de la prueba para evaluar esterilidad.

#### 5.4. Variables evaluadas

##### 5.4.1. Curva de crecimiento bacteriano

Se establecieron pruebas preliminares para determinar tiempos de lectura de absorbancia y unidades formadoras de colonia (UFC), con la finalidad de describir la curva de crecimiento bacteriano y su fase exponencial así como para evaluar la respuesta a medio aeróbico y anaeróbico.

Para determinar el uso de la inulina por las bacterias, se midió el crecimiento *in vitro*. El crecimiento de las cepas en cada tratamiento se determinó por densidad óptica con base en la curva de crecimiento, utilizando espectrofotometría con  $\lambda=630\text{nm}$  (Varian

Spectrophotometer UV-Vis Cary 1E, USA) (Desai *et al.*, 2004; García *et al.*, 2012; Smetanková *et al.*, 2012).

Se reactivaron las cepas y se inocularon 12 mL en 108 mL de caldo (1/10) según el tratamiento, en matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 mL y se incubaron a 37°C por 36 h para los tratamientos en MRS-glucosa y por 60 h para los tratamientos en MRS-inulina.

Los tiempos de lectura variaron en función de la interacción cepa-sustrato, teniendo como tiempo inicial (t=0) el momento de inoculación del producto de la reactivación en el tratamiento. Se tomaron al menos 10 tiempos de lectura de densidad óptica para describir la curva de crecimiento; para los tiempos de inicio y término de la fase de crecimiento exponencial se hicieron diluciones seriadas y siembra en placa para conteo de bacterias (Cuadro 12).

**Cuadro 12. Tiempos de lectura de absorbancia y siembra en placa para estimar poblaciones bacterianas.**

	Tratamiento	Tiempo (h)
Lectura de absorbancia	T1, T2 y T3	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 30, 36
	T4 – T10	0, 3, 6, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 60
Siembra en placa (inicio y término-fase exponencial)	T1, T2 y T3	2 y 9
	T6, T8, T9 y T10	3 y 24
	T5 y T7	24 y 48
	T4	30 y 48

#### 5.4.2. pH

El pH de cada tratamiento se registró al tiempo inicial, inicio y término de la fase de crecimiento exponencial y tiempo final de incubación, para determinar la actividad. Como control negativo se utilizó un matraz sin inocular siguiendo el procedimiento descrito. La

lectura de pH se realizó con un potenciómetro Orion Research SA 210, USA, con un electrodo Conductronic modelo P100C, México. El potenciómetro se calibró a pH 7 y 4 antes de tomar la lectura de cada horario.

#### **5.4.3. Producción de ácido láctico**

Inmediatamente después de registrar la lectura de absorbancia para la curva de crecimiento bacteriano, de cada uno de los cultivos se tomaron 800  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana y se depositaron en un tubo Eppendorf con 200  $\mu\text{L}$  de ácido metafosfórico al 25%. El ácido metafosfórico se utilizó para estabilizar los componentes presentes en el medio de cultivo. Los tubos inoculados se dejaron en refrigeración para posteriormente hacer la determinación de ácido láctico mediante la técnica de colorimetría descrita por Taylor (1996; según Madrid *et al.*, 1999). La producción de este ácido se registró al tiempo inicial de incubación, inicio y término de la fase de crecimiento exponencial y al final de la incubación para cada cultivo (tratamiento).

Se preparó la curva estándar de ácido láctico con 0-30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , en intervalos de 5  $\mu\text{g}$ , como describe el protocolo para muestras a analizar.

Después de 8 días en promedio en refrigeración las muestras se centrifugaron a 976  $\times$  g 5  $\text{min}^{-1}$ . Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y 950  $\mu\text{L}$  de agua destilada (dilución 1/20) para el tiempo inicial y el inicio de la fase de crecimiento exponencial, para el término de la fase de crecimiento exponencial y tiempo final se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 990  $\mu\text{L}$  de agua destilada (dilución 1/100). A cada muestra se le adicionaron 6 mL de ácido sulfúrico al 96%. Las muestras se colocaron a 90-100°C por 15 min y se disminuyó la temperatura a chorro de agua. Se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de sulfato de cobre y 200  $\mu\text{L}$  de parafenilfenol y se mezcló en vórtex. Se dejaron reposar 30 min a temperatura ambiente antes de leer en espectrofotómetro a  $\lambda=570$  nm (Varian Spectrophotometer UV-Vis Cary 1E, USA). Para la calibración primero se registraron las lecturas del medio de los

controles negativos (medios sin inocular) con el mismo proceso descrito, para poner en cero la lectura del equipo.

#### **5.4.4. Determinación de amonio**

La concentración de amonio en los medios de cultivo es una determinación que se puede relacionar con la cantidad de masa microbiana producida. La cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>) que se obtienen del conteo en placa puede verse afectada por malas técnicas de siembra, dilución o contaminación, o viabilidad de las colonias.

Para determinar el contenido de amonio en los medios de cultivo se utilizó la técnica descrita por McCullough (1967). La determinación de amonio se realizó en muestras recolectadas al término de la fase de crecimiento exponencial y tiempo final de incubación.

Se preparó la curva estándar de amonio a concentración de 0, 2.5, 5 a 20 mg dL<sup>-1</sup> en intervalos de 5 mg dL<sup>-1</sup>, como describe el protocolo para muestras a analizar.

Las muestras con 800 µL de crecimiento bacteriano y 200 µL de ácido metafosfórico al 25%, preparada para la determinación de ácido láctico, se centrifugaron a 976 x g por 5 min<sup>-1</sup>. Del sobrenadante obtenido se tomaron 20 µL y se depositaron en un tubo de ensayo de 10 mL conteniendo 1 mL de fenol y 1 mL de hipoclorito. Después de la incubación a baño maría a 37°C por 30 min, se agregó 5 mL de agua destilada y se mezcló en vórtex. Las lecturas se tomaron en un espectrofotómetro a  $\lambda=630$  nm (Varian Spectrophotometer UV-Vis Cary 1E, USA). Para la calibración primero se registraron las lecturas del medio de los controles negativos (medios sin inocular) con el mismo proceso descrito, para poner en cero la lectura del equipo.

#### 5.4.5. Resistencia de las bacterias a ácido clorhídrico y sales biliares

Tratando de simular lo que sucede en el lactante al momento de ingerir las bacterias que serán parte de la flora normal del intestino, las bacterias con potencial probiótico evaluadas en esta investigación, fueron sometidas a un proceso para simular la barrera gástrica y biliar, para después evaluar la supervivencia y analizar si algún tratamiento confiere un estímulo después del proceso de estrés.

Se sometieron al proceso de estrés de acuerdo a lo sugerido por Rodríguez *et al.* (2008) y Caballero (2014); se reactivaron las cepas inoculando en relación 1/10 en 10 mL de caldo de cada tratamiento y se incubaron a 37°C hasta llegar al término de la fase de crecimiento exponencial (de acuerdo a los horarios establecidos en Cuadro 11). Con la descripción de la curva de crecimiento de cada tratamiento, se estiman las UFC mL<sup>-1</sup> que hay en el medio. Previamente se esterilizó leche entera de la marca Alpura 2000 clásica<sup>®</sup> y se modificó el pH agregando HCl al 0.5 M hasta llegar a pH 4, el pH se determinó con potenciómetro. El pH de la leche sin modificar, después de esterilizar fue de 6.47 ± 0.02.

Al llegar al tiempo final de la fase de crecimiento exponencial, el medio con el crecimiento bacteriano se centrifugó a 2054 x g 10 min<sup>-1</sup> y se desechó el sobrenadante. Para resuspender la masa bacteriana se agregó leche acidificada, se homogenizó perfectamente y se incubó a 37°C por 1 h. Como control negativo se utilizaron los tratamientos sin inocular y con ajuste de pH.

Se prepararon 10 mL de caldo de los tratamientos y se les agregó 0.3% (p/v) de sales biliares (Oxgall Difco<sup>™</sup>) y se esterilizaron. Se retomó la masa celular bacteriana sometida a prueba de acidez mediante su centrifugación a 2054 x g 10 min<sup>-1</sup>, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la masa en los caldos de los tratamientos con sales biliares, se incubaron a 37°C por 3 h, homogenizando la mezcla cada 30 min para asegurar contacto con las sales. Después de este tiempo se tomó 1 mL para hacer diluciones seriadas y sembrar en agar MRS para determinar la concentración de UFC mL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> y así determinar la supervivencia de las bacterias con potencial probiótico después de someterlas al estrés del proceso de digestión. La muestra control negativo de la prueba de acidez se sometió al mismo proceso de sales biliares y siembra en agar para descartar contaminación.

#### **5.4.6. Inhibición de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium***

Una de las características de las bacterias ácido lácticas es su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias causantes de diarrea. Para determinar si la inulina genera un estímulo en bacterias con potencial probiótico y su efecto inhibitorio contra patógenos, se realizó una prueba de actividad antagónica según lo descrito por Zinedine y Faid (2007) y Das *et al.* (2010).

Para ambas cepas, *E. coli* ATCC 25972 (*Ec*) y *S. typhimurium* ATCC 14028 (*St*), se reactivó en medio soya-tripticaseína (STr) un vial con 2 mL de cultivo, a 37°C durante 24 h, posteriormente se reinoculó 1 mL del crecimiento en 9 mL de medio STr y se hizo crecer a 37 °C por 12 h. Se hicieron diluciones seriadas en agua peptonada para el conteo de UFC mL<sup>-1</sup> en placas con agar selectivo para coliformes (bilis-rojo-violeta con MUG) y agar selectivo para Salmonelas y Shigelas (XLD) para la siembra de *Ec* y *St*, respectivamente.

Las placas que fueron utilizadas en la prueba de antagonismo se sembraron por extensión en superficie con *Ec* y *St* respectivamente, asegurando una carga mínima 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, se dejaron por 1 h a temperatura ambiente antes de colocar los discos impregnados con el sobrenadante de los cultivos de los tratamientos.

Al término de la fase de crecimiento exponencial para cada cultivo (tratamiento), se tomaron 2 mL del crecimiento en viales estériles y se llevaron a centrifugar a 6500 x g 10 min<sup>-1</sup>. Se tomó un disco de papel Whatman 541 de 5 mm de diámetro, se saturó con sobrenadante de cada uno de los tratamientos y se colocó en la placa sembrada con *Ec* y



*St.* Se dejaron 2 h a temperatura ambiente para la difusión del líquido en el medio de la placa y se llevó a incubación por 24 h a 37°C, para después medir la zona de inhibición a partir del disco de papel. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento colocando discos impregnados con medio MRS sin inocular en placas con *Ec* y *St*. Paralelamente se sembró *Ec* y *St*, tomando su crecimiento como control positivo.

## 5.5. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, con diez tratamientos y tres repeticiones por tratamiento para cada variable. Los datos se analizaron mediante el procedimiento PROC GLM de SAS (SAS, 2004). Las medias de tratamientos de las variables: crecimiento bacteriano, pH, producción de ácido láctico, determinación de amonio y resistencia a acidez y sales biliares se compararon con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

El modelo estadístico fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_j$$

Donde:

$Y_{ij}$  = variable de respuesta

$\mu$  = media general

$T_i$  = efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$\varepsilon_j$  = error experimental

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Curva de crecimiento bacteriano

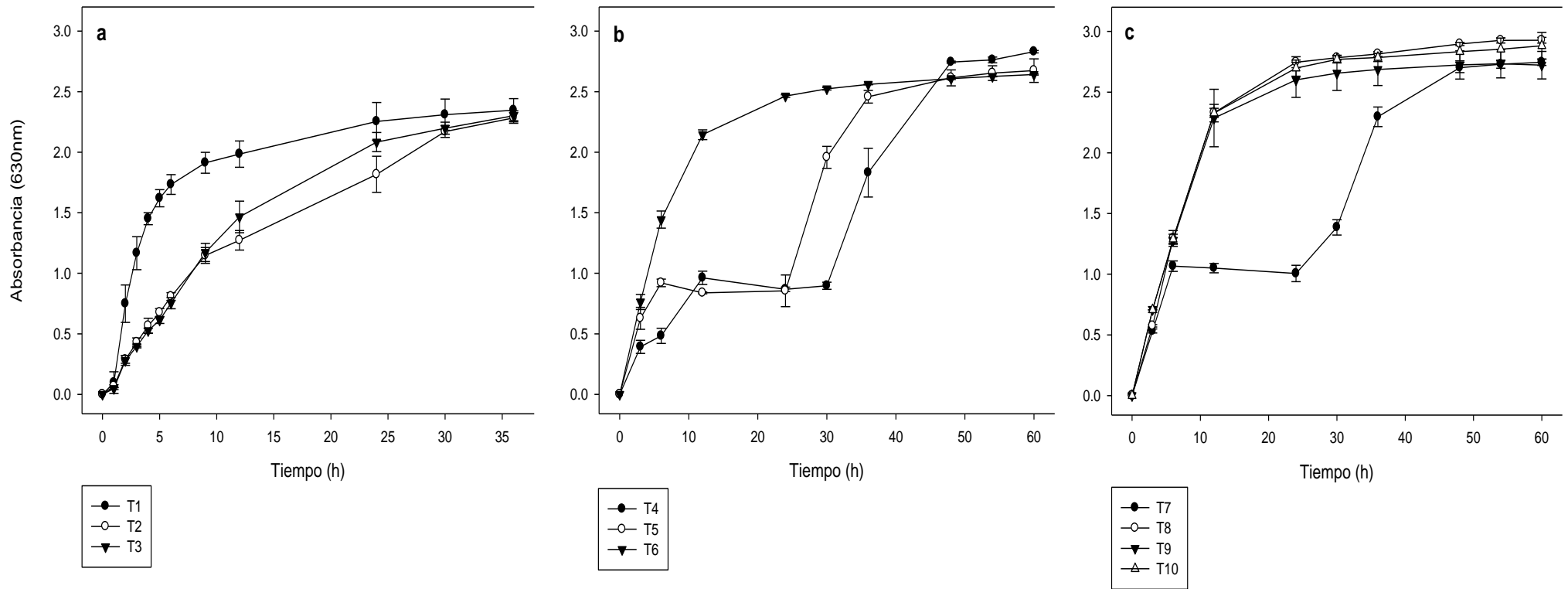
En la Figura 3 se describe la curva de crecimiento bacteriano para *Lactobacillus salivarius* (*Ls*), *Enterococcus faecium* (*Ef*) y *Lactobacillus casei* (*Lc*) en monocultivo y en cocultivo. En ésta se observa que al reemplazar por inulina la glucosa del medio MRS, el tiempo de reconocimiento del sustrato por *Ls* y *Ef* (T4 y T5) se prolonga a 30 y 24 h, respectivamente, mientras que para la cepa testigo, *Lc* (T6) el reconocimiento del sustrato no indica un retraso en el desarrollo de la curva de crecimiento, de acuerdo a lo descrito por Kneifel *et al.* (2000), Desai *et al.* (2004), Kunová *et al.* (2011), Widodo *et al.* (2014). Por otra parte, autores como Kaplan y Hutkins, (2003) y Makras *et al.* (2005) reportaron que las bacterias ácido lácticas tienen las enzimas necesarias para hidrolizar enlaces glicosídicos  $\beta$  2-1, del tipo presente en la inulina.

Al ofrecer la inulina como única fuente de carbón en el medio de cultivo (MRS-inulina), las cepas alcanzaron una lectura de absorbancia mayor a 2.5, mientras que la lectura del crecimiento en medio MRS-glucosa se mantuvieron por debajo del mismo valor (Fig. 3a y 3b). Esto evidencia que la presencia de inulina ejerce un estímulo en el crecimiento de las bacterias, superior al observado con glucosa como fuente de carbono. Al comparar el crecimiento bacteriano de los tratamientos que incluyeron como sustrato inulina en monocultivos o cocultivos (Figura 3b y 3c), la curva de crecimiento describe un menor tiempo de reconocimiento del sustrato para los tratamientos que contienen *Lc* en cocultivo (T8, T9 y T10), y se comportan de forma similar al crecimiento observado con *Lc* en monocultivo (T6); para el tratamiento que implicó *Ls* y *Ef* (T7) el tiempo de reconocimiento del sustrato se alarga a 24 h.

En medio MRS-glucosa se observa que *Ls* (T1) tiene una fase de crecimiento exponencial acelerada; sin embargo, el valor de absorbancia a tiempo final es mayor y

significativo ( $p < 0.05$ ) cuando crece en medio MRS-inulina (T4) (DO: 2.35 vs. 2.83). Este comportamiento difiere de lo registrado por Saminathan *et al.* (2011), quienes no encontraron diferencias entre el crecimiento de *Ls* en medio MRS enriquecido (1% p/v) con glucosa o con fructoligosacaridos (FOS) (DO: 1.85 vs. 1.55) en incubaciones a 24 h, esto se puede relacionar con la presencia de glucosa, lo cual no obliga a la cepa a utilizar el derivado de inulina (FOS) de manera más eficiente.

El mayor valor de absorbancia registrado en este trabajo se presentó en el cocultivo de *Ls* y *Lc* en MRS-inulina (T8) (DO: 2.93).



**Figura 3. Crecimiento de *Lactobacillus salivarius* (Ls), *Enterococcus faecium* (Ef) y *Lactobacillus casei* (Lc) en monocultivo en medio MRS-glucosa (a) y MRS-inulina (b) y en cocultivo en medio MRS-inulina (c). T1= MRS-glucosa+Ls, T2= MRS-glucosa+Ef, T3= MRS-glucosa+Lc, T4= MRS-inulina+Ls, T5= MRS-inulina+Ef, T6= MRS-inulina+Lc, T7=MRS-inulina+Ls+Ef, T8= MRS-inulina+Ls+ Lc, T9= MRS-inulina+Ef+Lc y T10= MRS-inulina+Ls+Ef+Lc.**

El Cuadro 13 describe el cambio en la absorbancia a tiempo final, donde existieron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T10 (MRS-inulina) y T1, T2 y T3 (MRS-glucosa). Los valores observados en este trabajo se encuentran cercanos a los valores máximos reportados por Kaplan y Hutkins (2000), quienes adicionaron fructooligosacaridos al 2% (p/v) en medio de cultivo MRS, al estudiar el crecimiento de cepas probióticas a 24 h (DO: 2.4 *L. casei* y 2.8 *L. plantarum*); y son mayores a los reportados por Goderska *et al.* (2008) quienes tuvieron una lectura máxima de absorbancia de 1.6 con oligofructosa y de 1.0 con inulina, adicionados al 33% de peso seco al medio MRS con *L. acidophilus* en crecimiento a 72 h.

**Cuadro 13. Lecturas de absorbancia a tiempo final y población bacteriana al término de la fase exponencial (TFE).**

Tratamiento	Absorbancia (630 nm)	Log <sub>10</sub> UFC mL <sup>-1</sup> TFE
T1	2.35 <sup>d</sup>	10.98 <sup>d</sup>
T2	2.28 <sup>d</sup>	10.76 <sup>d</sup>
T3	2.30 <sup>d</sup>	11.29 <sup>d</sup>
T4	2.83 <sup>a b c</sup>	13.11 <sup>c</sup>
T5	2.67 <sup>c</sup>	13.63 <sup>b</sup>
T6	2.64 <sup>c</sup>	13.77 <sup>a</sup>
T7	2.75 <sup>a b c</sup>	12.93 <sup>c d</sup>
T8	2.93 <sup>a</sup>	12.74 <sup>c d</sup>
T9	2.72 <sup>b c</sup>	12.43 <sup>c d</sup>
T10	2.88 <sup>a b</sup>	12.92 <sup>c d</sup>

*Ls=Lactobacillus salivarius, Ef=Enterococcus faecium, Lc=Lactobacillus casei.*

T1=MRS-glucosa+Ls, T2=MRS-glucosa+Ef, T3=MRS-glucosa+Lc, T4=MRS-inulina+Ls, T5=MRS-inulina+Ef, T6=MRS-inulina+Lc, T7=MRS-inulina+Ls+Ef, T8=MRS-inulina+Ls+Lc, T9=MRS-inulina+Ef+Lc y T10=MRS-inulina+Ls+Ef+Lc.

a, b, c, d: Medias con la misma letra no muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El mayor conteo ( $p < 0.05$ ; Cuadro 13) de unidades formadoras de colonias al término de la fase de crecimiento exponencial fue para los tratamientos en medio MRS-inulina; aunque sólo existe diferencia ( $p < 0.05$ ) entre los monocultivos de *E. faecium* y *L. casei* en MRS-inulina (T6, 13.77 y T5, 13.63  $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), con relación a los otros tratamientos. Esto indica que bajo las condiciones de este estudio, no existió relación directa y proporcional entre la lectura de absorbancia y el conteo de células; ya que los tratamientos que registraron el mayor valor de absorbancia (T4 y T8), no fueron los que presentaron el conteo de células más alto (T5 y T6).

Conteos bacterianos inferiores fueron reportados por Goderska *et al.* (2008) con *L. acidophilus* en medio con oligofruktosa e inulina (9.0 y 7.5  $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ). Esto se puede explicar por factores como la cantidad de bacterias en el inóculo inicial, el tipo de cepa y a que en la investigación señalada suplementó al medio MRS con oligofruktosa e inulina; mientras que en esta investigación, se sustituyó la fuente de carbón del medio. Kunová *et al.* (2011) reportan un conteo de 8.20  $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  para las diferentes cepas de *Lactobacillus* en crecimiento a 24 h en medio de cultivo con inulina como única fuente de carbón; el crecimiento en inulina fue mayor al crecimiento con otros prebióticos como fuente de carbón. Con base en esta información, se observa similitud en la tendencia de los resultados entre el estudio de Kunová *et al.* (2011) y la presente investigación, donde existe mayor conteo de células viables en el medio con inulina como fuente de carbón.

Las diferencias en el conteo de UFC se pueden deber al inóculo inicial y al tiempo de crecimiento donde Kunová *et al.* (2011) establecieron un tiempo único para todos los cultivos y en esta investigación el horario de muestreo se tomó con base al desarrollo de la curva de crecimiento, para asegurar tener lectura al término de la fase de crecimiento exponencial. De manera similar, Nazzaro *et al.* (2012a; 2012b) reportan un crecimiento similar en medios con inulina para *L. acidophilus* (12.08  $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) y *L. plantarum* (10.28  $\text{Log}_{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ).

En el Cuadro 14 se observa que T1 (*L. salivarius* MRS-glucosa) tiene el tiempo de generación más corto con 98.88 min; sin embargo, en medio MRS-inulina aumenta a 188.34 min (T4); por lo que no se puede relacionar la adición de inulina con un efecto constante en el tiempo de generación; ya que para el T2 (*E. faecium* MRS-glucosa), va de 144.86 min a 103.40 min en MRS-inulina (T5), esto implica una interacción específica entre cepa y sustrato, y se corrobora al analizar el tiempo de reconocimiento descrito en la curva de crecimiento (Figura 3). Los tiempos de generación para los demás tratamientos están en el rango de 100 a 180 min. Desai *et al.* (2004) analizaron el efecto de adicionar prebióticos (5% p/v) en leche descremada reconstituida obteniendo con la adición de inulina un tiempo de generación de  $358 \pm 15$  min para *L. casei* como la cepa de *Lactobacillus*, con mejor interacción con inulina; la diferencia entre estos resultados y los de la presente investigación se pueden relacionar al medio donde se dio el crecimiento; en este caso se tienen los componentes óptimos para el crecimiento de bacterias ácido lácticas, con la sustitución de glucosa por inulina. Saminathan *et al.* (2011), estimaron tasas específicas de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ ) que reflejan un tiempo de generación de 134 min para *L. gallinarum*, de 149 min para *L. reuteri* y de 62 min para *L. salivarius* en medio MRS enriquecido (1% p/v) con fructoligosacaridos. Mejía *et al.* (2007) obtuvieron tiempos de generación en el rango de 84 a 120 min en crecimiento a 12 h en MRS para 22 cepas de *Lactobacillus* aisladas de heces de niños y muestras vaginales, con el fin de evaluar la capacidad probiótica *in vitro*.

Los valores de tiempo de generación obtenidos en el estudio de Mejía *et al.* (2007) y en el presente estudio son comparables, disparándose los valores de T2, T4 y T9.



**Cuadro 14. Población bacteriana al inicio y al término de la fase exponencial (IFE, TFE, respectivamente) y tiempo de generación.**

Tratamiento	Log <sub>10</sub> UFC mL <sup>-1</sup>		Tiempo de generación (min)
	IFE	TFE	
T1	9.65 <sup>c</sup>	10.98 <sup>d</sup>	98.88
T2	9.73 <sup>c</sup>	10.76 <sup>d</sup>	144.86
T3	10.04 <sup>c</sup>	11.29 <sup>d</sup>	102.90
T4	11.39 <sup>a</sup>	13.11 <sup>c</sup>	188.34
T5	9.44 <sup>c</sup>	13.63 <sup>b</sup>	103.40
T6	10.56 <sup>b</sup>	13.77 <sup>a</sup>	118.21
T7	9.53 <sup>c</sup>	12.93 <sup>c d</sup>	118.52
T8	9.66 <sup>c</sup>	12.74 <sup>c d</sup>	123.24
T9	10.22 <sup>c</sup>	12.43 <sup>c d</sup>	176.50
T10	9.63 <sup>c</sup>	12.92 <sup>c d</sup>	112.24

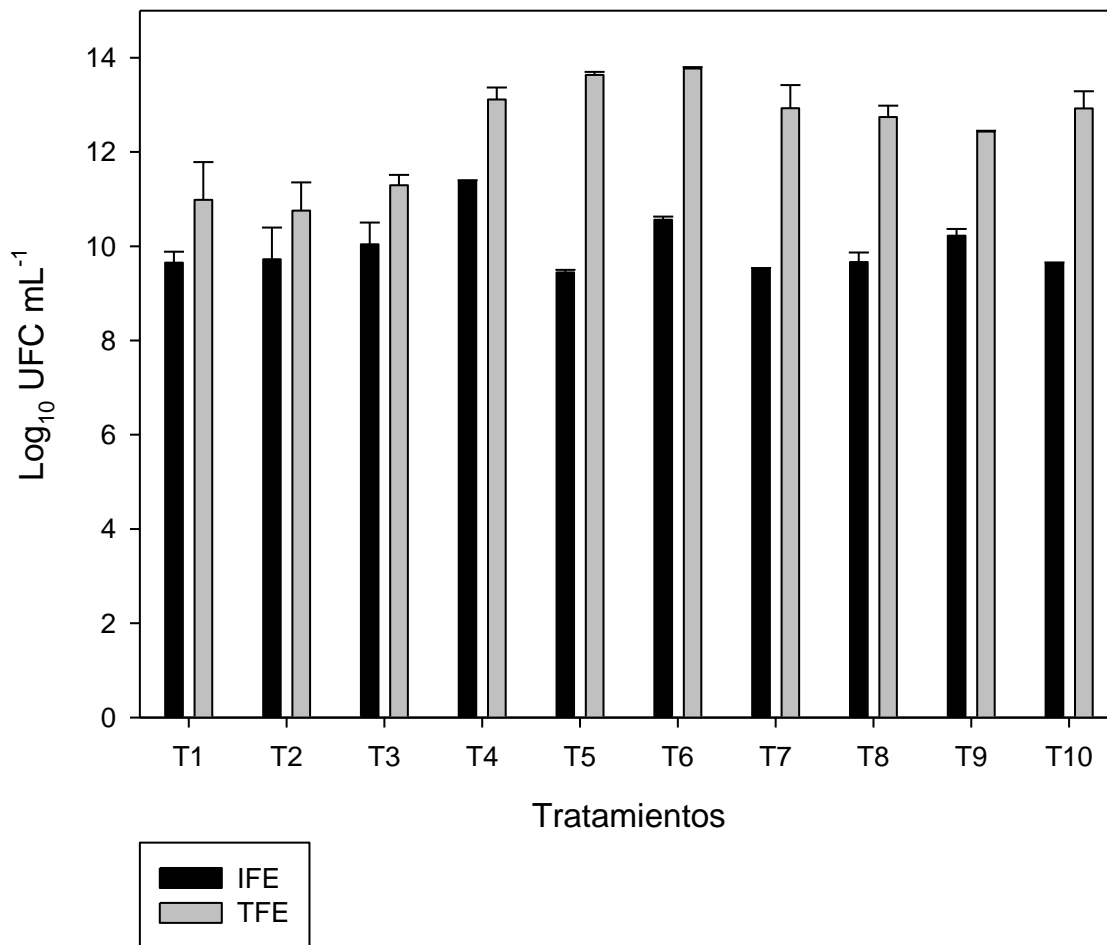
*Ls=Lactobacillus salivarius, Ef=Enterococcus faecium, Lc=Lactobacillus casei.*

T1=MRS-glucosa+Ls, T2=MRS-glucosa+Ef, T3=MRS-glucosa+Lc, T4=MRS-inulina+Ls, T5=MRS-inulina+Ef, T6=MRS-inulina+Lc, T7=MRS-inulina+Ls+Ef, T8=MRS-inulina+Ls+ Lc, T9=MRS-inulina+Ef+Lc y T10=MRS-inulina+Ls+Ef+Lc.

a, b, c, d: Medias con la misma letra no muestran diferencias significativas (p<0.05).

Hubo diferencia entre tratamientos en el conteo de células al inicio de la fase de crecimiento exponencial, fueron mayores para T4 y T6 (11.39 y 10.56 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Al analizar el crecimiento (Figura 4) como la diferencia de la población bacteriana (UFC mL<sup>-1</sup>) al término de la fase de crecimiento exponencial menos la población a inicio de la fase de crecimiento exponencial, hubo mayor crecimiento en T5, posteriormente en T6, T7, T8 y T10. Los tratamientos en medio MRS-glucosa (T1, T2 y T3) no presentan diferencias. Los resultados evidencian un efecto estimulante de la inulina en el crecimiento de *L. salivarius*, *E. faecium* y *L. casei*, tanto en monocultivos

como en cocultivos.



**Figura 4. Población bacteriana al inicio y término de la fase de crecimiento exponencial (IFE, TFE, respectivamente).** *Ls=Lactobacillus salivarius*, *Ef=Enterococcus faecium*, *Lc=Lactobacillus casei*. T1=MRS-glucosa+*Ls*, T2=MRS-glucosa+*Ef*, T3=MRS-glucosa+*Lc*, T4=MRS-inulina+*Ls*, T5=MRS-inulina+*Ef*, T6=MRS-inulina+*Lc*, T7=MRS-inulina+*Ls*+*Ef*, T8=MRS-inulina+*Ls*+ *Lc*, T9=MRS-inulina+*Ef*+*Lc* y T10=MRS-inulina+*Ls*+*Ef*+*Lc*.

## 6.2. pH

El pH a tiempo inicial (Cuadro 15) fue menor para T1, T2 y T3 (reactivados en medio MRS-glucosa) en comparación con los tratamientos reactivados en medio MRS-inulina; esto se explica debido al efecto del pH del inóculo inicial, con base en que la curva de crecimiento en medio MRS-glucosa es más acelerada. Al inicio de la fase de crecimiento exponencial el valor de pH más bajo lo presenta T1 ( $p < 0.05$ ), y se relaciona con un

desarrollo de la curva de crecimiento en menor tiempo; al término de la fase de crecimiento exponencial sólo T2 y T3 presentan un valor de pH mayor de 4 (4.86 y 4.80) y a tiempo final todos los tratamientos estuvieron en el rango de 3.67 a 3.92; después del tiempo inicial no se observó una tendencia clara del pH en medios de cultivo MRS-glucosa o MRS-inulina. Parece no existir relación entre el valor de absorbancia, conteo de células y valor de pH entre tratamientos en los diferentes tiempos de toma de datos.

**Cuadro 15. Lecturas de pH a tiempo inicial, inicio de la fase exponencial (IFE), término de la fase exponencial (TFE) y tiempo final de incubación.**

Tratamiento	Tiempo inicial	IFE	TFE	Tiempo final
T1	5.47 <sup>c</sup>	4.73 <sup>d</sup>	3.76 <sup>c</sup>	3.77 <sup>cd</sup>
T2	5.96 <sup>b</sup>	5.62 <sup>abc</sup>	4.86 <sup>a</sup>	3.90 <sup>ab</sup>
T3	5.90 <sup>b</sup>	5.56 <sup>bc</sup>	4.80 <sup>a</sup>	3.92 <sup>a</sup>
T4	6.33 <sup>a</sup>	5.58 <sup>abc</sup>	3.88 <sup>bc</sup>	3.73 <sup>cd</sup>
T5	6.32 <sup>a</sup>	5.55 <sup>bc</sup>	3.82 <sup>bc</sup>	3.71 <sup>cd</sup>
T6	6.27 <sup>a</sup>	5.74 <sup>ab</sup>	3.96 <sup>b</sup>	3.67 <sup>d</sup>
T7	6.31 <sup>a</sup>	5.43 <sup>c</sup>	3.88 <sup>bc</sup>	3.77 <sup>cd</sup>
T8	6.28 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	3.76 <sup>c</sup>	3.77 <sup>cd</sup>
T9	6.25 <sup>a</sup>	5.74 <sup>ab</sup>	3.73 <sup>c</sup>	3.80 <sup>bc</sup>
T10	6.28 <sup>a</sup>	5.77 <sup>a</sup>	3.77 <sup>c</sup>	3.83 <sup>abc</sup>

*Ls=Lactobacillus salivarius, Ef=Enterococcus faecium, Lc=Lactobacillus casei.*

T1=MRS-glucosa+Ls, T2=MRS-glucosa+Ef, T3=MRS-glucosa+Lc, T4=MRS-inulina+Ls, T5=MRS-inulina+Ef, T6=MRS-inulina+Lc, T7=MRS-inulina+Ls+Ef, T8=MRS-inulina+Ls+ Lc, T9=MRS-inulina+Ef+Lc y T10=MRS-inulina+Ls+Ef+Lc.

a, b, c, d: Medias con la misma letra no muestran diferencias significativas (p<0.05).

El valor de pH a tiempo inicial, cuando se reactiva en medio MRS-inulina fue similar a lo reportado por Desai *et al.* (2004) a tiempo 0 en el rango de 6.23 a 6.35. Goderska *et al.* (2008) reportan valores de pH superiores a 5.0 para *L. acidophilus* cuando se cultiva con

inulina a 48 h, mientras que con oligofructosa alcanza hasta 3.68, este valor es cercano a los observados al término de la fase de crecimiento exponencial y a tiempo final de esta investigación.

Olson y Aryana (2012) describen el mismo comportamiento en la modificación de pH para *L. acidophilus* en la adición de prebióticos (oligofructosa, inulina e inulina HP) a dos concentraciones (1 y 3%) en leche descremada, teniendo un pH inicial de 6.25 y relacionaron la curva de crecimiento con el valor de pH, registrando valores de pH cercanos a 5.5 y 5.7 (1 y 3% prebiótico, respectivamente) cuando inicia la fase de crecimiento exponencial.

Winarti *et al.* (2013) obtuvieron valores mínimos de pH de 6.13 y 5.69 con *L. casei* en medio MRS sustituyendo la glucosa por inulina obtenida de *Dioscorea esculenta* e inulina comercial respectivamente. El valor máximo de unidades formadoras de colonias que estos autores reportan es cercano a  $8.5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ , valores inferiores a lo reportado en esta investigación, esto se puede relacionar con la diferencia de pH.

Kareem *et al.* (2014) reportaron valores de pH de 3.80 a 4.38 durante el crecimiento de diferentes cepas de *L. plantarum* en medio MRS suplementado con niveles crecientes de inulina (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 %) e incubados a 24 h, similares a los observados al término de la fase de crecimiento exponencial en esta investigación.

### **6.3. Producción de ácido láctico**

La producción de ácido láctico (Cuadro 16) a tiempo inicial de incubación e inicio de la fase de crecimiento exponencial no presentó una tendencia definida a pesar de existir cambios entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). En cambio, la producción de ácido láctico fue más alta ( $p < 0.05$ ) al término de la fase de crecimiento exponencial y a tiempo final de incubación en T1, T2 y T3, medio MRS-glucosa.

Desai *et al.* (2004) reportan una producción de ácido láctico de  $1540 \text{ mg L}^{-1}$  a 48 h de

incubación con cepas de *L. casei* e inulina; las diferencias en los valores de dichos autores y el presente estudio se pueden explicar por la limitación de nutrientes en el sustrato (leche descremada reconstituida) que utilizaron como medio de cultivo en su estudio.

**Cuadro 16. Producción de ácido láctico a tiempo inicial, inicio de la fase exponencial (IFE), término de la fase exponencial (TFE) y tiempo final de incubación.**

Tratamiento	(mg L <sup>-1</sup> )			
	Tiempo inicial	IFE	TFE	Tiempo final
T1	648.2 <sup>a</sup>	926.1 <sup>abc</sup>	8851.9 <sup>a</sup>	9097.4 <sup>a</sup>
T2	376.9 <sup>cd</sup>	756.9 <sup>bc</sup>	9370.8 <sup>a</sup>	9289.9 <sup>a</sup>
T3	570.3 <sup>a</sup>	1033.8 <sup>ab</sup>	8862.4 <sup>a</sup>	9399.9 <sup>a</sup>
T4	217.5 <sup>e</sup>	869.9 <sup>abc</sup>	5643.5 <sup>cde</sup>	5365.6 <sup>d</sup>
T5	310.1 <sup>d</sup>	895.7 <sup>abc</sup>	4622.4 <sup>f</sup>	7150.6 <sup>c</sup>
T6	477.1 <sup>b</sup>	864.6 <sup>abc</sup>	5093.4 <sup>ef</sup>	7374.6 <sup>bc</sup>
T7	318.7 <sup>cd</sup>	1018.9 <sup>ab</sup>	5574.3 <sup>de</sup>	6073.6 <sup>d</sup>
T8	369.1 <sup>cd</sup>	910.6 <sup>abc</sup>	6771.0 <sup>b</sup>	5992.1 <sup>d</sup>
T9	392.8 <sup>c</sup>	842.5 <sup>ab</sup>	6283.8 <sup>bcd</sup>	5924.5 <sup>d</sup>
T10	366.1 <sup>cd</sup>	1069.2 <sup>a</sup>	6450.2 <sup>bc</sup>	8110.2 <sup>b</sup>

*Ls=Lactobacillus salivarius, Ef=Enterococcus faecium, Lc=Lactobacillus casei.*

T1=MRS-glucosa+Ls, T2=MRS-glucosa+Ef, T3=MRS-glucosa+Lc, T4=MRS-inulina+Ls, T5=MRS-inulina+Ef, T6=MRS-inulina+Lc, T7=MRS-inulina+Ls+Ef, T8=MRS-inulina+Ls+ Lc, T9=MRS-inulina+Ef+Lc y T10=MRS-inulina+Ls+Ef+Lc.

a, b, c, d: Medias con la misma letra no muestran diferencias significativas (p<0.05).

#### 6.4. Amonio

La concentración de amonio detectada al término de la fase de crecimiento exponencial de crecimiento (Cuadro 17) presentó diferencias (p<0.05) entre tratamientos, resultando más alta (p<0.05) en T7, T9 y T10 con relación a T1, T2 y T3, evidenciando el

efecto de la inclusión de inulina y el uso de cocultivos. Para el tiempo final de incubación, los tratamientos en medio MRS-inulina (T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T10) presentaron mayor ( $p<0.05$ ) producción de amonio que los tratamientos en medio MRS-glucosa (T1, T2 y T3). Este comportamiento en la producción de amonio lo podemos relacionar con el mayor conteo de unidades formadoras de colonias al término de la fase exponencial de la curva de crecimiento en los tratamientos MRS-inulina.

**Cuadro 17. Producción de amonio al término de la fase exponencial (TFE) y a tiempo final de incubación.**

Tratamiento	(mg dL <sup>-1</sup> )	
	TFE	Tiempo final
T1	3.65 <sup>d</sup>	3.32 <sup>c d</sup>
T2	3.98 <sup>c d</sup>	2.56 <sup>d</sup>
T3	4.26 <sup>b c d</sup>	3.84 <sup>b c d</sup>
T4	5.39 <sup>a b c d</sup>	5.73 <sup>a b</sup>
T5	5.27 <sup>a b c d</sup>	5.46 <sup>a b c</sup>
T6	6.21 <sup>a b</sup>	6.62 <sup>a</sup>
T7	7.12 <sup>a</sup>	6.28 <sup>a</sup>
T8	6.06 <sup>a b c</sup>	6.45 <sup>a</sup>
T9	7.19 <sup>a</sup>	6.23 <sup>a</sup>
T10	6.70 <sup>a</sup>	6.63 <sup>a</sup>

*Ls=Lactobacillus salivarius, Ef=Enterococcus faecium, Lc=Lactobacillus casei.*

T1=MRS-glucosa+Ls, T2=MRS-glucosa+Ef, T3=MRS-glucosa+Lc, T4=MRS-inulina+Ls, T5=MRS-inulina+Ef, T6=MRS-inulina+Lc, T7=MRS-inulina+Ls+Ef, T8=MRS-inulina+Ls+Lc, T9=MRS-inulina+Ef+Lc y T10=MRS-inulina+Ls+Ef+Lc.

a, b, c, d: Medias con la misma letra no muestran diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

## 6.5. Resistencia a ácido clorhídrico y sales biliares

El conteo de células después de la exposición a ácido clorhídrico y sales biliares (Cuadro 18) presenta porcentajes de supervivencia superiores a 90% para todos los tratamientos. El conteo de unidades formadoras de colonias después de la exposición muestra el mismo efecto que cuando no son sometidos a estrés, con mayor conteo en los tratamientos en medio MRS-inulina, siendo T5, T6 y T7 los que presentan mayor número de UFC mL<sup>-1</sup> (Log<sub>10</sub> 12.89, 12.49 y 12.81). Los resultados evidencian que *E. faecium* presenta un porcentaje de supervivencia mayor de acuerdo a lo registrado en los tratamientos T2:96.75%; T5:94.57%; T7:99.07%; T9:98.96% y T10:94.13% en contraste a la presentada por *L. casei* en medio MRS-inulina (T6). Lo anterior evidencia la habilidad específica de cada cepa para protegerse en ambientes adversos.

Desai *et al.* (2008) analizaron la supervivencia de 22 cepas de *Lactobacillus* a diferentes pH, y sales biliares a diferentes tiempos. Como base (antes de exposición) encontraron crecimientos en el rango de 12.19 a 12.42 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>; para un tiempo de contacto de 1 h en medio acidificado a pH 3, tuvieron supervivencias de 50% para algunas cepas y hasta 95% para otras; para sales biliares, la concentración más baja que utilizaron fue 1.0% (p/v) encontraron con 3 h de exposición, supervivencias de hasta 97%, pero disminuyendo hasta 35% para otras cepas. Estos resultados pueden ser comparables con los encontrados en la presente investigación donde se alcanzan porcentajes de 90% de supervivencia, aun cuando las condiciones de estrés a las células fueron más agresivas en el trabajo de Desai *et al.* (2008). La habilidad para la supervivencia a medios ácidos y presencia de sales biliares es expresada de diferente manera entre cepas pertenecientes al mismo género.

**Cuadro 18. Población bacteriana al término de la fase de crecimiento exponencial (TFE), células expuestas a ácido clorhídrico (pH 4) y sales biliares (0.3% p/v) y porcentaje de supervivencia.**

Tratamiento	Log <sub>10</sub> UFC mL <sup>-1</sup>		Supervivencia, %
	TFE	Células expuestas	
T1	10.98 <sup>d</sup>	10.38 <sup>c</sup>	94.46
T2	10.76 <sup>d</sup>	10.41 <sup>c</sup>	96.75
T3	11.29 <sup>d</sup>	10.81 <sup>c</sup>	95.70
T4	13.11 <sup>c</sup>	12.08 <sup>c</sup>	92.08
T5	13.63 <sup>b</sup>	12.89 <sup>a</sup>	94.57
T6	13.77 <sup>a</sup>	12.49 <sup>b c</sup>	90.68
T7	12.93 <sup>c d</sup>	12.81 <sup>a b</sup>	99.07
T8	12.74 <sup>c d</sup>	12.06 <sup>c</sup>	94.64
T9	12.43 <sup>c d</sup>	12.30 <sup>c</sup>	98.96
T10	12.92 <sup>c d</sup>	12.16 <sup>c</sup>	94.13

*Ls=Lactobacillus salivarius, Ef=Enterococcus faecium, Lc=Lactobacillus casei.*

T1=MRS-glucosa+Ls, T2=MRS-glucosa+Ef, T3=MRS-glucosa+Lc, T4=MRS-inulina+Ls, T5=MRS-inulina+Ef, T6=MRS-inulina+Lc, T7=MRS-inulina+Ls+Ef, T8=MRS-inulina+Ls+ Lc, T9=MRS-inulina+Ef+Lc y T10=MRS-inulina+Ls+Ef+Lc.

a, b, c, d: Medias con la misma letra no muestran diferencias significativas (p<0.05).

Nazzaro *et al.* (2012b) reportan un 75% de supervivencia para la cepa *L. plantarum* en medio MRS con inulina (20 gL<sup>-1</sup>) después de someter a simulación de estrés por jugo gástrico a pH de 2.0 y pancreático, siendo superior al 61% de supervivencia en medio MRS enriquecido con glucosa. El conteo de células viables después del estrés digestivo puede que difiera a lo encontrado en esta investigación debido al pH y al tiempo de exposición al pH (180 vs. 60 min).

Messaoudi *et al.* (2013), documentaron en una revisión la capacidad de *L. salivarius* como probiótico. Dunne *et al.* (2001) reportan un crecimiento de hasta 9.55 Log<sub>10</sub> UFC



mL<sup>-1</sup> a pH 2.5 con 60 min de exposición, lo que representa cerca del 100% de supervivencia comparado al tratamiento sin exposición; y una resistencia hasta al 5% de concentración de sales biliares de bovino. Narakaew *et al.* (2010) analizaron la capacidad probiótica de *L. salivarius* aislada del intestino de pollos; la tasa de supervivencia a 16 h de exposición fue de 76.63% y 77.88% (pH 3.0 y 3.5), valores por debajo a lo encontrado en esta investigación, pero manteniendo la concentración necesaria de bacterias para ser considerado probiótico.

Acurcio *et al.* (2014) reportan tasas de supervivencia de hasta 100% para *E. faecium* aisladas de leche de borregas y sometidas a pH de 2.0 por 3 h y hasta de 77% de supervivencia en exposición a medio con 0.3% de sales biliares (oxgall) por 18 h. Los valores reportados corroboran la capacidad encontrada en esta investigación de *E. faecium* para soportar condiciones de pH bajo y presencia de sales biliares.

Las diferencias entre la tasa de supervivencia reportada en las investigaciones de caracterización de cepas probiótica y la encontrada en esta investigación se puede relacionar al modo de exposición de las bacterias a la acidificación y a sales biliares. En esta investigación se simuló la ruta biológica desde que se consume el probiótico, es decir como alimento funcional con un medio que le confiera soporte fisiológico, (yogurt, queso, crema o leche) pasando por exposición a acidez y sales biliares hasta que se establece en el tubo digestivo posterior.

## **6.6. Inhibición de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium***

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de ejercer un efecto inhibitorio en el crecimiento de cepas patógenas a través del pH bajo, producción de ácido láctico, enzimas, metabolitos, agentes líticos y bacteriocinas, que resultan antagónicos para la viabilidad de patógenos (Tagg *et al.*, 1976; Monroy *et al.*, 2009; Saranraj *et al.*, 2013).

En el cuadro 19 se describe el efecto inhibitorio de la exposición de *E. coli* (*Ec*) y *S. typhimurium* (*St*) al sobrenadante del crecimiento a término de la fase exponencial de los tratamientos. Se observa que todos los tratamientos tuvieron efecto antagónico en el desarrollo de ambas cepas patógenas, siendo T2 y T5 (*Enterococcus faecium*) la cepa con menor inhibición para *Ec* pero teniendo mejor efecto contra *St*. No existe evidencia de relación entre tratamientos y actividad antagónica, esto indica una interacción específica entre bacterias. Los tratamientos con cocultivos (T7-T10) mantienen el efecto inhibitorio; esto es una buena señal ya que a nivel fisiológico existe un ambiente diverso (microflora del colon) donde las bacterias probióticas deben producir las sustancias inhibitorias para mantener la salud intestinal.

Vélez *et al.* (2015) reportan efecto inhibitorio de dos cepas de BAL asiladas de calostro de cerdas contra *St*. Amorocho (2011) aisló 131 cepas de BAL a partir de leche de oveja guirra y reporta el efecto inhibitorio de 24 de estas cepas contra tres variedades de *Salmonella*. Dixit *et al.* (2013) reportan diferencia en la inhibición entre tres cepas de *Lactobacillus acidophilus* contra *Ec* y *St*, lo cual se relaciona con una interacción específica entre cepa y enteropatógeno. Zinedine y Faid (2007) reportan diferentes niveles de inhibición de cepas de bifidobacterias contra *Ec* y *St*. Jurado *et al.* (2009) reportan efecto inhibitorio en el crecimiento de *Ec* y otras cepas patógenas pero no contra *St*, de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos. Rodríguez *et al.* (2008) reportan la inhibición en el crecimiento de *Ec* con *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*.

Se ha descrito la acción antagónica de *Lactobacillus salivarius* (Svetoch *et al.*, 2011; Messaoudi *et al.*, 2013; Rondon *et al.*, 2013) y *Enterococcus faecium* (Nascimento *et al.*, 2010; Enan *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2015) contra diversos patógenos.

**Cuadro 19. Inhibición de bacterias enteropatógenas.**

Tratamiento	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
T1	+	+
T2	±	+
T3	+	+
T4	++	+
T5	±	+
T6	++	++
T7	+	++
T8	+	+
T9	++	++
T10	++	+

*Ls=Lactobacillus salivarius, Ef=Enterococcus faecium, Lc=Lactobacillus casei.*

T1=MRS-glucosa+*Ls*, T2=MRS-glucosa+*Ef*, T3=MRS-glucosa+*Lc*, T4=MRS-inulina+*Ls*, T5=MRS-inulina+*Ef*, T6=MRS-inulina+*Lc*, T7=MRS-inulina+*Ls*+*Ef*, T8=MRS-inulina+*Ls*+*Lc*, T9=MRS-inulina+*Ef*+*Lc* y T10=MRS-inulina+*Ls*+*Ef*+*Lc*.

Inhibición (halo)= ±< 2mm, += 2mm, ++> 3mm.

## 7. CONCLUSIONES

Las cepas identificadas inicialmente como *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* fueron confirmadas mediante técnicas moleculares.

El crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* en medio MRS-inulina fue mejor que el registrado en medio MRS-glucosa. El crecimiento *in vitro* en medio con inulina de monocultivos y cocultivos fue similar. La presencia de inulina en el medio MRS redujo la producción de ácido láctico pero favoreció la producción de amonio por *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*. La presencia de inulina en el medio no afectó la tasa de supervivencia de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* en exposición a ácido clorhídrico y sales biliares. El antagonismo de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* contra el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* no fue afectado por la presencia de inulina en el medio.

Con base en la curva de crecimiento y al conteo de unidades formadoras de colonias, se observa que la inulina genera un efecto estimulante en el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* sin alterar su capacidad probiótica; por lo cual la inulina es un prebiótico.

## 8. LITERATURA CITADA

- Acurcio L.B., Souza M.R., Nunes A.C., Oliveira D.L.S., Sandes S.H.C. and Alvim L.B. 2014. Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66(3):940-948.
- Amorocho Cruz Claudia Milena. 2011. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra Tesis Doctoral. Departamento de Biotecnología. Universitat Politècnica de València. 253 p.
- Andoh A. and Fujiyama Y. 2006. Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroent.* 12(28):4452-4460.
- Apolinário A.C., Damasceno B.P.G.L., Beltrão N.E.M., Pessoa A., Converti A. and Silva J.A. 2013. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydr. Polymers.* 48 p.
- Bazay D.G. 2010. Uso de los probióticos en la alimentación animal con énfasis en *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Elec. Unidad de Postgrado. Sist. Rev. Inv. Vet. de San Marcos.* 12 p.
- Bicknell E.J. and Noon T.H. 1993. Neonatal calf diarrhea. *Animal Care and Health Maintenance. Arizona Ranchers Management Guide.* pp. 19-24.
- Biedrzycka, E and M Bielecka. 2004. Prebiotics effectiveness of fructanos of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci. Technol.* 15:170-175.
- Bosscher D., Van Loo J. and Franck A. 2006. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. *Nut. Res. Rev.* 19:216-226.
- Brambila P.J., Mora F.S., Rojas R.M. y Pérez C.V. 2013. El precio mínimo al productor primario de leche para reducir las importaciones de lácteos en México. *Agrociencia.* 47:511-522.

- Caballero C.Y. 2014. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado de Ganadería. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 74 p.
- Chi Z.M., Zhang T., Cao T.S., Liu X.Y., Cui W. and Zhao C.H. 2011. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, 102:4295-4303.
- Constable P.D. 2004. Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.* 18:8-17.
- Cruywagen C.W., Jordaan I. and Venter L. 1996. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *J. Dairy Sci.* 79:483-486.
- Das K., Tiwari R.K.S. and Shrivastava D.K. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J. Medicinal Plants Res.* 4(2):104-111.
- De las Cagigas R.A.L. y Blanco A.J. 2002. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Rev. Cubana Alim. Nut.* 16:63-68.
- Desai A.R., Powell I.B. and Shah N.P. 2004. Survival and activity of probiotic lactobacilli in skim milk containing prebiotics. *J. Food Sci.* 69(3):fms57-fms60.
- Desai A. 2008. Strain identification, viability and probiotic properties of *Lactobacillus casei*. *School of biomedical and health science.* 8:68-75.
- Dixit G., Samarth D., Tale V. and Bhadekar R. 2013. Comparative studies on potential probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* strains. *EurAsian J. BioSciences.* 7:1-9.
- Donovan D.C., Franklin S.T., Chase C.C.L. and Hippen A.R. 2002. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or enteroguard. *J. Dairy Sci.* 85:947-950.
- Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M.,

- Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G.C., Shanahan F. and Collins J.K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. *American J. Clinical Nut.* 73:386s-392s.
- Enan G., Al-Mohammadi A.R., El-Didamony G., Abdel-Haliem M.E.F. and Zakaria A. 2014. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* NM<sub>2</sub> isolated from urine: purification, characterization and bacterial action of enterocin NM<sub>2</sub>. *Asian J. App. Sci.* 7(7):621-634.
- FAO. 2013. Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en México 2012. ([www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications)). E-ISBN (PDF) 978-92-5-307623-9. 240 p.
- Flamm G., Glinsmann W., Kritchevsky D., Prosky L. and Roberfroid M. 2001. Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Rev. Food Sci. Nut.* 41(5):353-362.
- Flinckinger, E A, J Van Loo and G C Fahey. 2003. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43(1):19-60.
- Franck A. 2002. Technological functionality of inulin and oligofructose. *British J. Nutr.* 87(2):s287-s291.
- Galvão K.N., Santos J.E.P., Coscioni A., Villaseñor M., Sicho W.M. and Berge A.C.B. 2005. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:427-440.
- Gasque G.R. 2008. Cría de becerras lecheras. En: *Enciclopedia Bovina*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. pp. 45-75.
- García M.E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3<sup>a</sup> ed. México, D.F. UNAM. Instituto de Geografía. 217 p.
- García Y., López M.G., Bocourt R., Rodríguez Z., Urias J. y Herrera M. 2012.

- Fermentación *in vitro* del extracto de *Agave fourcroydes* (henequén) por bacterias ácido lácticas. Rev. Cubana Ciencia Agrícola. 46(2):203-209.
- Gibson G.R. 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. J Nutr. 129:1438S-1441S.
- Gibson G.R. and Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125:1401-1412.
- Goderska K., Nowak J. and Czarnecki Z. 2008. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 7(2):5-20.
- Guevara J. 2011. Probióticos en nutrición animal. Revista electrónica de la Unidad de Posgrado. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 10 p.
- Hassanpour A., Mousavi G. and Amoughli T.B. 2007. The effect of different management systems on the occurrence of diarrhea in calves. In: Proceedings of the international congress on animal hygiene 1:452-455. XIII International Congress in Animal Hygiene. Tartu, Estonia, 2007.
- Jurado G.H., Aguirre F.D. y Ramírez T.C. 2009. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. Rev. MVZ Córdoba. 14(2):1723-1735.
- Kaplan H. and Hutkins R.W. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. App. Envir. Microb. 66(6): 2682-2684.
- Kaplan H. and Hutkins R.W. 2003. Metabolism of Fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. App. Envir. Microb. 69(4):2217-2222.
- Kareem K.Y., Ling F.H., Chwen L.T, Foong O.M. and Asmara S.A. Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. Gut Path. 6(23):1-7.



- Kaufhold J., Hammon H.M. and Blum J.W. 2000. Fructo-oligosaccharide supplementation: effects on metabolic, endocrine and hematological traits in veal calves. *J. Vet. Med. A* 47:17-29.
- Kehoe S. and Heinrichs J. 2005. Electrolytes for dairy calves. Department of Dairy and Animal Science. The Pennsylvania State University. DAS 05-104.
- Khuntia A. and Chaudhary L.C. 2002. Performance of male crossbred calves as influenced by substitution of grain by wheat bran and the addition of lactic acid bacteria to diet. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15(2):188-194.
- Kiss, A and P Forgo. 2011. Investigations on inulin-type oligosaccharides with regard to HPLC analysis and prospective food applicability. *Monatsh Chem.* 142:547-553.
- Kneifel W., Rajal A. and Kulbe K.D. 2000. *In vitro* growth behaviour of probiotic bacteria in culture media with carbohydrates of prebiotic importance. *Microbial Ecol. Health Disease.* 12:27-34.
- Konstantinov S.R., Zhu W.Y., Williams B.A., Tamminga S., de Vos W.M. and Akkermans A.D.L. 2003. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43:225-235.
- Kowalski Z.M., Górka P., Schlagheck A., Jagusiak W., Micek P. and Strzetelski J. 2009. Performance of holstein calves fed milk-replacer and starter mixture supplemented with probiotic feed additive. *J. Animal Feed Sci.* 18:399-411.
- Kunová G., Rada V., Lisová I., Ročková S. and Vlková E. 2011. *In vitro* fermentability of prebiotic oligosaccharides by lactobacilli. *Czech J. Food Sci.* 29(Special Issue):s49-s54.
- Lesmeister K.E., Heinrichs A.J. and Gabler M.T. 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 87:1832-1839.

- Lorenz I., Fagan J. and More S.J. 2011 .Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. Irish Vet. J. 64:9. 6 p.
- Madrid J., Martínez-Teruel A., Hernández F. and Megías M.D. 1999. A comparative study on determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. J. Sci. Food Agric. 79:1722-1726.
- Madrigal L. y Sangronis E. 2007. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Arch. Lat. Nut. 57(4):387-396.
- Magalhães V.J., Susca F., Lima F.S., Branco A.F., Yoon I. and Santos J.E. 2008. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. J. Dairy Sci. 91:1497-1509.
- Makras L., Van Acker G. and De Vuyst L. 2005. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. Appl. Environ. Microbiol. 71(11):6531-6537.
- Masanetz S., Preißinger W., Meyer H.H.D. and Pfaffl M.W. 2011. Effects of the prebiotics inulin and lactulose on intestinal immunology and hematology of preruminant calves. Animal. 5(7):1099-1106.
- McCullough H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. Clin. Chem. 17:297-304.
- Mejía R.J.A., Chacón R.Z., Guerrero C.B., Rojas J.O. y López C.G. 2007. Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización *in vitro* como potenciales probióticas. Revista Científica FCV-LUZ. 17(2):178-185.
- Messaoudi X., Manai M., Kergourlay G., Prévost H., Connil N., Chobert J.M. and Dousset X. 2013. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. Food Microbiology, 36:296-304.
- Millemann Y. 2009. Diagnosis of neonatal calf diarrhea. Revue Méd. Vét. 160(8-9):404-409.

- Monroy D.M.C., Castro B.T., Fernández P.F.J. y Mayorga R.L. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*. 73:63-72.
- Nagashima K., Yasokawa D., Abe K., Nakagawa R., Kitamura T., Miura T. and Kogawa S. 2010. Effect of a *Lactobacillus* species on incidence of diarrhea in calves and change of the microflora associated with growth. *Biosci. Microflora*. 29(2):97-110.
- Narakaew T., Pilasombut K., Ngamyeesoon N. and Swetwiwathana A. 2010. Preliminary characterization of *Lactobacillus salivarius* K7 for probiotic properties. *KKU Res. J.* 15(9):878-888.
- Nascimento M.S., Moreno I. and Yoshiteru K.A. 2010. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* fair-e 198 against gram-positive pathogen. *Brazilian J. Microbiol.* 41:74-81.
- Naughton P.J., Mikkelsen L.L. and Jensen B.B. 2001. Effects of nondigestible oligosacchrides on *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium and nonpathogenic *Escherichia coli* in the pig small intestine *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3391-3395.
- Nazzaro F., Fratianni F., Nicolaus B., Poli A. and Orlando P. 2012a. The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe*. 18:280-285.
- Nazzaro F., Fratianni F., Orlando P. and Coppola R. 2012b. Biochemical traits, survival and biological properties of the probiotic *Lactobacillus plantarum* grown in the presence of prebiotic inulin and pectin as energy source. *Pharmaceuticals*. 5:481-492.
- NDHEP-National Dairy Heifer Evaluation Project. 1994. Dairy heifer morbidity, mortality, and health management focusing on preweaned heifers. Centers for Epidemiology

and Animal Health. USDA: APHIS:VS. 22 p.

Niness K.R. 1999. Inulin and Oligofructose: What Are They? J. Nutr., 129:1402S-1406S.

Ocampo L., Sumano H. y Gutiérrez L. Síndrome diarreico neonatal. Disponible en Internet:  
[http://www.buiatriaecuador.org/memorias/farmacologia/images/memorias/11\\_SINDROME\\_DIARREICO.pdf](http://www.buiatriaecuador.org/memorias/farmacologia/images/memorias/11_SINDROME_DIARREICO.pdf)

Olson D.W. and Aryana K.J. 2012. Effect of prebiotics on *Lactobacillus acidophilus* growth and resulting pH changes in skim milk and a model peptone system. J. Microbiol. Biochem. Technol. 4:121-125.

Ramos G.J., Figueroa V.C., Enríquez A.I., Quintero E.J. y Trillo M.V. 2013. Comparación de dos sustitutos de leche en la sala de crianza de un establo comercial. CULCyT//Enero-Abril, Año 10, No 49: Especial No 1. 9 p.

Roberfroid M. 2000. Prebiotics and probiotics: Are they functional foods. J. Clin. Nutr. 71 (6):1682-1687.

Roberfroid M.B. 2005. Introducing inulin-type fructans. British J. Nutrition. 93:s13-s25.

Roberfroid M.B. 2007. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. J. Nutr. 137(11S):2493s-2502s.

Rodríguez O., Perea J., Martín Y., Fernández M., Padrón I. y Núñez de Villavicencio M. 2008. Evaluación *in vitro* de resistencia de bacterias lácticas a la barrera gástrica y biliar de cerditos y a enterobacterias patógenas. Rev. Comp. Prod. Porcina. 15(3):277-281.

Rondón A.J., Ojito Y., Arteaga, F.G., Laurencio M., Milián G. and Pérez Y. 2013. Probiotic effect of *Lactobacillus salivarius* C 65 on productive and health indicators of lactating piglets. Cuban J. Agric. Sci. 47(4):401-407.

Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanoni S. and Matteuzzi D. 2005. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. Appl. Environ. Microbiol. 71:6150-

6158.

- SE. 2012. Análisis del sector lácteo en México. Secretaría de Economía. Dirección General de Industrias Básicas. 29 p.
- Saminathan M., Sieo C.C., Kalavathy R., Abdullah N. and Ho Y.W. 2011. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. African J. Microbiol. Res. 5(1):57-64.
- Saranraj P., Naidu M.A. and Sivasakthivelan P. 2013. Lactic acid bacteria and its antimicrobial properties: A review. International J. Pharm. Biol. Arch. 4(6):1124-1133.
- Smetanková J., Hladíková Z., Valach F., Zimanová M., Kohajdová Z., Greif G. and Greifová M. 2012. Influence of aerobic and anaerobic conditions on the growth and metabolism of selected strains of *Lactobacillus plantarum*. Acta Chimica Slovaca, 5(2):204-210.
- Soto L.P., Frizzo L.S., Bertozzi E., Avataneo E., Sequeira G.J. and Rosmini M.R. 2010. Molecular microbial analysis of *Lactobacillus* strains isolated from the gut of calves for potential probiotic use. Vet. Med. Internat. Volume 2010. 7 p.
- Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Levchuk V.P., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P, Stepanshin J., Dyatlov I., Seal B.S. and Stern N.J. 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. App. Environ. Microbiol. 77(8):2749-2754.
- Tagg J.R., Dajani A.S. and Wannamaker L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40(3):722-756.
- Taylor A.C.C.K. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl. Biochem. Biotech. 56:49-58.
- Van Loo J., Coussement P., De Leenheer L., Hoebregs H. and Smits G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet, Critic.

Rev. Food Sci. Nutr. 35:525-552.

Vélez Z.J.M., Gutiérrez R.L.A. y Montoya C.O.I. 2015. Evaluación de la actividad bactericida de bacterias ácido lácticas aisladas en calostro de cerdas frente a *Salmonella typhimurium*. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 68(1): 7481-7486.

Verdonk J.M.A.J. and Van Leeuwen P. 2004. The application of inulin type fructans in diets for veal calves and broilers. In: Inulin and Oligofructose Feed Good Factors for Health and Well Being. 4th Orafti Research Conference, Paris.

Verdonk J.M.A.J., Shim S.B., Van Leeuwen P. and Verstegen M.W.A. 2005. Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. British J. Nutr. 93:s125-s138.

Vitela I., Cruz C. y Ramos M. 2004. Identificación de las causas de desecho en cinco establos lecheros de Aguascalientes. Técnica Pecuaria en México, 42(3):437-445.

Wang X. and Gibson G.R. 1993. Effect of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. J. Appl. Bacteriol. 75(4):373-380.

Wattiaux M.A. (Sin fecha). Crianza de terneras del nacimiento al destete alimentando heno, concentrados y agua. En: Esenciales Lecheras. Instituto Babcock para la investigación y desarrollo internacional de la industria lechera. Universidad de Wisconsin-Madison. pp. 117-120.

Widodo N.S.A., Taufiq T.T. and Wahyuningsih T.D. 2014. Evaluation of two *Lactobacillus* strains as probiotics with emphasis in utilizing prebiotic inulin as energy source. Int. Res. J. Microbiol. 5(3):33-40.

Wilson D. 2009. How much evidence is there for the most effective treatments for common calf diseases? Dairy Veterinary Newsletter. Utah State University, 6 p.

Winarti S., Harmayani E., Marsono Y. and Pranoto Y. 2013. Effect of inulin isolated from lesser yam (*Dioscorea esculenta*) on the growth of probiotics bacteria and SCFA formation during fermentation. Int. Res. J. Microbiol. 4(2):53-63.

- Windschitl P.M., Randall K.M. and Brainard D.J. 1991. Growth performance of Holstein dairy calves supplemented with a probiotic. Res. Progress Report. 22: 1-4.
- Zheng W., Yu Zhang Y., Lu H.M., Li D.T., Zhang Z.L., Tang Z.X. and Shi L. 2015. Antimicrobial activity and safety evaluation of *Enterococcus faecium* KQ 2.6 isolated from peacock feces. BMC Biotech. 15(30):1-8.
- Zinedine A. and Faid M. 2007. Isolation and characterization of strains of bifidobacteria with probiotic proprieties *In vitro*. World J. Dairy Food Sci. 2(1):28-34.