

CAPÍTULO 7

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS NATIVAS EN TERNEROS ROMOSINUANO

Adrián Benito Revollo Pérez¹⁸
Jhoan Alonso Cardona Doria¹⁹

18 Biólogo. Especialista en Pedagogía ambiental. Maestría en Biotecnología

19 Biólogo. Maestría en Biotecnología. Profesor en la Universidad de Córdoba

Introducción

El ganado criollo Romosinuano (*Bos taurus*) debe su nombre a la carencia de cuernos (topo o romo) y lugar de origen, el Valle del río Sinú, costa norte de Colombia. Se le identifica como el criollo tipo carne, con uno de los mejores rendimientos en canal alrededor del 60% siendo la raza criolla colombiana la más apetecida en el exterior y además que constituye la base genética criolla de otras razas. La importancia del ganado criollo radica en la adaptabilidad lograda durante más de cuatro siglos: en su rusticidad, utilización eficiente de los alimentos bastos y pobres, fertilidad, resistencia y longevidad. (Bedoya et al., 2016; Pinzón, 1984).

Actualmente, la ganadería mundial afronta grandes oportunidades debido al aumento de la población mundial, la cual ya supera los 7500 millones de habitantes en el 2017 según el Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFPA, 2018). La participación de Colombia en la producción mundial de carne es solo del 1,4 %, ocupando el puesto doce entre los países de mayor producción de carne para el año 2013, y el tercer puesto en América latina detrás de Brasil y Argentina (FEDEGÁN-FNG, 2015). Sin embargo, se aleja cada vez más de los índices productivos de carne de los países industrializados tanto en volumen como en calidad, debido al manejo primario que se le ha dado a la parte nutricional de la ganadería en Colombia, haciendo que la producción de leche y carne sea ineficiente (Lombana et al., 2012).

El departamento de Sucre basa su economía principalmente en la ganadería y no es ajeno a la problemática nacional y al difícil entorno que ha caracterizado la producción agropecuaria y ganadera en la costa caribe en los últimos años. La mala calidad de los pastos de forraje y la contaminación de las aguas, hacen que disminuyan las colonias de bacterias benéficas presentes en el intestino del animal, que permiten desdoblarse los alimentos y mantenerlo saludable (FEDEGAN, 2014).

En la última década, se han desarrollado múltiples investigaciones con base en el estudio de dietas adecuadas que mejoren la nutrición en el animal. Los antibióticos son utilizados frecuentemente para eliminar microorganismos patógenos en animales de producción Bovina, con el propósito de prevenir o tratar enfermedades y favorecer el crecimiento del animal. Sin embargo, el problema del uso radica en que trazas quedan en la carne y en el suelo tras las deposiciones afectando la biota nativa del suelo causando graves daños ambientales. Otro efecto del uso de antibióticos es que elimina la microbiota intestinal benéfica del bovino, causando el mal funcionamiento de su sistema digestivo y produciendo deficiencias de minerales en los huesos y en los tejidos desarrollando mastitis, descalcificación, infertilidad posparto, retención de líquidos y tejidos de la placenta que producen endometritis, lo cual lleva a un alto índice de mortandad de cabezas de ganado al año, disminuyendo la producción de carne de buena calidad (Vargas et al., 2004). Como alternativa a estos problemas se ha sugerido el uso de probióticos para promover el balance de la microbiota intestinal y obtener mayor nivel de producción minimizando costos.

En este sentido, el uso de aditivos microbianos (Probióticos) constituye una alternativa viable para mantener la salud, promover el crecimiento en animales jóvenes, incrementar la eficiencia de utilización del alimento en el ganado vacuno; remplazar o reducir el uso de antibióticos, mejorar la calidad de la leche y carne; en general los aditivos microbianos según la World Health Organization (WHO) y Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2001), son todos aquellos microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del hospedero, llamados también probióticos. Los probióticos constituyen un grupo amplio de aditivos que incluye cultivos de bacterias y hongos (Carro et al., 2014).

Sin embargo, en Colombia los productos probióticos comercializados tienen un alto costo. Además, son importados por lo que los microorganismos contenidos en el producto no poseen la especificidad a la especie o al ambiente, constituyéndose en un factor importante que interfiere en la adhesión y colonización *in vivo* de los microorganismos probióticos (Frizzo et al., 2006). Como resultado los ganaderos no obtienen los beneficios esperados. Por estas razones, se hace necesario obtener microorganismos

probióticos nativos y específicos a la especie, con el fin de producir como alternativa biotecnológica natural un biopreparado o aditivo probiótico que mejore el metabolismo animal aumentando la proliferación de la microbiota ruminal, aumentando el flujo de proteína bacteriana y de ácidos grasos volátiles (AGV) que al ser metabolizados por el animal generan mayor ganancia de peso, lo cual ha sido siempre la meta para los productores ganaderos del departamento de Sucre. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar las características probióticas in vitro de microorganismos nativos aislados de muestras de heces de terneros Romosinuano en el departamento de Sucre.

Metodología

Ubicación Geográfica: la fase de campo de este estudio se realizó en el departamento de Sucre en dos fincas pertenecientes a las subregiones del Morrosquillo y a la Subregión San Jorge en donde se seleccionaron terneros en etapa de levante entre 6 a 12 meses de raza Criolla Colombiana Romosinuano para posteriormente realizar el muestreo.

Recolección de muestras: se colectaron pool de heces bovinas en edades entre los 6 a 12 meses en pastoreo y sin ser tratadas con antibióticos por lo menos 3 meses antes. Inmediatamente las muestras fueron depositadas en matraces previamente esterilizados de 250 ml con una capa de aceite mineral estéril en anaerobiosis y se transportó al laboratorio de Biotecnología GRUBIODEQ de la Universidad de Córdoba (8° 47' 16.01" N, 75° 51' 28.08" W) para el aislamiento y caracterización de los microorganismos. (Lara y Cardona, 2013)

Aislamiento de los Microorganismos: a partir de las muestras recolectadas, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} hasta 10^7) en solución salina (NaCl al 0,85%) y se sembraron 0,1mL por placa utilizando medios selectivos, Agar de Man, Rugosa, Sharpe (MRS) para (*Lactobacillus* sp.) y Nutritivo modificado con CMC y Almidón al 0,1% (*Bacillus* sp), se incubaron durante 48 horas a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de dióxido de carbono (CO_2). Posteriormente, en cada cepa aislada se les realizó tinción de Gram y tinción de endosporas (método de wirtz). A partir de los resultados se subcultivaron las colonias hasta obtener cultivos puros, una vez obtenidos nuevamente se sembraron las colonias en 10 mL de caldo MRS y Nutritivo modificado para su crecimiento y conservación. (Lara y Cardona, 2013).

Evaluación *in vitro* de las características probióticas: a una concentración conocida inóculo (106 Ufc/mL) de cada uno de los microorganismos se les realizaron las siguientes pruebas:

- **Tolerancia a sales biliares:** el ensayo se realizó a diferentes concentraciones de sales 0,05; 0,1; 0,15 y 0,3%p/v a pH de 6,5±0,2; se inoculó 100µl de cultivo de los aislados, e incubó a 30°C por 48 horas; al cabo de este tiempo la sobrevivencia y resistencia a sales biliares se comprobó mediante la determinación del número de células viables (ufc/mL) (Ávila et al., 2010; Rondón et al., 2008).

- **Tolerancia a cambios de pH:** en cada uno de los caldos MRS y Nutritivo modificado, se le adiciono solución HCl (5%) para obtener variaciones de pH: 3,0; 4,0; 5,6 y 7,0±0,2; se tomó 1 mL de cada cultivo (concentración conocido de cepas a ensayar) y se inoculo en los medios, luego se incubo a 30°C durante 48 horas; pasado este tiempo se realizó conteo de células viables (Ávila et al., 2010; Rondón et al., 2008).

- **Tolerancia a altas concentraciones de NaCl:** en caldos MRS y Nutritivo modificado, se adicionó NaCl a diferentes porcentajes (2, 4, 6, 8 y 10%p/v) se inocularon 0,1 ml de inoculó a cada aislado de forma independiente e incubaron a 37°C durante 48 horas. Se evaluó el crecimiento mediante densidad óptica (DO) a 600nm en un espectrofotómetro Genesys 20. (Rondón et al., 2008).

- **Prueba de Antagonismo:** se evaluó el efecto antagónico de los aislados contra *E. coli* y *Salmonella sp* pertenecientes al banco de cepas del laboratorio GRUBIODEQ por el método de difusión en disco en Agar Mueller Hinton Modificado (Rubio et al., 2008; Mejía et al., 2007; Leiva et al., 2004).

- **Fermentación de la Glucosa:** los aislados que superaron las pruebas probióticas fueron inoculadas en tubos con caldo MRS y Nutritivo modificado con 0,2%v/v de una solución acuosa de purpura de bromocresol al 0,5% y Campanas de Durham invertidas para capturar y revelar la producción de gas. Después de la inoculación se incubaron a 37°C durante 48 horas y se evaluó el cambio de color y la presencia de gas (Rondón et al., 2008).

- **Crecimiento a 40°C:** se evaluaron las diferentes cepas que superaron las pruebas probióticas a temperatura de 40±2°C, durante 48 horas; la sobrevivencia y resistencia a esta temperatura se comprobó

mediante la determinación del número de células viables (ufc/mL) (Yimin et al., 2005).

Identificación Bioquímica de las Bacterias Nativas con Potencial Probiótico: para la identificación bioquímica de las cepas bacterianas 12M B1 (cocos Gram+) aislada en medio MRS, 12M N2 y 9M N3 (Bacilos Gram+) que superaron las pruebas probióticas se les aplicó la prueba de catalasa (Bergey's, 1994).

Identificación molecular de la cepa 12MB1 mediante amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA: mediante los resultados obtenidos tras las diferentes pruebas probióticas y tras las pruebas de identificación bioquímica, se seleccionó uno de los aislados bacterianos (12MB1) que presentó las mejores características probióticas in vitro y que resultó negativo a las pruebas de catalasa.

Extracción del DNA Genómico: para la extracción del DNA genómico se utilizó el kit comercial QIA amp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Corporation). Siguiendo las instrucciones del fabricante.

PCR y Amplificación: para la PCR se utilizó la mezcla lista (PCR-100-2X) producida por CorpoGen y los iniciadores antes mencionados a una concentración 0.2 μ M. El volumen de la PCR fue de 50 μ L. Se amplificó por PCR una región de 1465 pb del gen ribosomal 16s, para esto se utilizaron los cebadores 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'), 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') (Tajabadi et al., 2013).

Electroforesis: el ADN purificado y los productos amplificados por PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% (p/v) en tampón Tris-Acetato-EDTA y selección de los más concentrados para enviar a secuencia.

Purificación del fragmento amplificado: para la purificación se utilizó el KIT MinElute Gel Extraction Kit de QIAGEN Corporation. Siguiendo las instrucciones del fabricante. (QIAGEN).

Secuenciación del DNA: los productos de PCR una vez purificados fueron enviados para su secuenciación a la empresa Macrogen. (Macrogen Inc., Seoul, South Korea).

Análisis bioinformático: la secuencia obtenida fue ensamblada y alineada en una secuencia consenso problema en el programa MEGA versión 6.0, para la identificación del microorganismo aislado. El análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada, se realizó mediante la comparación con secuencias incluidas en las bases de datos GenBank de

NCBI (National Center for Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project), teniendo en cuenta las puntuaciones de identidad y cobertura por encima del 94%. Se generó un árbol filogenético con el grupo de secuencias con mayor similitud a la secuencia consenso y la comparación con un grupo externo.

Conservación de la cepa probiótica: finalmente, las cepas identificadas con potencial probiótico se conservaron a -20°C con glicerol al 50 % como agente Crioprotector hasta su posterior utilización en busca de producir un biopreparado probiótico que mejore los sistemas productivos ganaderos del departamento de Sucre.

Diseño y análisis estadístico.

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con tres repeticiones por tratamiento. Los resultados obtenidos se sistematizaron y analizaron en el software Statgraphics Centurion XVI. Se comprobó la homogeneidad de varianza por el método de Bartlett y el test de normalidad de Shapiro-wilk; luego, se realizó análisis de varianza (ANOVA) dentro de cada concentración y para cada cepa aislada, con el fin de comparar los tratamientos. Cuando hubo diferencias significativas se realizó la prueba de múltiples rangos por el método de Tukey al 95 % de confianza, además de métodos gráficos de representación de resultados.

Aislamiento de los microorganismos.

Se colectó un pool de heces bovinas de 10 individuos sanos hembras

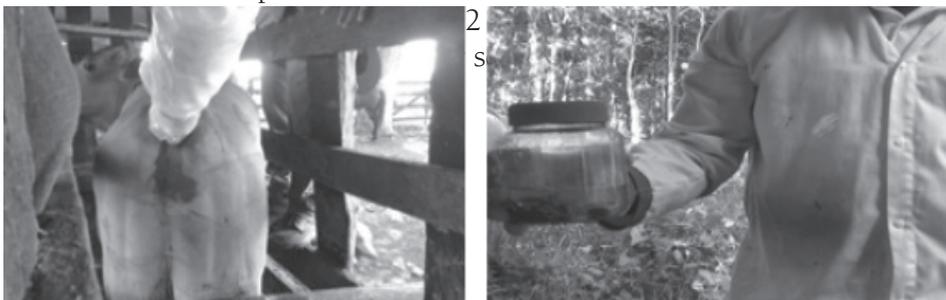


Figura 1. Recolección de muestras de un ternero en levante Romosinuano con 12 meses de edad (A). Matraz con aceite mineral estéril y pool de heces (B).

A partir de las muestras recolectadas, se lograron aislar y preseleccionar 5 cepas ácido lácticas (BAL) que crecieron tras diluciones de las muestras en medio MRS y 6 cepas de *Bacillus* sp que crecieron tras diluciones de las muestras en medio nutritivo suplementado con CMC y Almidón.

Evaluación in vitro de las características probióticas.

La Tabla 1, muestra los resultados de la evaluación in vitro de las características probióticas de las 5 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) y 6 cepas del género aisladas *Bacillus* sp de heces de terneros Romosinuano frente a diferentes concentraciones de sales biliares, pH y NaCl a 48 horas. De los resultados obtenidos, se hizo el análisis de varianza (ANOVA) dentro de cada concentración y para cada cepa aislada, con el fin de comparar los tratamientos. Cuando hubo diferencias significativas se realizó la prueba de múltiples rangos por el método de Tukey al 95 % de confianza.

Tabla 1. Promedio crecimiento ($\log_{10} \text{ufc/mL}$) de las cepas aisladas frente a las diferentes concentraciones de sales biliares; diferentes valores de pH y diferentes concentraciones de NaCl con intervalos de confianza del 95,0%.

CEPAS (Código)	[inóculo]	CONCENTRACIONES DE SALES BILIARES (%)					VALORES DE pH				CONCENTRACIONES DE NaCl (%)				
		0,05	0,10	0,15	0,30	3	4	5,6	7	2	4	6	8	10	
12M B1	8,422	8,068 <i>b</i>	8,068 <i>b</i>	7,278 <i>abc</i>	8,5046 <i>a</i>	6,848 <i>ab</i>	5,442 <i>b</i>	7,998 <i>b</i>	7,903 <i>ab</i>	1,019 <i>ab</i>	0,919 <i>b</i>	0,345 <i>c</i>	0,284 <i>c</i>	0,193 <i>a</i>	
12M B2	8,155	6,573 <i>abc</i>	6,573 <i>abc</i>	8,079 <i>abc</i>	6,065 <i>ab</i>	5,987 <i>ab</i>	2,566 <i>c</i>	8,213 <i>b</i>	8,098 <i>ab</i>	1,124 <i>b</i>	0,918 <i>b</i>	0,317 <i>c</i>	0,31 <i>ab</i>	0,184 <i>b</i>	
9MB1	8,380	8,1 <i>b</i>	8,1 <i>b</i>	6,815 <i>abc</i>	7,974 <i>b</i>	0 <i>C</i>	6,894 <i>b</i>	8,210 <i>b</i>	8,226 <i>b</i>	0,374 <i>c</i>	0,335 <i>c</i>	0,245 <i>c</i>	0,215 <i>c</i>	0,182 <i>ab</i>	
9MB2	8,473	3,236 <i>c</i>	3,236 <i>c</i>	8,325 <i>b</i>	0 <i>c</i>	6,205 <i>ab</i>	5,987 <i>b</i>	8,047 <i>b</i>	3,900 <i>c</i>	1,005 <i>ab</i>	0,901 <i>ab</i>	0,675 <i>ab</i>	0,359 <i>ab</i>	0,182 <i>ab</i>	
9MB3	8,255	6,817 <i>abc</i>	6,817 <i>abc</i>	4,217 <i>ab</i>	6,778 <i>ab</i>	0 <i>c</i>	2,76 <i>c</i>	6,765 <i>c</i>	7,977 <i>ab</i>	0,873 <i>c</i>	0,634 <i>c</i>	0,303 <i>c</i>	0,14 <i>c</i>	0,13 <i>c</i>	
12M NI	7,477	5,512 <i>abc</i>	5,512 <i>abc</i>	7,458 <i>abc</i>	7,032 <i>ab</i>	6,285 <i>ab</i>	5,321 <i>c</i>	8,241 <i>b</i>	7,220 <i>ab</i>	0,388 <i>c</i>	0,298 <i>c</i>	0,247 <i>c</i>	0,138 <i>c</i>	0,114 <i>c</i>	
12M N2	8,430	8,25 <i>a</i>	8,25 <i>a</i>	8,190 <i>ab</i>	7,637 <i>ab</i>	7,012 <i>b</i>	7,151 <i>a</i>	8,376 <i>a</i>	8,581 <i>a</i>	0,379 <i>c</i>	0,29 <i>c</i>	0,163 <i>c</i>	0,137 <i>c</i>	0,107 <i>c</i>	
9M N1	8,149	6,099 <i>abc</i>	6,09 <i>abc</i>	6,24 <i>abc</i>	4,52 <i>c</i>	0 <i>c</i>	0 <i>c</i>	0 <i>c</i>	8,091 <i>ab</i>	0,695 <i>c</i>	0,283 <i>c</i>	0,195 <i>c</i>	0,181 <i>c</i>	0,133 <i>c</i>	
9M N2	8,255	6,260 <i>abc</i>	6,26 <i>abc</i>	6,304 <i>abc</i>	7,849 <i>ab</i>	5,636 <i>c</i>	6,166 <i>b</i>	8,313 <i>a</i>	8,312 <i>b</i>	0,342 <i>c</i>	0,295 <i>c</i>	0,153 <i>c</i>	0,131 <i>c</i>	0,126 <i>c</i>	

9MN3	8,375	8,166 <i>b</i>	8,167 <i>b</i>	8,018 <i>abc</i>	8,28 <i>b</i>	7,229 <i>a</i>	7,149 <i>a</i>	8,157 <i>b</i>	8,391 <i>b</i>	0,534 <i>c</i>	0,441 <i>c</i>	0,406 <i>c</i>	0,176 <i>c</i>	0,124 <i>c</i>
9MN4	8,225	4,301 <i>c</i>	4,301 <i>c</i>	4,100 <i>c</i>	0 <i>c</i>	5,613 <i>c</i>	4,100 <i>ab</i>	6,763 <i>c</i>	4,619 <i>c</i>	0,312 <i>c</i>	0,292 <i>c</i>	0,3 <i>c</i>	0,257 <i>c</i>	0,127 <i>c</i>

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letras. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tolerancia a sales biliares. En la Tabla 1 se evidencia que el crecimiento en promedio de las cepas aisladas no se vio afectado significativamente ($p < 0,05\%$) por las concentraciones de sales biliares empleadas, solo la cepa 12MB1 aislada en medio MRS, presentó el mayor crecimiento a sales biliares 0,3% incluso por encima de la concentración con 0% de sales biliares inoculada para las pruebas, lo cual indica que esta cepa ácido láctica no solo tolera sino que aumenta el número de células frente a concentraciones altas de sales biliares, características propias de la especie de cocos Gram+ de la especie *Enterococcus faecium*, cepa aceptada y utilizada a nivel mundial como aditivo probiótico en la alimentación animal.

Resultados similares obtuvieron Liong y Shah, (2005); Ahn et al., (2003), quienes observaron que algunas cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* son capaces de producir la enzima conocida como sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas en ácidos biliares, glicina y taurina. Dos aislados no presentaron crecimiento a sales biliares 0,3% correspondiente a las cepas 9MB2 y 9MN4 (tabla 1), lo que indica que a esta concentración el efecto detergente de las sales biliares inhibe por completo su crecimiento. Mientras el resto de las cepas presentaron un crecimiento variado en cada una de las concentraciones de sales biliares utilizadas en este estudio, pero en cada una de las concentraciones hubo diferencias significativas ($p < 0,05\%$), encontrándose que la cepa 12MN2 mostró mayor crecimiento a concentraciones de 0,05% y 0,1% de sales biliares. Prasad et al., (1998) indica al respecto que las diferencias en la tolerancia al tránsito gastrointestinal pueden deberse a las diferencias existentes en la estructura de la pared celular de las distintas especies y géneros.

Tolerancia a cambios de pH. La resistencia a bajos valores de pH y a las sales biliares es de gran importancia en la supervivencia y crecimiento de las bacterias en el tracto gastrointestinal, por lo que se considera como

prerrequisito para evaluar a las posibles cepas probióticas. Ng et al., (2015), sostiene que los microorganismos deben ser capaces de tolerar pHs bajos para asegurar su transición del estómago al intestino y una vez se encuentre en el intestino, tenga la capacidad de adherirse a las células epiteliales.

Con respecto al crecimiento de las cepas aisladas en los distintos pHs, en la tabla 1 se muestra que el crecimiento es afectado significativamente ($p < 0,05\%$) por los niveles de pH, resultado similar a los reportados por Ng et al., (2015) y Ávila et al., (2010). Las cepas 9MN3 y 12MN2 presentaron un crecimiento superior para los diferentes niveles de pH 3,0 y 4,0 con respecto al resto de cepas. De igual manera, la cepa 12MN2 aislada en medio Nutritivo modificado presentó los valores más altos de tolerancia a pH 5,6 y 7,0 ($p < 0,05\%$). Esto sugiere que el máximo crecimiento de ambas cepas se encuentra enmarcados en estos niveles de pH. La cepa 12MB1 correspondiente a una bacteria ácido láctica (BAL) se destacó dentro su grupo por presentar diferencias significativas a pH 3,0 respecto al resto de cepas BAL. Los aislados 9MB1, 9MB3, 9MN1 no presentaron crecimiento a pH 3,0. La cepa 9MN1 mostró menor tolerancia a los niveles ácidos de todas las cepas evaluadas, sin presentar crecimiento a los pH de 3,0; 4,0 y 5,6; sin embargo, experimentó un incremento significativo ($p < 0,05$) por encima del inóculo a pH 7,0. Lo anterior, es indicativo de una baja tolerancia de esta cepa a condiciones ácidas y óptimo crecimiento a condiciones de neutralidad. Todas las cepas presentaron un comportamiento similar en el crecimiento al definir tres grupos estadísticamente diferentes, los cuales corresponden a un mayor crecimiento para los niveles de pH 5,6 y 7,0 estudiados, similar al rango de pH óptimo del rumen el cual se sitúa entre 5,5 y 6,9 que podría sugerir la capacidad de estas cepas de alcanzar y colonizar esta área beneficiosa del animal (McSweeney y Mackie, 2012).

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Ng et al., (2015), quienes evaluaron el potencial probiótico de cepas ácido lácticas aisladas de un fermentado tradicional de Malasia llamado Bambang (Mangifera pajang), Estos autores proponen mejorar la tolerancia al ácido utilizando algunos protectores naturales dentro del producto consumido, tales como proteínas y grasas encontradas en muchos productos lácteos (Livney, 2010). Además, sostienen que la mayoría de los alimentos portadores de probióticos poseen pH mayor que 3,0. Por lo tanto, la ligera reducción de la viabilidad de las cepas ensayadas no afectaría su idoneidad para ser considerados probióticos.

Tolerancia a altas concentraciones de NaCl. Se obtuvo un efecto significativo ($p < 0,05\%$) de las diferentes concentraciones de NaCl sobre

el crecimiento de las cepas evaluadas, siendo el crecimiento de las cepas inversamente proporcional a las concentraciones de NaCl (tabla 1). A medida que aumentan la concentración de NaCl disminuye el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, todos los aislados mostraron tolerancia a las diferentes concentraciones de NaCl empleadas en este estudio. Los promedios más altos de densidad óptica a 600nm a la máxima concentración de 10% de NaCl los presentaron las cepas de bacterias ácido lácticas 12MB1 y 12MB2, hallándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a todas las cepas. Lo cual indica la capacidad que tienen estas cepas de adaptarse y sobrevivir a diferentes variaciones de NaCl y cambios de presión osmótica del rumen sin sufrir plasmólisis, ya que las concentraciones de 2% y 10% utilizadas en este estudio representan una osmolaridad entre 684 mOsm y 3400 mOsm respectivamente, lo cual según Van Lier y Regueiro (2008), la osmolaridad del líquido ruminal oscila entre 260 y 340 mOsm, pudiendo llegar a 400 mOsm con el consumo de concentrado. Por lo que este factor no afectaría significativamente a estos microorganismos a nivel de este órgano (Lara y Acosta, 2013).

Prueba de antagonismo. La actividad inhibitoria media (halos mm) de las cepas nativas aisladas frente a los patógenos *Salmonella sp* y *E. coli* se determinó por el método de difusión en disco en Agar Mueller Hinton (Rubio et al; 2008; Mejía et al; 2007; Leiva et al; 2004). Las cepas presentaron actividad antagónica frente a los patógenos *Salmonella sp* y *Escherichia coli*, en promedio hubo mayor actividad inhibitoria frente a *E. coli* que frente a *Salmonella sp* (Tabla 2). La capacidad antagónica hacia enterobacterias es uno de los criterios básicos para la selección de cepas para uso como probióticos en nutrición animal.

Tabla 2. Actividad antibacteriana de las cepas aisladas por el método de difusión en disco en Agar Mueller Hinton con su análisis de varianza (ANOVA).

CEPAS (Código)	Distancia de inhibición (mm) frente a patógenos bacterianos seleccionados	
	<i>Salmonella sp.</i>	<i>E. coli</i>
12M B1	4,866 abc	7,566 abc
12M B2	0 c	0 c
9M B1	0 c	0 c
9M B2	0 c	0 c

CEPAS (Código)	Distancia de inhibición (mm) frente a patógenos bacterianos seleccionados	
	<i>Salmonella sp.</i>	<i>E. coli</i>
9M B3	0 c	0 c
12M N1	6,533 abc	8,633 ab
12M N2	7,633 ab	6,6 c
9M N1	7,166 ab	7,0 c
9M N2	5,9 abc	8,3 ab
9M N3	6,666 abc	7,233 c
9M N4	6,366 abc	9,8 b
TOTAL	3.566	5,012

No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letras. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Dentro del grupo de cepas ácido lácticas solo hubo actividad inhibitoria por la cepa 12MB1 frente a *E. coli* y mínima frente a *Salmonella sp.*, cepa destacada en superar las pruebas in vitro de tolerancia a pH, sales biliares y NaCl. Por otro lado, las cepas aisladas en medio nutritivo modificado mostraron poca actividad inhibitoria frente a los patógenos siendo la cepa 9MN4 quien presento el mayor diámetro inhibitorio frente a *E. coli*.

La acción antagonica de la cepa ácido láctica 12M B1 se asocia a la capacidad que tienen la mayoría de este tipo de bacterias ácido-lácticas, de producir sustancias antagonicas tales como el ácido láctico, acético y otros compuestos volátiles como ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que favorecen a la reducción del pH del medio. Los bajos valores de pH son considerados como el principal factor en la inhibición del desarrollo de entero patógenos como *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* y *Campylobacter sp.* (Fayol, 2005; Chaveerach et al., 2002). Además, la acidificación del lumen intestinal acelera las reacciones bioquímicas de la digestión (Pérez et al., 2005). Según Ahn et al., (2002), aquellas bacterias que sean capaces de inhibir el crecimiento

de microorganismos patógenos y además de crecer en condiciones de pH y concentraciones de sales biliares similares a las del tracto digestivo del animal, son microorganismos con características promisorias para su posterior empleo como probióticos.

Fermentación de la glucosa. A los aislados que superaron las pruebas probióticas de tolerancia a diferente pH, sales biliares, altas concentraciones de NaCl y actividad antagonista; se determinó la capacidad de fermentación de glucosa mediante la producción de gas a las 48 horas (figura 2).

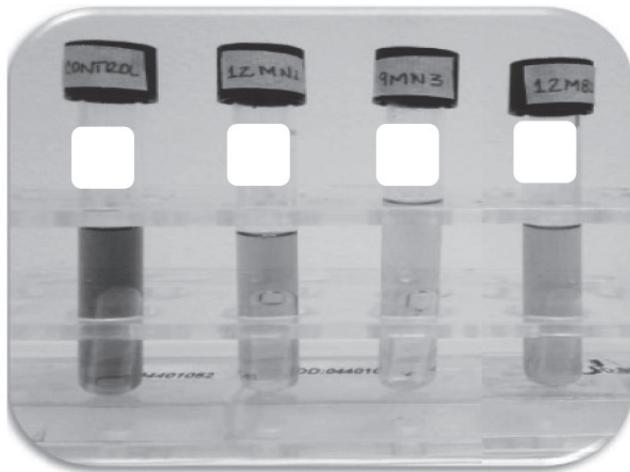


Figura 2. Capacidad de fermentación de glucosa por las cepas nativas tolerantes a pH, sales biliares, NaCl y con actividad antagonista: Control; 12M N2; 9M N3; 12M B1 de izquierda a derecha respectivamente.

Los resultados mostrados en la figura 2, indican que todas las cepas sometidas a esta prueba son capaces de fermentar la glucosa, pero utilizando vías metabólicas distintas, lo cual se evidencia por el cambio de color de púrpura a amarillo por parte de todos los tubos, pero solo se observa presencia de gas en dos de los aislados.

La bacteria ácida láctica 12MB1 (Tubo 4) fermenta la glucosa sin producción de gas, durante las 48 horas de incubación, demostrando una asimilación del carbohidrato; también evidenciando la ruta metabólica homofermentativa utilizada por este microorganismo. Esta característica reafirma la identificación de la cepa 12MB1 como perteneciente al género *Enterococcus* y posiblemente a la especie *Enterococcus faecium*. Al comparar sus características con las que se refieren en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* y diferentes autores (Carro et al., 2014; Fisher

y Phillips, 2009; Klein, 2003) para esta especie, éstas coinciden en que no producen gas a partir de la glucosa, así como en la producción de ácido láctico como producto final. También se sustenta su selección como candidata de importancia para el desarrollo de aditivos con potencialidades probióticas (Brizuela et al., 1998) ya que los cultivos con esta propiedad son los más recomendados para ser utilizados como aditivos, por proporcionar a los alimentos mejores características organolépticas para el consumo humano y animal (Rondón et al., 2008).

Los otros dos aislados 12MN2 y 9MN3 correspondientes a dos aislados tipos bacilos, fermentaron la glucosa con producción de gas, esto nos dice que estas cepas pueden ser de mucha importancia para metabolizar el oxígeno residual que entra con los alimentos manteniendo una anaerobiosis en el rumen, lo cual favorecería al metabolismo microbiano anaerobio ruminal (Relling y Mattioli 2003).

Crecimiento a 40°C. Se evaluaron las diferentes cepas que superaron las pruebas probióticas a temperatura de 40±2°C, durante 48 horas; mostraron que se ven afectadas significativamente ($p < 0,05$) disminuyendo drásticamente el número de células por mL, a excepción de la cepa 12MB1 (figura 3), quien presenta diferencias estadísticamente significativas frente al resto de cepas, ya que obtuvo la tasa de crecimiento más alta, nuevamente incluso por encima de los valores de crecimiento a temperatura ambiente.

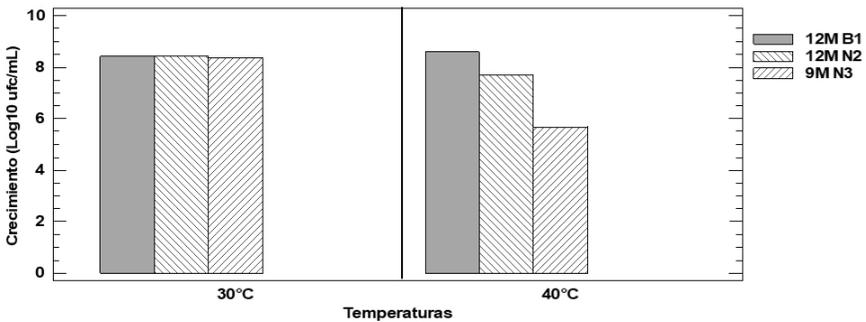


Figura 3. Tolerancia a alta temperatura 40±2°C por las cepas 12M B1; 12M N2 y 9MN3 expresado en log10 ufc/mL.

Esto indica la capacidad de esta cepa no solo de tolerar dichas condiciones de temperatura, sino que es capaz de reproducirse, lo cual es característico de las condiciones fisiológicas del género *Enterococcus* conforme a lo establecido por Carro et al., (2014).

Identificación bioquímica de las bacterias nativas con potencial probiótico.

La cepa 12MB1 caracterizada morfológicamente como un coco Gram+ (figura 4), frente a la prueba de catalasa (Bergey's, 1994), dio negativo, propio del género *Enterococos*, las cepas 12MN2 y 9MN3 correspondientes a dos bacilos Gram+, resultaron catalasa positivo propio del género *Bacillus*. Estos resultados permiten seleccionar una de estas cepas bacterianas con potencial probiótico para ser identificadas mediante análisis molecular.

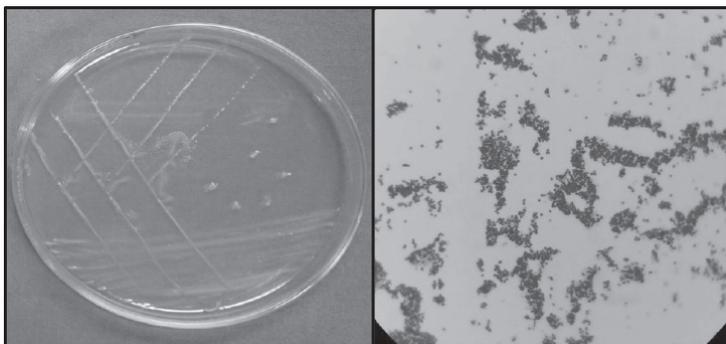


Figura 4. Observación macroscópica (A) y microscópica 100 x (B) de la cepa 12MB1 (*Enterococcus faecium*).

Identificación molecular de la cepa 12mb1 mediante amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16s rrna.

Se seleccionó la cepa bacteriana ácido láctica 12MB1, que obtuvo los mejores resultados en las pruebas probióticas *in vitro*, y se amplificó una región de 1465 pb del gen ribosomal 16s, con cebadores 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'), 1492R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') (Tajabadi et al., 2013), utilizando un programa de amplificación (Tabla 3).

Tabla 3. Programa de amplificación

Desnaturalización inicial	94°C	4 min	35 ciclos
Desnaturalización	94°C	30 seg	
Anillaje	55°C	35 seg	
Extensión	72°C	90 min	
Extensión final	72°C	10 min	

La secuenciación del ADN amplificado a partir de la cepa ácido láctica 12MB1 resultó en una secuencia de 1460pb, se pudo determinar su taxonomía por medio del clasificador de RDP (Ribosomal Database Project) (tabla 4). La secuencia corresponde a un microorganismo perteneciente al género *Enterococcus* con un 100% de confianza.

Tabla 4. Clasificación taxonómica de la cepa 12MB1 según la base de datos RDP.

Domain:	Bacteria
Phylum:	Firmicutes
Class:	Bacilli
Order:	Lactobacillales
Family:	Enterococcaceae
Genus:	Enterococcus

Al hacer el análisis en la base de datos GenBank, se encontró que dicha secuencia correspondía en específico a la especie *Enterococcus faecium* con una identidad del 99% y una cobertura del 100%, así mismo presentó alta homología con la especie *Enterococcus hirae* con una identidad y cobertura del 99%.

En este sentido, cómo no se tenía claridad de a qué especie correspondía el aislado, se procedió a realizar la reconstrucción filogenética; para esto, se tomaron 8 de las secuencias que presentaron mayor similitud con la secuencia consenso problema y una secuencia patógena como grupo externo. Se construyó un alineamiento múltiple en el programa bioinformático Mega versión 6.0, arrojando una matriz de distancia a partir de la cual se realizó el análisis filogenético por el método de Máxima Similitud (Maximum Likelihood), la historia evolutiva se dedujo mediante el método de Máxima Similitud basado en el parámetro modelo Kimura 2 (Kimura M. 1980).

Se obtuvieron automáticamente los árboles iniciales para la búsqueda aplicando algoritmos de Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias de pares estimados utilizando el método de máxima probabilidad compuesta (MCL) y seleccionando la topología con valor de probabilidad de log superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (2 categorías (+ G, parámetro = 0,3078)). El análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + no codificante.

Había un total de 879 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA 6 y el árbol filogenético construido a partir de los 8 mejores “hits” con respecto a la base de datos GenBank del NCBI se muestra en la siguiente figura 15. (Tamura et al., 2013).

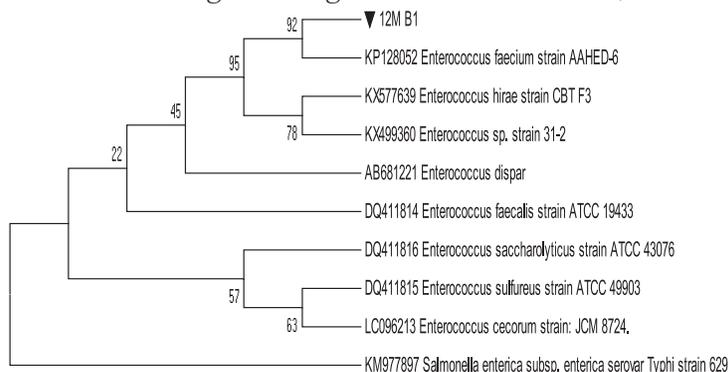


Figura 5. Árbol de distancias construido a partir de los 8 mejores “hits” con respecto a la base de datos GenBank del NCBI.

A partir del resultado obtenido tras realizar el análisis filogenético molecular por el método de Máxima Similitud basado en el parámetro modelo Kimura 2 (Kimura M. 1980). Se concluye que la cepa nativa 12M B1 quien mostró potencial probiótico *in vitro* corresponde su secuencia de 1460 pb a una cepa de la especie *Enterococcus faecium* con un 99% de identidad y 100% de cobertura. De igual manera, se encontró que presenta un 92% de similitud filogenética con la especie KP128052 *Enterococcus faecium* strain AAHED-6 registrada en la base de datos GenBank del NCBI.

La especie *Enterococcus faecium* encontrada en el presente estudio pertenece al género de los *Enterococcus* quienes se encuentran en diversos nichos ecológicos incluyendo productos lácteos, donde desempeñan un papel reconocido en características organolépticas (Giraffa, 2002). También son conocidos por producir una o más bacteriocinas que inhiben una amplia gama de patógenos transmitidos por los alimentos, incluyendo *Listeria* spp. Esta característica parece tener un impacto en la competencia de nichos y contribuyen al control de las infecciones patógenas (Nes et al., 2014).

Los *Enterococcus* son habitantes naturales del intestino de los mamíferos y especialmente de la parte terminal del intestino delgado (Lebreton et al., 2014; Walter y Ley, 2011). Este segmento del intestino es también el portal de entrada de varias bacterias patógenas tales como *Salmonella* y *Listeria*. Varios grupos han examinado la posibilidad de reducir la incidencia de estas infecciones utilizando cepas productoras de

bacteriocinas como *Enterococcus mundtii* CRL 35 (Salvucci et al., 2011), *Lactococcus lactis* DPC 6520 (Dobson et al., 2011) o *Pediococcus acidilactici* UL 5 (Dabour et al., 2009). La producción in situ de bacteriocinas parecen proporcionar protección contra microorganismos patógenos y potencian la competencia de nichos gastrointestinales en los mamíferos (Mejía et al., 2015). *Enterococcus faecium* LCW 44, exhibió un amplio espectro de actividad antagonica contra *Listeria* spp. (Vimont et al., 2017) *Enterococcus durans* 61A, aislado de la leche fermentada artesanal en Túnez, mostró un potente efecto antagónico frente a *Listeria*, se demostró que esta cepa está libre de genes de virulencia; resultó sensible a la Vancomicina y además mostró gran capacidad de sobrevivir bajo condiciones gastrointestinales simuladas (Hanchi et al., 2016).

En otros estudios, Saelim et al., (2012) reportaron a la cepa *Enterococcus faecium* CE5-1 como probiótica y propusieron su uso en el control de *Enterococos* resistentes a los antibióticos en pollos. Lan y Kim (2017) encontraron que la cepa *Enterococcus faecium* DSM 7134 mejoró la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs), aumentó la maduración de la estructura intestinal por aumento de las vellosidades, alivió el estado antioxidante al aumentar el superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión, así como la disminución de la concentración de malonaldehído. También reportaron el aumento de *Lactobacillus fecal* y disminución de recuentos de *E. coli*, así como disminución de la puntuación de diarrea en los cerdos de destete. De igual manera, Tiantong et al., (2015) realizaron infusiones intramamarias con *Enterococcus faecium* SF68 en vacas Holstein y encontraron que esta cepa tiene un gran potencial para uso intramamario como fórmula para proteger mejor las glándulas mamarias contra la invasión de patógenos inminente tras la estasis de leche y promover una involución eficiente de la glándula mamaria en comparación con los antibióticos comerciales.

Es importante destacar que *Enterococcus faecium* fue reconocido en Brasil como microorganismo probiótico y su uso ha sido autorizado por la Agencia Reguladora de Salud (ANVISA). En Dinamarca, leche fermentada que contiene probióticos de *E. faecium* Se comercializa (Tamime, 2002) en Estados Unidos una cultura probiótica bajo el nombre de Causido, (MD Foods, Odense, Dinamarca), que es la combinación de culturas de *S. thermophilus* y *E. faecium* (Hanchi, 2003). La especie *Enterococcus faecium* es entonces, una de las cepas con mayor número de investigaciones, se ha aislado de diferentes animales y del ser humano, es aceptada en todo el mundo como cepa probiótica y su aplicación como aditivo microbiano en la alimentación bovina demuestran efectos beneficiosos en el tratamiento

frente a cepas resistentes a antibióticos y patógenos, producción de AGVs, maduración de la estructura intestinal, disminución de la diarrea, mejor respuesta del sistema inmune, entre otras.

En este sentido, podemos afirmar que la cepa 12MB1 identificada mediante biología molecular como *Enterococcus faecium* aislada de heces de terneros en levante Romosinuano, posee gran potencial probiótico *in vitro* y resulta promisorio para su uso como aditivo microbiano en la alimentación bovina.

Conclusiones

En esta investigación se logró determinar 3 cepas con potencial probiótico, correspondiente a una cepa ácido láctica (12MB1) y dos cepas tipo *Bacillus* sp. (12MN2 y 9MN3). Estas cepas mostraron la mayor tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal simuladas en este estudio; destacándose la cepa 12MB1 identificada mediante biología molecular como *Enterococcus faecium* quien toleró todas las pruebas probióticas *in vitro*, con diferencias estadísticamente significativas a sales biliares 0.3% y crecimiento a 40°C. La cepa nativa con potencial probiótico *in vitro* *Enterococcus faecium* aislada de terneros Romosinuano en este estudio, constituye una alternativa biotecnológica para la producción futura de un biopreparado o aditivo probiótico para la alimentación bovina del departamento de Sucre.

Referencias Bibliográficas

- Ahn, Y. T.; Kim, G. B.; Lim, K. S.; Back, Y. J.; Kim, H. U. 2003. Desconjugation of bile salt by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal* 13, 303-311.
- Ávila J., Ávila M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, & Hernández H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, Núm. 2, p. 161-169.
- Balance y perspectiva del sector ganadero (2015). Federación Colombiana de Ganaderos – FEDEGAN y Fondo Nacional del Ganado – FNG. Recuperado de <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/publicaciones-estadisticas>.

- Bedoya, G., Carvajal, L. G., Bermúdez, N. R., Moreno, F. L., Márquez, M. E., Davies, S., & Ruiz, A. (2016). Estructura molecular y poblacional del ganado criollo Colombiano (GCC). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(2), 109-120.
- Bergey's (1994). *Manual of determinative Bacteriology*. 9 edition. Edited by John G. Holt Copyright Williams y Wilkins, Baltimore. New York; EE.UU; ISBN 0-683-00603-7.
- Brizuela, M. A., Serrano, P., Pérez, Y., Iglesias, I., Rodríguez, R., & Zuaznábar, Z. (1998). Evaluación preliminar de cepas de bacterias ácido lácticas para su uso en la obtención de probióticos. *Revista LABORAT-Acta*, 2, 55-58.
- Carro Travieso, M. D., Saro, C., Mateos, I., Díaz, A., & Ranilla, M. J. (2014). Presente y perspectivas de futuro en la UE del empleo de probióticos en la alimentación de rumiantes. *Ganadería*, 15(93), 40-46.
- Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Urlings, H. A., Lipman, L. J., & Van Knapen, F. (2002). In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry science*, 81(5), 621-628.
- Dabour, N., Zihler, A., Kheadr, E., Lacroix, C., & Fliss, I. (2009). In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 133(3), 225-233.
- Dobson, A., Crispie, F., Rea, M. C., O'Sullivan, O., Casey, P. G., Lawlor, P. G. & Hill, C. (2011). Fate and efficacy of lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* in the mammalian gastrointestinal tract. *FEMS microbiology ecology*, 76(3), 602-614.
- FAO/WHO. Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, (Canada): 2002, 11p.
- Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M. H., Lievin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2005). pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), 6008-6013.
- Federación Colombiana de Ganaderos- FEDEGAN, (2014). Plan de desarrollo ganadero 2014-2019. Bogotá D.C. p 328.

- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749-1757.
- Fondo de población de las naciones unidas (UNFPA) (2018). Total population in millions. Recuperado de <https://www.unfpa.org/es/data/world-population-dashboard>.
- Frizzo, L. S., Soto, L. P., Bertozzi, E., Sequeira, G., Marti, L. E., & Rosmini, M. R. (2006). Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 5(1/2), 69-80.
- Giraffa, G. (2002). *Enterococci from Foods*. *FEMS Microbiology Reviews* 26 pp. 163–171.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of food microbiology*, 88(2), 215-222.
- Hanchi, H., Hammami, R., Kourda, R., Hamida, J. B., & Fliss, I. (2014). Bacteriocinogenic properties and *in vitro* probiotic potential of enterococci from Tunisian dairy products. *Archives of microbiology*, 196(5), 331-344.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:131-120.
- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International journal of food microbiology*, 88(2), 123-131.
- Kommineni, S., Bretl, D. J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P. & Salzman, N. H. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, 526(7575), 719-722.
- Lan, R., Koo, J., & Kim, I. (2017). Effects of *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performance, nutrient digestibility, fecal microbial and noxious gas emission in weaning pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(4), 1310-1315.
- Lara M, C., & Cardona D, J. (2013). Impacto de un biopreparado con características probióticas sobre la producción de leche bovina en Cór-

- doba-Colombia. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 75-80.
- Lara Mantilla, C., & Acosta Pineda, R. C. (2013). Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1).
- Lebreton, F., Willems, R. J., & Gilmore, M. S. (2014). *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization.
- Leiva, S., Yañez, M., Zaror, L., Rodríguez, H & Garcíaquintana, H. (2004). Actividad antimicrobiana de Actinomycetales aislados desde ambientes acuáticos de sur de Chile. *Rev. Med. Chile*; 132; p.151-159.
- Liong, M. T.; Shah, N. P. 2005. Bile salt desconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *International Dairy Journal* 15,391-398
- Livney, Y. D. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1), 73-83.
- Lombana, J., Martínez, D., Valverde, M., Rubio, J., Castrillón, J., & Marino, W. (2012). Caracterización del sector ganadero del Caribe colombiano. Barranquilla: Universidad del Norte. p 2-17
- Martínez-Barragán, I. K., González-Martínez, B. E., Campos-Góngora, E., de la Rosa, A. P. B., & Jiménez-Salas, Z. (2008). Identificación molecular de probióticos aislados de alimentos y suplementos: comparación con métodos bioquímicos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 9(4).
- McSweeney C, Mackie R. 2012. Microorganisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects. FAO, Background Study Paper # 61, 62 p. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/me992e/me992e.pdf>. Accesado: 9-03-2014.
- Mejía, J., Chacon, Z., Guerrero, B., Otoniel, J & Lopez, G. (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*: caracterización in vitro como potenciales probióticas. *Revista científica*, abril, año/vol.xvll, #002. universidad de Zulia Maracaibo, Venezuela. 178-185. Nomoto, K. *Journal of Biological Science Bioengineering*. 6 - 583.
- Ng, S. Y., Koon, S. S., Padam, B. S., & Chye, F. Y. (2015). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Ma-

- laysian fermented Bambang (Mangifera pajang). *CyTA-Journal of Food*, 13(4), 563-572.
- Pérez, M., Piad, R., Bocourt, R., Milian, G., Medina-Medina, E., Savon, L. & Laurencio, M. (2005). Actividad prebiótica y probiótica de un hidrolizado enzimático de crema de destilería en pollos de ceba. *CYTA-Journal of Food*, 5(1), 42-47.
- Pinzón, M. E. (1984). Historia de la ganadería bovina en Colombia. Suplemento Ganadero, Banco Ganadero. Bogotá (Col.), 4(1), 208.
- Prasad, J.; Gill, H.; Smart, J.; Gopal, P. K. 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *International Dairy Journal* 8, 993-1002.
- Relling, A. E., & Mattioli, G. A. (2003). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Fac. Ciencias Veterinarias. Argentina: Universidad Nacional de La Plata. p 9-25
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ránilla, M. J. & Pérez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. *CYTA-Journal of Food*, 6(1), 56-63.
- Saelim, K., Sohsomboon, N., Kaewsuwan, S., & Maneerat, S. (2012). Probiotic properties of *Enterococcus faecium* CE5-1 producing a bacteriocin-like substance and its antagonistic effect against antibiotic-resistant enterococci *in vitro*. *Czech Journal of Animal Science*, 57(11), 529-539.
- Salvucci, E., Saavedra, L., Hebert, E. M., Haro, C., & Sesma, F. (2012). Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Foodborne pathogens and disease*, 9(1), 68-74.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M. Y. A., & Mustafa, S. (2013). Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 235-241.
- Tamime, A. Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications--a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(n4s), S2.

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tiantong, A., Piamya, P., Chen, S. E., Liu, W. B., Chang, F. Y., Lin, P. C. & Chang, C. J. (2015). Systemic and local bactericidal potentiality in late lactation Holstein-Friesian cows following a combined antibiotics and *Enterococcus faecium* SF68 dry-cow treatment. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 63(3), 139-150.
- Van Lier & Regueiro, 2008. Digestión en retículo-rumen. Curso de anatomía y fisiología animal. Facultad de agronomía universidad de la república. Montevideo, Uruguay. Pág. 8. Recuperado de <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/Repartido-Digestion-en-Reticulo-Rumen.pdf>.
- Vargas, E. M., Gómez, C. J., Parra, M. E., & Romero, M. A. (2004). Producción de microorganismos probióticos como Aditivo para alimentos concentrados para ganado Vacuno. *Revista de Ingeniería*, (19), 167-178.
- Vimont, A., Fernandez, B., Hammami, R., Ababsa, A., Daba, H., & Fliss, I. (2017). Bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* LCW 44: a high potential probiotic candidate from raw camel milk. *Frontiers in microbiology*, 8.
- Walter, J., & Ley, R. (2011). The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annual review of microbiology*, 65, 411-429.
- Yimin, C., Benno, Y., Nakase, T., & Oh, T. K. (1998). Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. *The Journal of general and applied microbiology*, 44(5), 311-316.