

CAPÍTULO 10

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS DE BACTERIAS Y LEVADURAS AISLADAS EN ESTIÉRCOL DE TERNEROS DE LEVANTE DE RAZA BRAHMAN EN EL DEPARTAMENTO DE SUCRE

Marcela Argumedo García²⁵

César Betancur Hurtado²⁶

Luty Gomez CÁCERES Pérez²⁷

25 Biólogo. Maestría en Biotecnología

26 Medicina Veterinaria y Zootecnia, Especialista en ecología, Maestría en Fisiología. Profesor de la Universidad de Córdoba.

27 Bacterióloga, Especialista en aseguramiento de la calidad Microbiológica. Maestría en Agricultura del Trópico Húmedo. Estudiante de Doctorado. Profesora en Corporación Universitaria del Caribe - CECAR

Introducción

El levante de novillas es una de las etapas básicas en toda explotación lechera, debido a que conforman el reemplazo de los animales que anualmente deben abandonar el hato por problemas productivos, reproductivos, sanitarios y de edad, razón por la cual los terneros en esta fase demandan especial cuidado en su manejo, por ser la segunda etapa más crítica del desarrollo y determinar en gran medida el inicio de la eficiencia del proceso completo (FEDEGAN, 2000; Cueva, 2014). No obstante, la disponibilidad de novillas destinadas a cumplir esta función, frecuentemente es afectada por prácticas deficientes de alimentación, retardando el inicio de la vida reproductiva a causa de problemas de salud en las becerras, principalmente por el mal suministro de calostro, alimentación con sustituto de leche de baja calidad, cambios abruptos en la dieta y situaciones de estrés (Soto et al., 2011). Lo cual, genera desbalances causados por la presencia de bacterias entéricas, las cuales provocan disminución en la digestión y absorción de nutrientes y por lo tanto, el retardo en la producción, situación que ha sido documentada por Armstrong et al (1988) y Parker y Armstrong (1987), sin contar con otros factores que pueden inducir la ruptura del equilibrio intestinal, como las diarreas que disminuyen considerablemente la barrera inmune, al posibilitar a los patógenos, la implantación, adhesión y proliferación en las células epiteliales del intestino (Gaggia, Mattarelli & Biavati, 2010).

Esta problemática ha suscitado la suplementación de las dietas con antibióticos, que son efectivos como promotores del crecimiento. Sin embargo, la administración inadecuada de estos compuestos ha generado diversos problemas como el incremento en la resistencia bacteriana, la pérdida de la microbiota intestinal benéfica y el aumento en los niveles de residuos de antibiótico que quedan en la carne y en los subproductos de la misma (Wallace, 1992; Linton, et al., 1988; Torres et al., 2002). El uso de probióticos es una de las alternativas naturales al uso de los antibióticos promotores de crecimiento, ya que al ser administrados en cantidades adecuadas reducen la mortalidad, producen mejor digestibilidad,

ganancia en peso y mayor índice de conversión alimentaria (Gutiérrez, Montoya y Vélez, 2013), sin contar que estimulan el crecimiento de los microorganismos benéficos y suprimen los patógenos por competición y producción de ácido láctico (Freitas et al., 2003). Además, su consumo en la alimentación animal es una de las formas de generar producción limpia y desarrollo competitivo a gran escala, sin efectos colaterales en el animal ni en sus productos (Gutiérrez, Montoya y Vélez, 2013).

La adopción de nuevos procesos biotecnológicos es la herramienta para cambiar la manera de producción del ganadero manteniendo y mejorando su posición en el mercado interno hasta poder acceder a mercados internacionales. Además, no todas las fincas lecheras están certificadas, lograrlo desde buenas prácticas de manejo, brindaría beneficios al productor a nivel social y económico, debido a que se crea personal capacitado con mejores aptitudes; se mejora la inocuidad de la leche y como resultado se protege la salud de los consumidores y se preserva la calidad del medio ambiente (Taborda, 2011). Asimismo, la ganadería sería más competitiva puesto que se lograría un máximo rendimiento productivo en cuanto a cantidad y calidad de los productos para que su costo sea el más bajo posible y prevenga la aparición de trastornos digestivos o metabólicos (Villena & Jiménez, 2002).

El desconocimiento de los microorganismos con potencial probiótico proveniente del estiércol bovino y las pocas investigaciones realizadas por falta de tecnologías y carencia de animales fistulados en el departamento de Sucre, están dejando de lado el aprovechamiento del mismo para que las organizaciones ganaderas adquieran gran importancia económica haciendo uso de probióticos de cepas autóctonas de la región, obtenidas a bajo costo y a partir de materias primas baratas, debido a que los probióticos comercializados son importados y tienen un alto costo (Wannaprasat et al., 2009). Bajo este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el potencial probiótico de cepas de bacterias y levaduras provenientes de estiércol de terneros de levante de raza Brahman en el departamento de Sucre.

Metodología.

Tipo y sitio de estudio: el presente estudio es de tipo experimental.

Fase de campo

Las muestras de estiércol fueron colectadas en 3 fincas ubicadas en los municipios de Toluviejo, Sincelejo y Corozal en el departamento de Sucre, ubicado entre los 9° 18' 0"N, latitud Norte y 75° 24' 0"O longitud Occidente al norte del país, en la región Caribe de Colombia. Limita al norte y al oriente con el departamento de Bolívar, al noroccidente con el mar Caribe, en el golfo de Morrosquillo, al sur y occidente con el departamento de Córdoba.

Fase de laboratorio

Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de Biotecnología GRUBIODEQ de la Universidad de Córdoba, ubicada entre los 8°47'16"N, latitud Norte y 75°51'28"O longitud Occidente en el departamento de Córdoba – Colombia.

Población y muestra

La población corresponde al total de ganado bovino de levante de raza Brahman y las muestras fueron colectadas en forma aleatoria con un nivel de confianza del 95%.

Este estudio fue realizado en 4 fases:

Fase 1. Caracterización de bacterias y levaduras

Aislamiento de los microorganismos: a partir de estiércol bovino de 9 terneros en levante provenientes de las fincas seleccionadas en los respectivos municipios, con edades promedio de 8 a 12 meses, alimentados a base de forraje, sin tratamiento con antibiótico y antiparasitarios, fueron aisladas bacterias ácido lácticas y levaduras. Para ello, se utilizaron medios selectivos como son: Agar De Man Rugosa Sharpe (MRS) (*Lactobacillus* sp), Agar Nutritivo modificado, suplementado con Carboximetil Celulosa CMC y almidón al 0,1% (*Bacillus* sp) y Agar Sabouraud Dextrose (SDA) (*Saccharomyces* sp) teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento (Rondón et al., 2008). A cada cepa aislada se le realizó tinción de Gram

y de endosporas, y fueron sometidas a la prueba de catalasa y oxidasa e incubadas a 36°C por 24 hrs. Para *Lactobacillus* sp: fueron seleccionadas aquellas cepas catalasa negativa, oxidasa negativa y bacilos Gram positivos en cadenas no esporulados (Kandler & Weiss, 1986).

Fase 2. Determinación de la actividad probiótica in vitro

A un inóculo (10^6 UFC/mL) de cada uno de los microorganismos se le realizaron las siguientes pruebas en triplicado:

Tolerancia a cambio de pH: Las cepas de bacterias fueron evaluadas diferentes valores de pH, 3, 4, 5.6, 7 (incubación a 37 °C durante 24 hrs). La sobrevivencia y resistencia se comprobó al comparar el conteo de microorganismos viables del inóculo con las células sobrevivientes después de la incubación a diferentes valores de pH de acuerdo con Zavaglia et al., 1998. El porcentaje de resistencia fue calculado por la siguiente ecuación: $\% R_{pH} = [(UFC/mL)_{MRS\ pH} \times 100] / (UFC/mL)_{MRS\ (in\acute{o}culo)}$ (Kociubinski et al., 1999). Se estableció como criterio de selección escoger aquellas cepas que resistieron el pH por encima del 50%.

Tolerancia a sales biliares: El ensayo fue realizado en soluciones con diferentes concentraciones de sales 0.05, 0.1, 0.15 y 0.3 % p/v ajustado el pH =7 con HCl 5% (incubación a 37 °C durante 24 hrs). Al cabo de este tiempo la sobrevivencia y resistencia a sales biliares se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) (Brizuela, 2003; Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008; Ávila et al., 2010)

Tolerancia a diferentes temperaturas: Las cepas fueron probadas a dos temperaturas, 30 y 40 °C durante 24 hrs. La sobrevivencia y resistencia a estas temperaturas se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) (Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008; Ávila et al., 2010)

Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl: La prueba se realizó utilizando caldos MRS y YPD con diferentes concentraciones de NaCl, 2, 4, 7 y 10 % p/v, (incubación a 37 °C durante 24 hrs), finalizado el tiempo se determinó el crecimiento a altas concentraciones de NaCl mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm a 24 hrs (Rondón et al., 2008)

Fermentación de la glucosa: Se utilizaron los caldos MRS y YPD, que contenían 0,2% v/v de una solución de purpura de bromocresol (0,5%) y campanas de Durham. La producción de gas se evidenció mediante la presencia de gas en las campanas y luego de incubación a 37 °C durante 48 hrs (Rubio et al., 2008, Rondón et al., 2008).

Prueba de antagonismo: Esta prueba fue realizada contra *Salmonella* sp, *Pseudomonas aureginosa* y *E. coli*, las cuales fueron sembradas en forma masiva en agar Mueller hinton. En la superficie de estos fueron colocados tres discos impregnados con los microorganismos de ensayo para luego ser introducidos en la nevera durante 30 minutos (T = 15°C) y después se incubaron a 37°C durante 48 hrs. La acción antagónica se evidenció por la presencia de halos de inhibición y crecimiento alrededor de los discos (Leiva et al., 2004; Mejía et al., 2007)

Capacidad de crecimiento: Las 2 mejores cepas ácido lácticas que resistieron la presencia de sales biliares y acidez fueron cultivadas en 30 ml de caldo de lactosuero e incubadas a 37°C durante 24 hrs. Se realizó una curva de crecimiento a diferentes tiempos 0, 6, 12, 18, 24 y 30 hrs. El crecimiento se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) (Laurencio et al., 2002; Rondón et al., 2008).

Fase 3. Caracterización de bacterias con potencial probiótico

Identificación molecular por PCR.

Las cepas bacterianas ácido lácticas que presentaron potencial probiótico fueron identificadas a nivel molecular por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa – PCR, enviadas a la Corporación CorpoGen para sus respectivos análisis. La identificación molecular de aislamientos de los microorganismos incluyó los siguientes pasos (Corpogen, 2017):

- Aislamiento y purificación del DNA.
- Amplificación por PCR de la región de 1465 pb del gen ribosomal 16S.
- Purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación con los iniciadores 27F, 518F, 800R, y 1492R del gen ribosomal 16S.

- Limpieza manual de cada una de las secuencias de los fragmentos obtenidos.
- Ensamblaje de las secuencias y obtención de la secuencia problema.
- Análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada, mediante la comparación contra las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), Greengenes (Laurence Berkeley National Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project).
- Alineamiento y generación de un árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema.
- Clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

Las secuencias consenso también fueron comparadas con secuencias homologas de la base de datos de GenBank. Se obtuvo el árbol de distancia que muestra la historia evolutiva de los microorganismos mediante el método de máxima similitud en el que se muestra el porcentaje en que los taxones se encuentran asociados a las ramas. Los análisis evolutivos fueron realizados en el programa bioinformático MEGA 6.

Fase 4. Diseño experimental y análisis estadístico

En la presente investigación todos los ensayos fueron montados bajo un Diseño Completo al Azar con arreglo factorial. En los experimentos o diseños factoriales los tratamientos se forman combinando los niveles de los factores en estudio, de manera que el efecto del tratamiento τ_i se considera a su vez compuesto de los efectos de los factores y sus interacciones.

Prueba de sales biliares, pH o NaCl. Diseño de tratamiento multifactorial formado por 3 factores, donde el factor A corresponde a las concentraciones de sales biliares, pH o NaCl, el factor B a la concentración del inóculo y el factor C, las cepas en estudio.

Prueba de tolerancia a cambios de temperatura y antagonismo. Diseño multifactorial formado por 2 factores, donde el factor A: patógeno o temperatura y el factor B: cepas en estudio.

El análisis de varianza se realizó para verificar diferencias significativas entre las medias, con un nivel de significancia con $\alpha = 0,05$ previa verificación de la normalidad (Prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett) y la prueba de Tukey se aplicó para realizar las comparaciones múltiples entre las medias. Los datos fueron analizados bajo el programa Statgraphics centurión VI.

Resultados y Discusión

Caracterización de bacterias y levaduras

Aislamiento de microorganismos. De los medios de cultivo Nutritivo modificado, MRS y SDA fueron aisladas 82 cepas entre bacterias (65) y levaduras (17) de las cuales solo 14 superaron las pruebas probióticas realizadas, 8 microorganismos aislados de medio MRS y 6 de SDA (tabla 1). Los primeros presentaron características macroscópicas y microscópicas de bacterias ácido lácticas – BAL. Todas las colonias presentaron morfología celular bacilos gram (+) y las mismas características morfológicas, es decir, formaciones circulares, borde entero, superficie lisa, color blanco, sin pigmentos y no formadora de esporas, de tamaño pequeñas, medianas y grandes coincidiendo con la descripción del género *Lactobacillus* indicada por Kandler & Weiss (1992).

Tabla 1. Características morfológicas de los microorganismos aislados de estiércol de terneros de levante de raza Brahman.

CEPA*	MEDIO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
Mae	Agar MRS	Colonias de forma irregular color crema, borde dentado	Bacilos medianos, Gram (+)
Maf		Colonias grandes color blanco, borde entero	Bacilos delgados, Gram (+)
Mf1		Colonias pequeñas traslucidas, borde entero	Bacilos delgados, Gram (+)
Maf 2		Colonias grandes, color blanco borde entero	Bacilos largos medianos, Gram (+)
ML103		Colonias pequeñas color blanco, borde entero	Bacilos medianos, Gram (+)
Ma105s		Colonias pequeñas color crema, borde dentado	Bacilos medianos, Gram (+)
Maj	Agar SDA	Colonias pequeñas, color blanco borde entero	Cocobacilos pequeños, Gram (+)
MIS3B		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras ovaladas y alargadas, presenta pseudohifas y clamidospora

CEPA*	MEDIO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
MIS5'C		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras alargadas y ovaladas, presenta pseudohifas y clamidospora
MSPS3B		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras alargadas y ovaladas presenta pseudohifas y clamidospora
MIS4'A		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras ovaladas, presenta pseudohifas y clamidospora
MSPM(S)1'BR-1LEV		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras ovaladas, presenta pseudohifas y clamidospora
MIM4D		Colonias grandes, elevadas, brillantes, color beige crema, borde entero	Levaduras ovaladas, presenta pseudohifas y clamidospora

**Código de cepa aislada. Fuente: datos de la investigación*

Las levaduras aisladas de SDA presentaron características propias de la familia Candidiaceae, caracterizadas por formar sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. El crecimiento de estas cepas en CHROMagar fue positiva confirmando la presencia de este tipo de microorganismos que no fueron de interés en la presente investigación. Asimismo, las cepas aisladas de medio Nutritivo modificado (57) presentaron morfología celular de cocobacilos y bacilos gram (-), característico de bacterias de la familia Enterobacteriaceae, razón por la cual no se les realizó ningún tipo de análisis.

Determinación de la actividad probiótica in vitro de bacterias y levaduras.

La Tabla 2 muestra las cepas que cumplieron con las características deseadas para microorganismos probióticos, diferenciadas por presentar catalasa (-), característica general del género *Lactobacillus* concordando con De Roissart & Luquet (1994), quienes describen que las cepas lácticas carecen de la enzima. La prueba de oxidasa fue negativa para todas, mientras que en las concentraciones a sales biliares y crecimiento a diferentes pH se observó que la mayoría de las cepas evaluadas excepto Maj y Ma105s crecieron satisfactoriamente en medio MRS y en los pH de valores bajos evaluados, requisito indispensable para que se puedan incluir como probióticos en la dieta humana y animal. Con relación a la prueba de antagonismo, todos los aislados presentaron inhibición frente a los patógenos evaluados *Salmonella*, *Pseudomona*, *E. Coli*.

Tabla 2. Selección de microorganismos con características probióticas.

CEPA	MEDIO DE CULTIVO	PRUEBA DE CATALASA	PRUEBA DE OXIDASA	PRUEBA DE SALES BILIARES 0,05 0,1 0,15 0,3	CRECIMIENTO A Ph 3,0 4,0 5,6 7,0	INHIBICIÓN DE PATÓGENOS
Mac	MRS	-	-	++++	++++	+
Maf	MRS	-	-	++++	++++	+
Mf1	MRS	-	-	++++	++++	+
Maf 2	MRS	-	-	++++	++++	+
ML103	MRS	-	-	++++	++++	+
Ma105s	MRS	-	-	++++	-+++	+
Maj	MRS	-	-	+++-	-+++	+
Ma105bb	MRS	-	-	++++	+++-	+

+ = prueba positiva, - = prueba negativa

Tolerancia a cambios de pH

El análisis de varianza realizado reveló que los valores de pH a los que fueron sometidas las cepas ácido lácticas y la interacción de estos con las mismas tuvieron un efecto altamente significativo en el crecimiento con un $p=0.0000$, indicando que el ácido afecta de manera diferente el crecimiento, dependiendo del tipo de cepa. Además, la prueba de correlación de Pearson

mostró una relación directamente proporcional del pH con relación a la variable respuesta con un valor de $r= 0.3224$, lo que significa que a medida que aumenta el valor de pH, mayor es el crecimiento de las cepas evaluadas.

La prueba de múltiples rangos de comparación de medias de Tukey señala, que a pH 5.6 las cepas evaluadas presentaron mayor número de unidades formadoras de colonia con una media de 3.1×10^8 UFC/ml (figura 1), mientras que a pH 7 el crecimiento disminuyó, pero se mantuvo estable, resultado que concuerda con Acedo y Rico (1998) quienes determinaron que las concentraciones más habituales de un microorganismo probiótico oscilan entre 10^8 y 10^{10} UFC/ml.

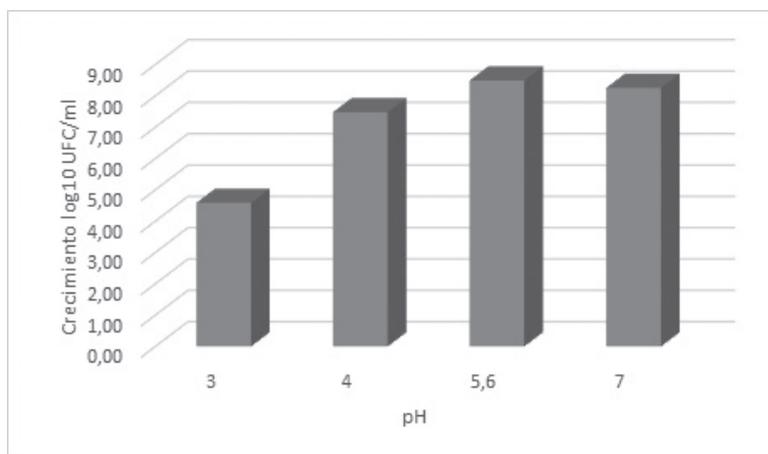


Figura 1. Tolerancia de las cepas ácido lácticas a diferentes pH.

Efectos similares reportaron Lara y Acosta (2013) quienes obtuvieron bacilos aislados del intestino de termitas con un incremento en la magnitud de su densidad poblacional de 10^8 UFC/ml en medios con pH 5 y 7, diferentes a los reportados por Lara y Burgos (2012) en donde a pH 4, se presentó el mayor porcentaje de crecimiento de las tres cepas evaluadas como aditivos en la alimentación avícola (*Saccharomyces* sp, *Bacillus* sp y *Lactobacillus* sp). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran que el crecimiento bacteriano no se vio afectado por los niveles de pH, dado que las bacterias siguieron desarrollándose a pH relativamente bajo, lo que favorece el proceso de fermentación debido a su capacidad de resistir la acidez que se produce en el estómago, que es uno de los principales

obstáculos para el paso del probiótico a través del tracto gastrointestinal (Jurado et al., 2014).

De las 8 cepas ácido lácticas evaluadas sólo 2 (Maj y Ma105s) no toleraron altas concentraciones de ácido (pH 3.0), evidenciado por el nulo crecimiento. La tabla 4 muestra la media de las UFC/ml de las BAL a pH 3.0 indicando que Maf (*Lactobacillus fermentum*) tuvo el mejor crecimiento a este pH durante 24 hrs. Además, la mayoría de las cepas evaluadas a pesar de su poco crecimiento a pH 3 – 4 este se mantuvo estable en este rango (anexo 4), coincidiendo con investigaciones de Du Toi et al. (1998) y Dunne et al. (2001) quienes han demostrado que las cepas de *Lactobacillus* son resistentes a pH ácido variando entre 2.5 y 4. Asimismo, Lin et al. (2007) afirman que la mayoría de las cepas de *L. fermentum* son ácidas estables debido a que los recuentos bacterianos de estas cepas cambian de manera insignificante después de 3 horas de incubación en el jugo gástrico de pH 2.6 y pH 3.2

Tabla 3. UFC/ml de bacterias ácido lácticas a pH 3.0.

Cepa	UFC/ml
Maf (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	3.1x10 ⁵
Maf2 (<i>Lactobacillus fermentum</i>)	6.0x10 ²
Mae (<i>Lactobacillus mucosae</i>)	1.5x10 ²
Maf1 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	1.3x10 ²
Ma105bb	8.0x10 ¹
ML103	7.0x10 ¹
Maj	0
Ma105s	0

Fuente: cálculos del estudio

En general *Lactobacillus fermentum* es una de las especies donde hay mayor número de reportes, encontrándose que es una de las cepas más tolerantes a la acidez gástrica con un porcentaje de supervivencia de 77.7%, luego de dos horas de incubación (Cueto et al., 2010) y superior al 90% después de tres y cuatro horas de incubación a pH 3 (Mahmoudi et al., 2016). Bao et al. (2010) también reportaron 11 cepas de *L. fermentum*

con alta tolerancia a la acidez gástrica y con un porcentaje de supervivencia del 80% luego de 3 horas de incubación a pH 2.5.

Con relación a las cepas *Lactobacillus mucosae* y *Lactobacillus johnsonii* estas mostraron una disminución en la supervivencia a pH 3. Sin embargo, a pH 7 presentaron un incremento significativo de la población; resultados similares reportó De Angelis et al. (2006) quienes observaron que *L. mucosae* mostraba disminución en la supervivencia después de 3 horas de incubación en jugo gástrico simulado a pH 3 pero a pH 8 presentaba mayor número de colonias. Asimismo, Cho et al. (2000) encontraron que *L. johnsonii* sobrevivió a pH 3 al menos 3 horas.

Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de las cepas para sobrevivir en condiciones drásticas de acidez a pesar de que a este valor de pH 3 el crecimiento disminuyó. Este hallazgo de que las cepas evaluadas en el presente estudio toleren este pH durante 24 horas es interesante debido a que existen reportes que indican que otras cepas de lactobacilos como la M92 de *Lactobacillus acidophilus* solo puede sobrevivir durante 3 hrs a este pH, produciéndose luego la lisis del 60% de la población inicial (Suskovic et al., 1997).

Tolerancia a sales biliares

Los resultados obtenidos para sales biliares indicaron que todas las especies de lactobacilos fueron capaces de sobrevivir a las concentraciones de sales biliares ex-perimentadas (0.05% (p/v) a 0.3% (p/v). El análisis de varianza mostró estadísticamente un efecto significativo entre la interacción cepas - concentraciones de sales y el crecimiento con un $p= 0.0000$. Además, la prueba de múltiples rangos de comparación de medias de Tukey señala que hubo mayores unidades formadoras de colonia de las bacterias seleccionadas a la concentración de sales biliares de 0.05% 1.1×10^9 UFC/ml, lo que indica que la presencia de las diferentes concentraciones de las sales no afecta el crecimiento de la cepa, pero si su porcentaje de supervivencia siendo en su mayoría más tolerantes a la presencia de esta concentración (figura 2). Además, la prueba de correlación de Pearson señala que las variaciones observadas revelan un comportamiento inversamente proporcional entre el crecimiento de las bacterias y las concentraciones de sales ($r= -0.3434$), indicando que a mayor concentración de sales biliares menor es la población de BAL.

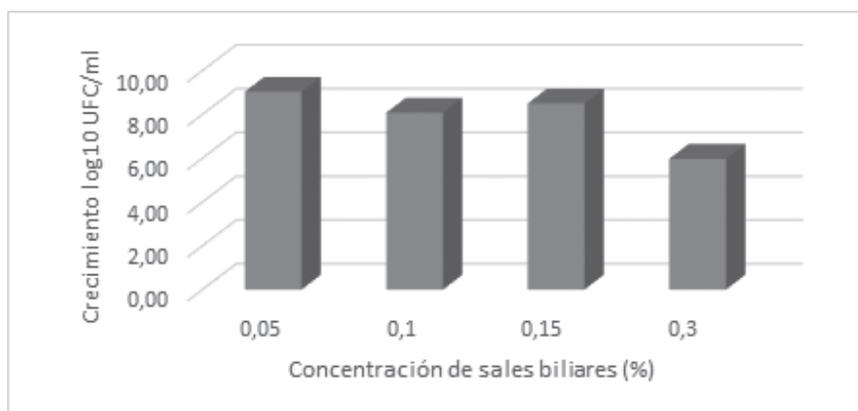


Figura 2. Tolerancia de las cepas ácido lácticas a sales biliares (%).

En todos los ensayos de este estudio se alcanzaron densidades poblacionales mayores a 10^8 UFC/ml excepto a la concentración de 0.3%, encontrándose dentro de los valores establecidos para microorganismos probióticos (Acedo y Rico, 1998); a diferencia de estudios realizados por Lara y Acosta (2013) quienes demostraron incrementos significativos en la concentración de UFC/ml después de 24 horas de incubación pasando de una densidad de 10^7 a 10^8 UFC/ml en todas las concentraciones de sales evaluadas (0.00%, 0.05%, 0.15%, 0.30%).

La Tabla 4 señala que *Lactobacillus mucosae* fue la que tuvo mayor densidad poblacional a la concentración de 0.3% coincidiendo con resultados de Valeriano et al. (2014) que indicaron que la cepa *L. mucosae* LM1 podría sobrevivir a una concentración de sal biliar de 0.3%.

Tabla 4. UFC/ml de bacterias ácido lácticas a 0.3% de sales biliares.

Cepa	UFC/ml
<i>Lactobacillus mucosae</i>	6.6×10^6
<i>Lactobacillus fermentum</i>	4.9×10^5
ML103	3.3×10^5
<i>Lactobacillus fermentum</i>	3.8×10^4
Ma105s	1.7×10^2

<i>Lactobacillus johnsonii</i>	8.0x10 ¹
Ma105bb	3.3x10 ¹
Maj	0

Fuente: cálculos del estudio

Lactobacillus fermentum también mostró tolerancia a esta baja concentración de sales, pero en menor cantidad de unidades formadoras de colonia, resultados que conciertan con los estudios realizados por Lin et al. (2007) que mostraron que las cepas de *L. fermentum* en la evaluación de su tolerancia a la bilis (0.3) después de 4 hrs de incubación fueron resistentes en un 100% encontrándose en la fase de crecimiento logarítmico medida por valores de DO a 620 nm. A pesar de su baja densidad poblacional *Lactobacillus johnsonii* también pudo resistir la concentración de sal biliar de 0.3%. Cho et al. (2000) observó en su estudio que *L. johnsonii* fue relativamente resistente a la sal biliar 0.3.

Tolerancia a diferentes temperaturas

El análisis de varianza mostró que las temperaturas evaluadas (30, 40°C) tienen un efecto estadísticamente significativo en el crecimiento de las bacterias ácido lácticas con un $p=0.0000$, lo que demuestra termotolerancia de las cepas a dichas temperaturas sin afectar su crecimiento. La prueba de múltiple rangos indica que a una temperatura de 40°C las cepas presentan un mayor número de unidades formadoras de colonias (3.1×10^8 UFC/ml) y no afecta su crecimiento como se muestra en la figura 3, resultados que coinciden con lo observado por Mora y García (2007), quienes mencionan que los *Lactobacillus* pueden desarrollarse con límites de temperatura que oscilan entre 2 y 52°C, siendo su rango óptimo de crecimiento entre 30 a 40°C, característica importante de las bacterias puesto que les permite crecer en diferentes temperaturas.

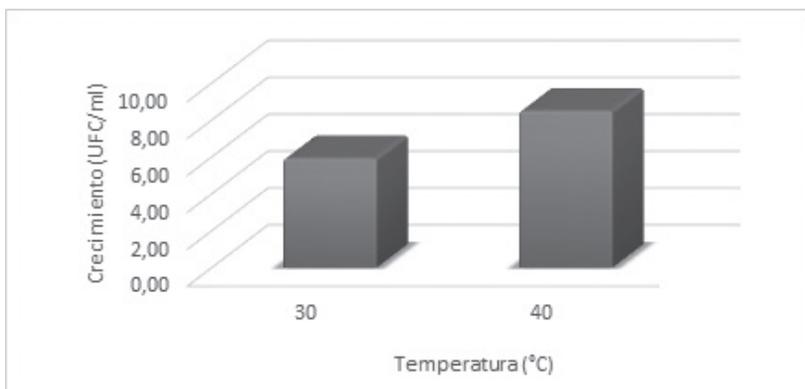


Figura 3. Tolerancia de las cepas ácido lácticas a cambios de temperatura (°C).

La figura 4 muestra que *Lactobacillus fermentum* fue la que tuvo mejor comportamiento a 40°C frente a la variable respuesta, con una media de 1.4×10^9 UFC/ml, seguido por *Lactobacillus mucosae* con un valor de 5.0×10^8 UFC/ml, indicando con ello que estas bacterias no son susceptibles a las variaciones de temperatura en este rango y que tienen capacidad de crecer en cantidades adecuadas (10^8 UFC/ml), a temperaturas relativamente altas como las encontradas en el rumen (38° y 42° C) (Van Lier, 2009). Estudios realizados por De Angelis et al. (2006) han confirmado en *L. mucosae* resistencia a temperaturas de 70°C durante 10 s, encontrando una alta supervivencia celular en esta especie ($9.35 \log \text{ UFC ml}^{-1}$).

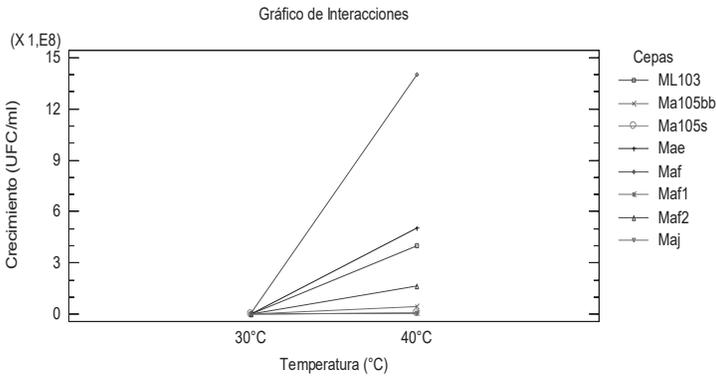


Figura 4. Interacción entre cepa – temperatura en el crecimiento de las cepas ácido lácticas (Mae= *L. mucosae*, Maf= *L. fermentum*, Maf1= *L. johnsonii* Maf2= *L. fermentum*).

Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl

El análisis de varianza realizado para el crecimiento arrojó diferencias significativas entre las concentraciones de sales evaluadas con un $p=0.0000$, siendo notable al 2% (0.99) y 4% (0.27) y muy bajo al 7% (0.07) y 10% (0.04) p/v de NaCl como lo mostró la prueba de Tukey, indicando que el crecimiento está determinado por el tipo de bacteria y la respectiva concentración de NaCl a la que fue sometida. Asimismo, la prueba de Pearson mostró que este fue inversamente proporcional a la concentración de NaCl con un valor de $r= -0.6037$, reflejando que a medida que aumenta la concentración de sales el crecimiento va disminuyendo notablemente (figura 5).

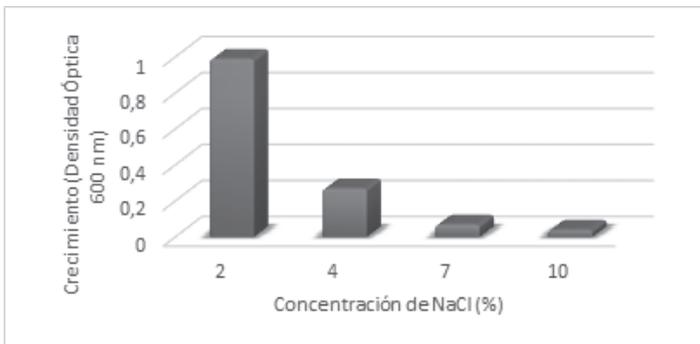


Figura 5. Tolerancia de las cepas ácido lácticas a diferentes concentraciones de NaCl.

En la Tabla 5 se describen las cepas ácido lácticas que tuvieron mayor crecimiento a altas concentraciones de NaCl siendo *Lactobacillus fermentum* la más considerable.

Tabla 5. UFC/ml de cepas ácido lácticas a concentración de NaCl 10%

Cepa	DO (600 nm)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0.08
ML103	0.06
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0.04
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0.04
Maj	0.04
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0.03
Ma105bb	0.02
Ma105s	0.01

Fuente: cálculos del estudio

Los resultados en este estudio también fueron similares a los obtenidos por Lara y Burgos (2012) quienes comprobaron que efectivamente el crecimiento de los microorganismos evaluados fue también mayor en 2 y 4% de NaCl.

Fermentación de la glucosa

La figura 6 muestra que la producción de gas fue negativa solo para *Lactobacillus johnsonii* y Ma105bb, las demás produjeron gas. Estas cepas que fermentaron la glucosa sin producción de gas durante las 24 hrs de in-cubación demostraron una asimilación del carbohidrato lo que evidencia la ruta metabólica homofermentativa utilizada por el género *Lactobacillus* sp., indicando la producción de ácido láctico (Lara y Burgos, 2012); resultados que coinciden con Taheri et al. (2009) quienes asegura que *L. johnsonii* pertenece al grupo de las bacterias homofermentativas obligadas.

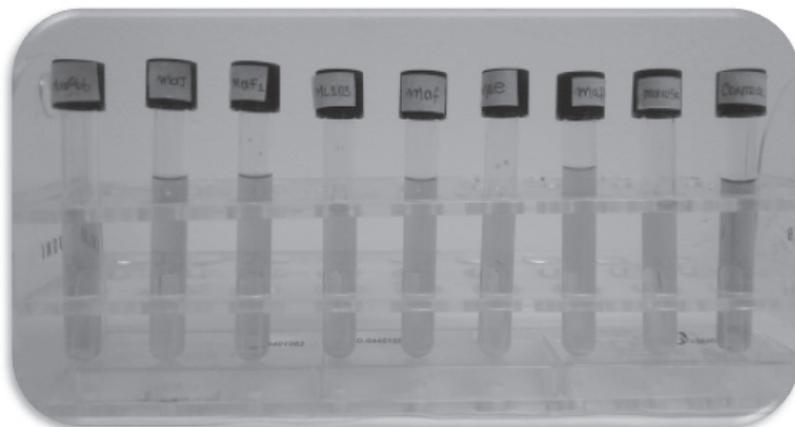


Figura 6. Capacidad de fermentación de la glucosa por las cepas ácido lácticas en solución de púrpura de bromocresol (0,5%) y campanas de Durham.

Según Díaz et al. (2014) *L. fermentum* presenta un tipo de metabolismo heterofermentativo obligado. Asimismo, Soriano et al. (2014) señaló que *L. mucosae* es conocida por ser heterofermentativa coincidiendo con los resultados obtenidos en este ensayo. De igual forma, Mamud et al., (2012) también indicó que los resultados obtenidos durante la caracterización de los metabolitos y la producción de gas de *L. mucosae* demostraron que esta bacteria es capaz de producir CO₂ y H₂ cuando se cultiva en medio MRS, básicamente como productos de la fermentación anaeróbica de la glucosa contenida en el medio.

Prueba de antagonismo

El ensayo de inhibición in vitro mostró que todas las cepas de *Lactobacillus* sp., fueron capaces de ejercer un efecto inhibitorio contra los 3 patógenos (*Salmonella*, *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia Coli*) con halos entre 0.8 y 1 mm de distancia, que son independientes de la cantidad de discos manejados en agar. El análisis de varianza realizado para el crecimiento mostró estadísticamente diferencias significativas entre las cepas y los patógenos evaluados con un $p= 0.000$. La prueba de Tukey señaló que *E. Coli* fue el patógeno mayormente inhibido por las cepas con una media de 1 mm, seguido por *Salmonella* (0.9 mm) y finalmente *P. aureginosa* con un valor de 0.8 mm (figura 7), coincidiendo con Mahmoudi

et al. (2016) quienes demostraron que tanto la cepa *L. fermentum* B116 como B19 mostraron las mayores capacidades de inhibición contra *E. Coli* ($d = 10/$ pm 0.47 mm y $9/$ pm 0.39 mm, respectivamente).

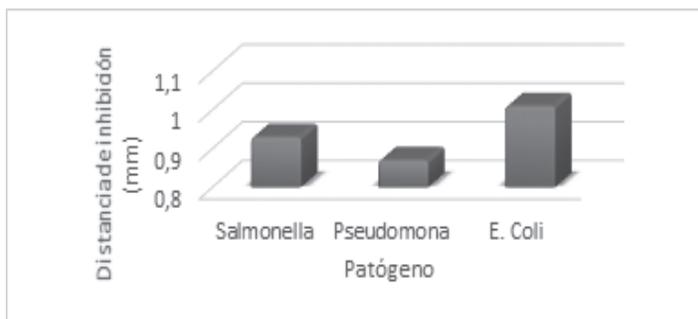


Figura 7. Halos de inhibición producido por las cepas ácido lácticas.

En este ensayo se observó que las colonias de bacterias inhibieron el crecimiento de los patógenos evaluados en una baja proporción, debido a que presentaron halos alrededor de los discos de papel filtro que no superaron los 2 mm, resultados similares a los obtenidos por Lara y Burgos (2012) quienes demostraron en su estudio que *Lactobacillus* sp., también produjo halos de inhibición de 1mm frente a *Salmonella* y *E. Coli*.

En la figura 8 se observa que las cepas que tuvieron mejor inhibición frente a los patógenos fueron: Ma105s (1.2 mm) y Maf2 - *L. fermentum* - (1.1 mm) frente a *E. Coli*, Maf1 - *L. johnsonii* (1.2 mm) y Ma105bb (0.9) frente a *P. aureginosa* Maf1 - *L. johnsonii* (0.9) y Ma105s (0.9) frente a *Salmonella*. Estos resultados están de acuerdo con Lin et al., (2007) quienes señalan que la mayoría de las cepas de *L. fermentum* son inhibidoras de bacterias patógenas Gram-negativas, tales como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y bacterias Gram-positivas, como *S. aureus* enterotoxigénicos aunque las amplitudes inhibitorias son variables. Asimismo, Mahmoudi et al. (2016) comprobaron que tanto la cepa *L. fermentum* B116 como B19 mostraron las mayores capacidades de inhibición contra *E. Coli* ($d = 10/$ pm 0.47 mm y $9/$ pm 0.39 mm, respectivamente).

Valeriano et al., (2014) también han demostrado que *L. mucosae* (LM1) aislada recientemente de las heces de lechones era capaz de producir una bacteriocina putativa que ejercía un efecto inhibitor sobre

el crecimiento de *Escherichia coli* K88 y *Salmonella typhimurium* KCCM 40253.

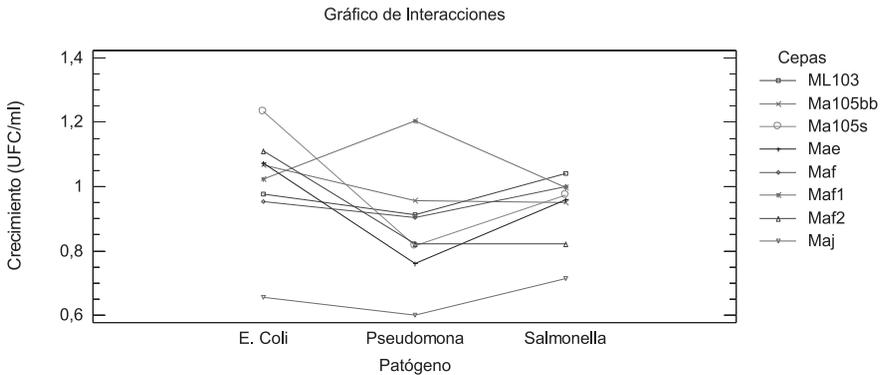


Figura 8. Interacción de cepas – patógenos en la producción de halos de inhibición por las cepas en estudio (Mae= *L. mucosae*, Maf= *L. fermentum*, Maf1= *L. johnsonii* Maf2= *L. fermonum*).

Este proceso de inhibición probablemente se deba a la producción de sustancias como resultado de la fermentación, principalmente la generación de compuestos antimicrobianos, tales como los ácidos lácticos, acético y propiónico, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la reuterina, el dióxido de carbono (CO_2), el diacetilo (2,3-butanodiona), el acetaldehído y compuestos de alto peso molecular como las bacteriocinas, característico del metabolismo de las bacterias lácticas (Ramírez, 2005). De hecho, uno de los más importantes mecanismos por el cual las BAL inhiben a sus competidores se da por la producción de ácido láctico, acético y bacteriocinas, metabolitos antimicrobianos que pueden ser beneficiosos para la conservación de los alimentos (Dunne et al., 2001; Bernet-Camard et al., 1997). Barrow et al., (1980) señalaron que el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, como las bacterias coliformes, podría ser inhibido cuando el pH del medio era inferior a 4.5 y las cepas de este estudio toleraron valores de pH inferiores a este, dato importante para considerarse como bacterias con potencial probiótico.

Capacidad de crecimiento

En la figura 9 se muestra el crecimiento de la cepa Mae (*Lactobacillus mucosae*) y Maf (*Lactobacillus fermentum*) en medio de cultivo de lactosuero. La fase exponencial se alcanzó primero en *L. mucosae* a las 6 hrs (tiempo 2) con un valor de 5.8×10^7 UFC/ml, mientras que *L. fermentum* tuvo mayor cantidad de unidades formadoras de colonia a las 12 hrs (tiempo 3), con un valor de 1.5×10^8 UFC/ml, resultados que coinciden con los reportados por Jurado et al. (2014) donde *L. plantarum* también tuvo su crecimiento máximo a las 12 hrs con un valor de 6.75×10^{12} UFC/ml, lo que indica que ese es el tiempo mínimo de duración del proceso fermentativo. Además, estos valores estarían relacionados con los reportados por Acedo y Rico (1998) quienes afirman que las concentraciones más frecuentes de un microorganismo probiótico oscilan entre 10^8 y 10^{10} UFC/ml.

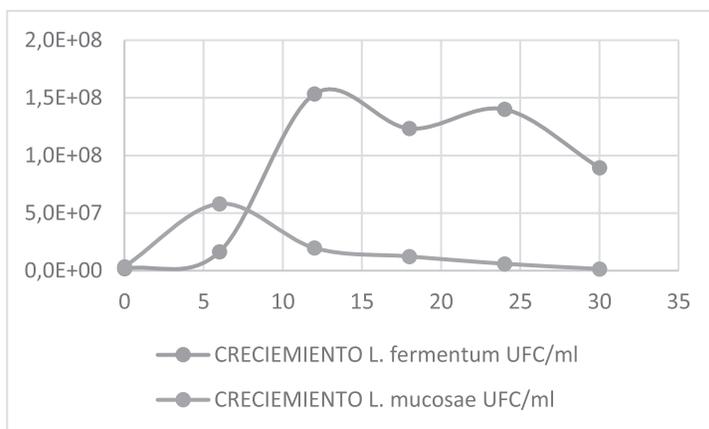


Figura 9. Curva de crecimiento de *Lactobacillus mucosae* y *Lactobacillus fermentum* en medio de lactosuero.

En ese sentido, *Lactobacillus fermentum* puede ser un microorganismo óptimo para ser utilizado en la preparación de inóculos, por cuanto a las 12 horas la bacteria alcanza la fase exponencial de crecimiento, disponiendo de una concentración celular suficiente para mantener una viabilidad alta en el tiempo. Además, tratándose de su crecimiento en un medio de cultivo de lactosuero que desde el punto de vista económico es una materia prima barata, asequible y lo más importante proporciona los nutrientes necesarios

para el crecimiento de bacterias lácticas, lo que permitiría la producción de inóculos con propiedades probióticas para futuros estudios en animales in vivo, debido a que los costos de producción del medio serían de gran interés siendo factible el proceso de producción a nivel industrial de estos inóculos para este tipo de microorganismos.

Identificación molecular por PCR

La identificación de bacterias probióticas a través de la secuenciación 16S rRNA es una técnica adecuada y accesible (FAO / OMS, 2002). En el presente estudio la base de datos de secuencias tipo del algoritmo Seqmatch-RDP contra aislamientos cultivados indicó que las secuencias problemas ensambladas fueron muy similares en la mayoría de sus longitudes con las cepas tipo identificadas como: *Lactobacillus fermentum* (Maf – Maf2), *Lactobacillus mucosae* (Mae) y *Lactobacillus johnsonii* (Maf1).

Los resultados del análisis taxonómico dan prueba de ello demostrando que la secuencia ensamblada de 1502 pb contra la base de datos refseq/RNA del NCBI, indicó que tiene un 99% de identidad en el 99% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Lactobacillus fermentum* (Maf – Maf2). Asimismo, la secuencia ensamblada de 1495 pb contra la misma base de datos, indicó que tiene un 100% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Lactobacillus mucosae* (Mae). Finalmente, la secuencia ensamblada de 1493 pb también, indicó que tiene un 99% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Lactobacillus johnsonii* (Maf1) (CorpoGen, 2017).

De otra parte, las secuencias en estudio también fueron comparadas con secuencias homologas de la base de datos de GenBank mostrando que efectivamente las secuencias estudiadas son muy similares a secuencias de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus mucosae* y *Lactobacillus johnsonii* con un 99% de identidad y 100% de cobertura (anexo 16). El árbol de distancia muestra que las secuencias estudiadas con un soporte de ramas del 100% se agrupan con las respectivas especies, demostrando que las tres cepas aisladas están asociadas a un mismo grupo perteneciente al género *Lactobacillus*. Además, se observa que la cepa Maf y Maf2 están relacionadas en un 99% correspondiendo a la misma especie *Lactobacillus fermentum* (figura 10).

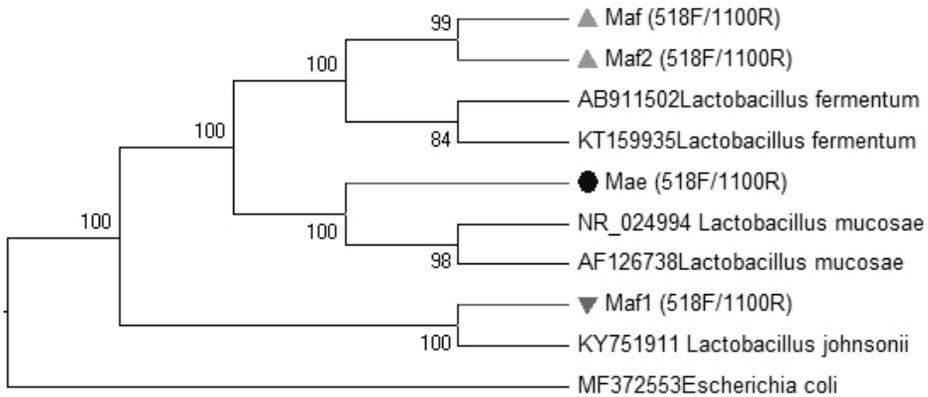


Figura 10. Árbol de distancias de las secuencias en estudio a partir de la base de datos GenBank.

Conclusiones

Las cepas aisladas demostraron su potencial como probióticos en condiciones *in vitro* con una adecuada formación de biomasa para la producción de inóculo, razón por la cual estas bacterias obtenidas podrían ser utilizadas como aditivos en alimentos para humanos o animales; siendo *Lactobacillus fermentum* (Maf – Maf2) y *Lactobacillus mucosae* (Mae) las que presentaron mayor viabilidad como probióticos, por lo que podrían ser una alternativa factible para sustituir las terapias con antibióticos.

Referencias Bibliográficas

- Acedo, J. y Rico, G. 1998. Utilización de aditivos en piensos para rumiantes: minerales forma orgánica, levaduras, enzimas, ionóforos y otros. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar.
- Armstrong, J.D., Kraeling, R.R. y Britt, J.H. (1988). Effects of naloxone or transient weaning on secretion of LH and prolactin in lactating sows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83, 301-30.
- Ávila, J., Ávila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, y., Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, 20(2):161-169.

- Bernet-Camard, M-F., Liévin, V., Brassart, D., Neeser, J.-R., Servin, A.L. y Hudault, S. (1997). The human *Lactobacillus acidophilus* strain Lal secretes a non bacteriocin antibacterial substance active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2747–2753.
- Brizuela, M. (2003). Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis Doctoral. ICIDCA, Cuba. p.101.
- CORPOICA - INCODER. (2005). Zonificación agroecológica y evaluación económica de sistemas de producción prioritarios en el área de desarrollo rural Sabanas de Sucre. Bogotá.
- Corporación Corpogen (2017). Investigación y Biotecnología.
- Cueva, D.F. (2014). Efecto de dos aditivos prebióticos y probióticos en el crecimiento y condición corporal en terneras Holstein friesian, Tumbaco, Pichincha. Quito – Ecuador.
- Cho, J. S., Choi, Y. J., y Chung, D. K. (2000). Expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii* and characterization of the genetically modified probiotic lactobacilli. *Current microbiology*, 40(4), 257-263.
- De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G. y Gobbetti, M. (2006). Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology*, 157(8), 792-801.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas, DANE (2011). Cuentas Nacionales. Recuperado en diciembre de 2012 de http://www.dane.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=127&Itemid=84.
- Du Toi, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F., y Holzapfel, W.H. (1998). Characterisation and selection of probiotic *Lactobacilli* for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *Inter. J. Food Microbiol.* 40, 93-104.
- 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., Collins, J. K. (2001). In vitro selec-

tion criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American J of Clin Nutr.* 73: 386-392S

- Federación Colombiana de Ganaderos FEDEGAN. (2000). *Manual Práctico del Ganadero.* 45p.
- Federación Colombiana de Ganaderos FEDEGAN (2011). *La Ganadería Colombiana y las Cadenas Láctea y Cárnica – Actualización cifras de referencia PEGA 2019.* Bogotá.
- Federación Colombiana de Ganaderos FEDEGAN. (2014). *Plan de desarrollo ganadero 2014 – 2019.* Bogotá. ISBN: 978-958-8498-73-7.
- Freitas, M., Tavan, E., Cayuela, C. y cols. (2003). Host-pathogens cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biol Cell*, 95, 503-506.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Intern J of Food Microbiol.* 141, S15–S28.
- Gutiérrez, L., Montoya, O., y Vélez, J. (2013). Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. Artículo de revisión. *Producción + Limpia* -. Vol.8, No.1 - 135●146.
- Lara Mantilla, C., y 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).
- Lara, C. y Burgos, A. (2012). Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 31-40.
- Lin, W. H., Yu, B., Jang, S. H., y Tsen, H. Y. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, 13(3), 107-113.
- Linton, A.H., Hedges, A.J., y Bennet, B. M. (1988). Monitoring of resistance during the use of olaquinox as a feed additive on commercial pig farms. *J. Appl. Bact.* 64, 311.
- Mahmoudi, I., Moussa, O. B., Khaldi, T. E. M., Kebouchi, M., Soligot, C., Le Roux, Y., y Hassouna, M. (2016). Functional in vitro screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk

- toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research*, 137, 91-98.
- Mora, N., y García, A. (2007). Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. [Tesis Licenciado Química en Alimentos]. [Hidalgo, México] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Parker, D.S., & Armstrong, D.G. (1987). Antibiotic feed additives and livestock reduction. *Proc. Nutr. Soc.* 46, 415.
- Soriano, A. P., Mamuad, L. L., Kim, S. H., Choi, Y. J., Jeong, C. D., Bae, G. S., y Lee, S. S. (2014). Effect of *Lactobacillus mucosae* on in vitro rumen fermentation characteristics of dried brewers grain, methane production and bacterial diversity. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(11), 1562.
- Soto, L.P., Frizzo, L.S., Avataneo, E., Zbrun, M.V., Bertozzi, E., Sequeira, G., Signorini, M.L., y Rosmini, M.R. (2011). Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165,176- 183.
- Suskovic, J., Brkic, B., Maticic, S., Maric, V. (1997). *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain *Milchwissenschaft* 52: 430 - 435.
- Taborda, J. (2011). Acompañamiento en el mejoramiento y calidad de la leche y en el proceso de certificación de hatos lecheros. (Documento en línea). Latacunga, EC. Consultado el 10 de Sep del 2013.
- Taheri, H., Tabandeh, F., Moravej, H., Zaghari, M., Shivazad, M., y Shariati, P. (2009). Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition. *African Journal of Biotechnology*, 8(21).
- Torres, C., Reguera, J.A. San Martín, M.J., Pérez-Díaz, J.C., y Baquero F. (2002). Van A-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. In sewage. *J Antimicrob Chemother*, 33, 553-561.
- Valeriano, V. D., Parungao-Balolong, M. M., y Kang, D. K. (2014). In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LMI. *Journal of applied microbiology*, 117(2), 485-497.
- Van Lier, 2009. Ecosistema ruminal. Disponible en <http://cursoaafa2009.webs.com/Ecosistema-Reticulo-Ruminal-2009.pdf>.

- Villena, F., y Jiménez, J. (2002). Técnico en ganadería. Madrid, ES. Editorial Cultural. p. 1- 46-70.
- Wallace, R. (1992). Rumen microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: the application of research findings to a complex microbial ecosystem. FEMS Microbiol. Lett.100: 529.
- Wannaprasat, W., Koowatananukul, C., Ekkapobyotin, C., y Chuanchuen, R., (2009). Qualityanalysis of commercial probiotic products for food animals. Southeast Asian J. of Tropical Med. and Pub. Health 40, 1103–1112.