

***In vitro* metabolic activity of *Lactobacillus salivarius* and its effect on productive and health indicators of lactating calves**

Actividad metabólica *In vitro* de *Lactobacillus salivarius* y su efecto en indicadores productivos y de salud de terneros lactantes

Ana J. Rondón¹, Juliet González¹, Marlen Rodríguez¹, Grethel Milián¹, Marlene M. Martínez¹,
A. Beruvides¹, Aymara Valdivia¹ and R. Vera²

¹Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO). Universidad de Matanzas. Autopista a Varadero km 3 ½. Matanzas, Cuba

²Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí. Finca El Limón. Calceta, Manabí, Ecuador

Email: ana.rondon@umcc.cu

Ana J. Rondón: <https://orcid.org/0000-0003-3019-1971>

Juliet González: <https://orcid.org/0000-0001-7041-1276>

Marlen Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0003-4248-3728>

Grethel Milián: <https://orcid.org/0000-0001-6074-7964>

Marlene M. Martínez: <https://orcid.org/0000-0001-7585-3725>

Agustín Beruvides: <https://orcid.org/0000-0002-8525-6595>

Aymara Valdivia: <https://orcid.org/0000-0001-7399-3638>

Ronald Vera: <https://orcid.org/0000-0002-8663-2943>

In vitro metabolic activity of *Lactobacillus salivarius* C-65 (constituent of PROBIOLACTIL[®] bio-preparation) and its effect on productive and health indicators of lactating calves was evaluated. For this, carbohydrate fermentation and the production of specific enzymes were determined *In vitro* using API 50 CH and API 50 CHL, and API-ZYM galleries, respectively. Furthermore, growth capacity and fermentative activity of *Lactobacillus salivarius* were evaluated in RALTEC Milk 17-1 milk replacer for 10 hours. The probiotic effect of PROBIOLACTIL[®] was assessed on bio-productive and health indicators of lactating calves. As a result, this microorganism ferments sugars galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, mannitol, sorbitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, inulin and D-raffinose. It was demonstrated that it produces enzymes that intervene in cellulose degradation, and other specific enzymes. This bacterium grew (15 LN CFU.mL⁻¹) in the milk replacer and decreased the pH (6.08-5.82) and total reducing sugars (44-29 mg. L⁻¹) in 10 hours. Finally, it was observed that calves that consumed the two doses of PROBIOLACTIL[®] (10 and 20 mL) showed differences (P < 0.05) when improving weight gain (8 vs. 16 kg), and daily mean gain (163 vs. 326 g), as well as reducing the incidence of diarrhea. It is concluded that the bio-prepared PROBIOLACTIL[®] presents high metabolic activity and is capable of causing a probiotic effect on productive and health indicators of lactating calves.

Key words: *probiotics, enzymes, health*

Several alternatives to replace antibiotics as animal growth promoters are currently being explored. These include biotherapeutic agents (probiotics, prebiotics and symbiotic), classified as products of natural origin, beneficial for health, with active biological properties and preventive and therapeutic capacity (Blanch *et al.* 2015, Corzo *et al.* 2015 and Pandey *et al.* 2015).

Different research projects were carried out for the development of probiotic products at the University

Se evaluó la actividad metabólica *In vitro* de *Lactobacillus salivarius* C-65 (constituyente del biopreparado PROBIOLACTIL[®]) y su efecto en indicadores productivos y de salud de terneros lactantes. Para ello se determinó *In vitro* la fermentación de carbohidratos y la producción de enzimas específicas mediante las galerías API 50 CH y API 50 CHL y API-ZYM, respectivamente. Se valoró además, la capacidad de crecimiento y la actividad fermentativa de *Lactobacillus salivarius* en el lactoreemplazante RALTEC Milk 17-1 en 10 horas. El efecto probiótico de PROBIOLACTIL[®] se evaluó en los indicadores bioproductivos y de salud de terneros lactantes. Como resultado, se obtuvo que este microorganismo fermenta los azúcares galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, manitol, sorbitol, N-acetil-glucosamina, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, inulina y D-rafinosa. Se comprobó que produce enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa, y otras enzimas específicas. Esta bacteria creció (15 LN UFC.mL⁻¹) en el lactoreemplazante y disminuyó el pH (6.08-5.82) y los azúcares reductores totales (44-29 mg.L⁻¹) en 10 horas. Por último, se observó que los terneros que consumieron las dos dosis de PROBIOLACTIL[®] (10 y 20 mL) mostraron diferencias (P < 0.05) al mejorar el incremento de peso (8 vs 16 kg), y la ganancia media diaria (163 vs 326 g), además de disminuir en ellos la incidencia de diarreas. Se concluye que el biopreparado PROBIOLACTIL[®] presenta alta actividad metabólica y es capaz de provocar efecto probiótico en los indicadores productivos y de salud de terneros lactantes.

Palabras clave: *probióticos, enzimas, salud.*

En la actualidad se exploran diversas alternativas para sustituir los antibióticos como promotores del crecimiento animal. Entre ellas se destacan los agentes bioterapéuticos (probióticos, prebióticos y simbióticos), catalogados como productos de origen natural, beneficiosos para la salud, con propiedades biológicas activas y con capacidad preventiva y terapéutica (Blanch *et al.* 2015, Corzo *et al.* 2015 y Pandey *et al.* 2015).

En la Universidad de Matanzas se ejecutaron diferentes

of Matanzas, which improve animal productive performance and health (Milián 2009 and Rondón 2009). PROBIOLACTIL® is one of them, which is a biopreparation made with *Lactobacillus salivarius* C65 strain. Its effect was evaluated in poultry and pigs with excellent results in improving productive indicators and health of these animals (Rondón *et al.* 2012, Rondón *et al.* 2013 and Rondón *et al.* 2018). However, the potential of this biopreparation in lactating calves, which are at a critical moment after separation from their mother, has not yet been evaluated. Frequently, these animals have diarrhea that can lead to live weight decrease and even death.

During weaning in rearing animals, calves are susceptible to enteric disorders caused by changes in diet and imbalances of the digestive microbiota, which, together with deficiency diseases and disorders in immunity, favor the appearance of health issues, with the consequent effect on productive indicators and delay in the incorporation of animals to development units (Rondón *et al.* 2019).

In recent years, *Lactobacillus salivarius* has been used as a probiotic for its high growth capacity and production of lactic acid and short-chain fatty acids (SCFA) (Sayan *et al.* 2018 and Seo *et al.* 2019). Instead, it is unknown whether this bacterium grows in the feed provided to calves during artificial rearing, or if it develops any fermentative activity in this supplement.

To carry out this research, the objective was to evaluate *In vitro* metabolic activity of *Lactobacillus salivarius* and its probiotic effect on productive and health indicators in lactating calves.

Materials and Methods

Biological material and culture media. *Lactobacillus salivarius* C-65 strain was used, isolated by Rondón *et al.* (2008) from cecum mucosa of broilers. It was obtained from the strain collection of the Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) of the University of Matanzas. Agar and MRS broth (CONDO, Spain) were among the culture media used (De Mann *et al.* 1960).

For metabolic activity characterization of *Lactobacillus salivarius* C-65, the tests described below were performed.

Cellulose hydrolysis. *Lactobacillus salivarius* C-65 was cultured on dishes with MRS agar, to which glucose was replaced by 1 % carboxymethyl cellulose. They were incubated for 48h at 37 °C. Hydrolysis halos were developed with a 1 % Congo red solution, exposed for 15 min. Subsequently, excess dye was removed and washed with a 2 mol. L⁻¹ NaCl solution (Lu *et al.* 2006).

Determination of carbohydrate fermentation capacity and production of specific enzymes. A strain culture was prepared in MRS broth (Condo, Spain) and incubated at 37 °C for 24 h. Cultures were centrifuged and washed in

proyectos de investigación para el desarrollo de productos probióticos que mejoran el rendimiento productivo y la salud de los animales (Milián 2009 y Rondón 2009). Entre ellos se encuentra PROBIOLACTIL®, biopreparado elaborado con la cepa *Lactobacillus salivarius* C65, cuyo efecto se evaluó en aves y cerdos con excelentes resultados en el incremento de los indicadores productivos y la salud de estos animales (Rondón *et al.* 2012, Rondón *et al.* 2013 y Rondón *et al.* 2018). Sin embargo, aún no se ha evaluado el potencial de este biopreparado en terneros lactantes, que están en un momento crítico tras la separación de la madre. Con frecuencia, estos animales presentan diarreas que pueden llevar a la disminución del peso vivo e incluso, a la muerte.

Durante el destete en recría, los terneros son susceptibles a trastornos entéricos provocados por cambios en la dieta y a desequilibrios en la microbiota digestiva, lo que unido a las enfermedades carenciales y a los trastornos en la inmunidad, favorece la presentación de problemas de salud, con la consecuente afectación en los indicadores productivos y el retardo en la incorporación de los animales a las unidades de desarrollo (Rondón *et al.* 2019).

En los últimos años, *Lactobacillus salivarius* se ha utilizado como probiótico por su alta capacidad de crecimiento y producción de ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Sayan *et al.* 2018 y Seo *et al.* 2019). En cambio, se desconoce si esta bacteria crece en el alimento que se suministra a los terneros durante la crianza artificial, y si desarrolla alguna actividad fermentativa en este suplemento.

Para realizar esta investigación se planteó como objetivo evaluar la actividad metabólica *In vitro* de *Lactobacillus salivarius* y su efecto probiótico en indicadores productivos y de salud en terneros lactantes.

Materiales y Métodos

Material biológico y medios de cultivo. Se utilizó la cepa *Lactobacillus salivarius* C-65, aislada por Rondón *et al.* (2008) a partir de la mucosa del ciego de pollos de ceba. Se obtuvo del cepario del Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas. Entre los medios de cultivo que se utilizaron se encuentran agar y caldo MRS (CONDO, España) (De Mann *et al.* 1960).

Para la caracterización de la actividad metabólica de *Lactobacillus salivarius* C-65 se realizaron los ensayos que se describen seguidamente.

Hidrólisis de la celulosa. Se realizó el cultivo de *Lactobacillus salivarius* C-65 en placas con agar MRS, al que se le sustituyó la glucosa por carboximetil celulosa al 1 %. Estas se incubaron durante 48 h a 37 °C. Los halos de hidrólisis se revelaron con una solución de rojo congo al 1 %, expuesta por 15 min. Posteriormente, se retiró el exceso del colorante y se lavó con una solución de NaCl 2 mol.L⁻¹ (Lu *et al.* 2006).

Determinación de la capacidad de fermentación de carbohidratos y producción de enzimas específicas. Se preparó un cultivo de la cepa en caldo MRS

saline solution (0.9 % NaCl), and from this moment on, the methodology described for API 50 CH, API 50 CHL and API -ZYM galleries was followed (BioMerieux, S.A., France).

Determination of In vitro growth capacity and fermentative activity of Lactobacillus salivarius C-65 in RALTEC® Milk 17-1 milk replacer for calves. An experiment with a completely randomized design and three repetitions was performed. Growth kinetics of *L. salivarius* C-65 was developed in the milk replacer for 10 h at 37 °C. For this, the milk replacer was diluted at a rate of 100 g.L⁻¹ of drinking water at 55°C, distributed into 18 Erlenmeyers, of 250 mL with 100 mL of effective volume. These were sterilized at 121 °C for 15 min. Subsequently, they were inoculated at 10 % with bacterial culture, grown in MRS broth at 37 °C for 18 h. To determine the growth every two hours, the method of serial dilutions in peptone water of (1 %) and plating with MRS agar (Harrigan and McCance 1968) were used. The pH was also determined using a digital pH meter (Sartorius Meter PP-25), as well as total reducing sugars (TRS), using the 3.5 dinitrosalicylic acid method (Miller 1959).

The milk replacer contains whey powder, lard, lactose-free whey powder, soy protein concentrate (genetically modified), lactalbumin powder, wheat gluten, and pregelatinized wheat starch. Table 1 describes the analytical components of this milk replacer.

For evaluating the probiotic effect PROBIOLACTIL®

(Condo, España) y se incubó a 37 °C durante 24 h. Los cultivos se centrifugaron y lavaron en solución salina (0.9 % de NaCl), y a partir de este momento se siguió la metodología descrita para las galerías API 50 CH, API 50 CHL y API -ZYM (BioMerieux, S. A., Francia).

Determinación de la capacidad de crecimiento In vitro y actividad fermentativa de Lactobacillus salivarius C-65 en lactoreemplazante para terneros RALTEC® Milk 17-1. Se realizó un experimento con diseño completamente aleatorizado y tres repeticiones. Se desarrolló la cinética de crecimiento de *L. salivarius* C-65 en el lactoreemplazante durante 10 h a 37 °C. Para ello se diluyó el sustituto lácteo, a razón de 100 g.L⁻¹ de agua potable a 55 °C, distribuido en 18 elermenyers, de 250 mL con 100 mL de volumen efectivo. Estos se esterilizaron a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, se inocularon al 10 % con el cultivo bacteriano, crecido en caldo MRS a 37°C durante 18 h. Para determinar el crecimiento cada dos horas, se utilizó el método de las diluciones seriadas en agua de peptona (1 %) y la siembra en placas con agar MRS (Harrigan y McCance 1968). También se determinó el pH mediante un pH metro digital (Sartorius Meter PP-25) y los azúcares reductores totales (ART), a partir de la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico (Miller 1959).

El lactoreemplazante contiene suero de leche en polvo, manteca de cerdo, suero de leche deslactosado en polvo, concentrado de proteína de soya (genéticamente modificada), lactoalbúmina en polvo, gluten de trigo y almidón de trigo pregelatinizado. En la tabla 1 se describen los componentes analíticos de este sustituto lácteo.

Table 1. Analytic components of milk replacer (Raltec® 2019)

Components	%
Crude protein	21.00
Crude fiber	0.70
Crude fats and oils	17.30
Crude ash	7.00
Calcium	0.65
Sodium	0.40
Phosphorous	0.55

on the productive and health indicators in lactating calves, an experiment was developed in which the following aspects were considered:

Preparation of the biopreparation. The probiotic additive was prepared according to the methodology described by Rondón (2009) for PROBIOLACTIL®.

Experimental design. The experiment was carried out for eight weeks in Recría 306, belonging to the Empresa Pecuaria Genética de Matanzas. A completely randomized design was used and 45 male Mambí de Cuba calves were used, from seven weeks (50 d) of age. Three treatments were organized with 15 animals each: Group I-Control; Group II, 10 mL of

Para la evaluación del efecto probiótico PROBIOLACTIL® en los indicadores productivos y de salud en terneros lactantes se desarrolló un experimento en el que se consideraron los siguientes aspectos:

Elaboración del biopreparado. La elaboración del aditivo probiótico se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Rondón (2009) para PROBIOLACTIL®.

Diseño experimental. El experimento se realizó durante ocho semanas en la Recría 306, perteneciente a la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas. Se empleó un diseño completamente aleatorizado y se utilizaron 45 terneros machos, de la raza Mambí de Cuba, a partir de las siete

PROBIOLACTIL® per kg of food and Group III, 20 mL of PROBIOLACTIL® per kg of food. Productive and health indicators, such as live weight and weight gain, daily mean gain (DMG) and diarrhea incidence, were weekly evaluated.

Management and feeding conditions. Before calves were transferred to a rearing experimental unit, dedicated to weaning animals, it underwent a sanitary fitting out according to IMV (1998). A basal diet was supplied, prepared from the complete lactation concentrate/RALTEC Milk 17 or milk replacer (diluted in drinking water at 50-55 °C for the intake of calves, in proportion of 100 g of food per liter of water, at a temperature between 38 and 40 °C) and complementary lactation concentrate (Raltec 2019).

Statistical analysis. The data were evaluated by applying a simple analysis of variance model, with prior verification of normal distribution of data and of variance homogeneity. In case of differences, Duncan (1955) comparison test was applied. All tests were performed using INFOSAT statistical program, 2012 version (Di Rienzo *et al.* 2012). To statistically analyze the results of diarrhea incidence, the ComparPro program, version 1, was used (Font *et al.* 2007).

Results and Discussion

In vitro characterization of the metabolic activity of *Lactobacillus salivarius* C-65 was performed. Table 2 shows the results of carbohydrates fermentation by this bacterium. Of the evaluated substrates, the strain used 14 of them. This result indicates that the microorganism under study has enzymatic batteries, in charge of catalyzing the fermentation of different carbohydrates.

Lactobacilli are demanding in terms of amino acids, peptides, nucleotides, vitamins, minerals, fatty acids and carbohydrates. They are classified as homolactic and hetero-lactic based on the fermentation route they use. Under conditions of glucose excess and limited use of oxygen, homolactic ones transform one mole of glucose through the Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway, to form two moles of pyruvate. Intracellular redox balance is maintained by NADH oxidation, with the concomitant reduction of pyruvate in lactic acid. This process generates two moles of ATP for each consumed mole of glucose (Jurado-Gómez *et al.* 2013).

L. salivarius C-65 was found to be a bacterium capable of using carbohydrates within the diet of animals, so once they are provided with food, they must participate in sugar degradation to produce, fundamentally, lactic acid. Hence, they are considered as homofermentative. This characteristic supports its selection as a probiotic because homofermentative cultures provide food with better organoleptic characteristics for human and animal consumption (Brizuela 2003).

semanas (50 d) de edad. Se organizaron tres tratamientos con 15 animales cada uno: Grupo I, Control; Grupo II, 10 mL de PROBIOLACTIL® por kg de alimento y Grupo III, 20 mL de PROBIOLACTIL® por kg de alimento. Se evaluaron semanalmente indicadores productivos y de salud, como el peso vivo e incremento de peso, la ganancia media diaria (GMD) y la incidencia de diarreas.

Condiciones de manejo y alimentación. Antes de trasladar los terneros a la nave experimental de la recría, dedicada a los animales en destete, se sometió a una habilitación sanitaria según IMV (1998). Se suministró la dieta basal, elaborada a partir del concentrado completo de lactancia/lactoreemplazante RALTEC MILK 17 o sustituto lácteo (diluido en agua potable a 50-55 °C para el consumo de los terneros, en proporción de 100 g del alimento por litro de agua, a temperatura entre 38 y 40 °C) y concentrado complementario de lactancia (Raltec 2019).

Análisis estadístico. Los datos se evaluaron mediante la aplicación de un modelo de análisis de varianza simple, con previa comprobación de la distribución normal de los datos y de la homogeneidad de varianza. Cuando existieron diferencias, se aplicó la dócima de comparación de Duncan (1955). Todas las pruebas se realizaron mediante el programa estadístico INFOSAT, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012). Para analizar estadísticamente los resultados de la incidencia de diarreas, se utilizó el programa ComparPro versión 1 (Font *et al.* 2007).

Resultados y Discusión

Se realizó la caracterización *In vitro* de la actividad metabólica de *Lactobacillus salivarius* C-65. En la tabla 2 se muestran los resultados de la fermentación de los carbohidratos por esta bacteria. De los sustratos evaluados, la cepa utilizó 14 de ellos. Este resultado indica que el microorganismo en estudio presenta baterías enzimáticas, encargadas de catalizar la fermentación de diferentes carbohidratos.

Los lactobacilos son exigentes en cuanto a aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos. Se clasifican en homolácticos y heterolácticos a partir de la vía de fermentación que utilizan. En condiciones de exceso de glucosa y uso limitado de oxígeno, los homolácticos transforman un mol de glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas para formar dos moles de piruvato. El balance redox intracelular se mantiene por la oxidación de NADH, con la concomitante reducción del piruvato en ácido láctico. Este proceso genera dos moles de ATP por cada mol de glucosa consumido (Jurado-Gómez *et al.* 2013).

Se comprobó que *L. salivarius* C-65 es una bacteria capaz de utilizar carbohidratos presentes en la dieta de animales, por lo que una vez que se suministren con el alimento deben participar en la degradación de azúcares para producir, fundamentalmente, ácido láctico. De ahí que se consideren homofermentativas. Esta característica sustenta su elección como probiótico, ya que los cultivos homofermentativos le proporcionan a los alimentos

Table 2. Carbohydrate fermentation profile by *Lactobacillus salivarius* C-65 strain

Carbohydrates	<i>L. salivarius</i> C-65	Carbohydrates	<i>L. salivarius</i> C-65
Control	-	Arbutin	-
Glycerol	-	Esculin	-
Erythritol	-	Salicin	-
D-Arabinose	-	Cellobiose	-
L-Arabinose	-	Maltose	+
Ribose	-	Lactose	+
D-Xylose	-	Melibiose	+
L-Xylose	-	Sucrose	+
Adonitol	-	Trehalose	+
α -Methyl-D-xyloside	-	Inulin	+
Galactose	+	Melezitose	-
D-Glucose	+	D-Raffinose	+
D-Fructose	+	Starch	-
D-Mannose	+	Glycogen	-
L-Sorbose	-	Xylitol	-
Rhamnose	-	α -Gentiobiose	-
Dulcitol	-	D-Turanose	-
-			
Inositol	-	D-Lyxose	-
Mannitol	+	D-Tagatose	-
Sorbitol	+	D-Fucose	-
α -Methyl-D-Mannoside	-	L-Fucose	-
α -Methyl-D-Glucoside	-	D-Arabitol	-
N-Acetyl-Glucosamine	+	L-Arabitol	-
Amygdaline			

+ positive; - negative

Lactic acid bacteria are studied due to their ability to grow in difficult environments and generate antagonisms with other microorganisms. From these sugars, organic acids will be produced, such as lactic acid, which is one of the substances that inhibit the growth of pathogenic microorganisms (Jurado-Gómez *et al.* 2015). These results can be related to what happens at GIT level, because it is known that, in this ecosystem, microorganisms produce short-chain fatty acids (SCFA), product of the fermentation of many of these carbohydrates. These compounds are the main final products of bacterial fermentation, regulate the development and cell differentiation of the GIT, and have trophic or nutritional effects on the intestinal epithelium, which contributes to the recovery of inflammatory effects and to reduction of risks of bacterial translocation during alteration of the intestinal barrier (Kolb 1976).

For the above, if these bacteria are applied to diet, they would contribute to the contribution of SCFA as an energy source for animals, because these acids are produced in the GIT, metabolized in the mucosa and efficiently transported, so considerable amounts can reach the blood for later use. The contribution of SCFAs

mejores características organolépticas para el consumo humano y animal (Brizuela 2003).

Las bacterias ácido-lácticas se estudian por su capacidad de crecer en ambientes difíciles y generar antagonismos con otros microorganismos. A partir de estos azúcares, se producirán ácidos orgánicos, como el láctico, que es una de las sustancias inhibidoras del crecimiento de los microorganismos patógenos (Jurado-Gómez *et al.* 2015). Estos resultados se pueden relacionar con lo que sucede a nivel del TGI, pues se conoce que, en este ecosistema, los microorganismos producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC), producto de la fermentación de muchos de estos carbohidratos. Estos compuestos son los principales productos finales de la fermentación bacteriana, regulan el desarrollo y la diferenciación celular del TGI, además de que tienen efectos tróficos o nutritivos en el epitelio intestinal, lo que contribuye a la recuperación de los efectos inflamatorios y a la reducción de los riesgos de translocación bacteriana durante la alteración de la barrera intestinal (Kolb 1976).

Por lo antes expuesto, si se aplican estas bacterias a la dieta, contribuirían al aporte de AGCC como fuente de energía para los animales, pues estos ácidos se producen en el TGI, se metabolizan en la mucosa y se transportan

is considered to be 25-30 % for energy requirements of pig maintenance, 50 % for rabbits and 17 % for poultry (Savón 2002). Therefore, if there is an increase of SCFA in the intestine, there will be greater bioavailability of these substances as energy sources (Rondón and Laurencio 2008).

It was also confirmed that *Lactobacillus salivarius* C-65 ferments lactose. It is known that this disaccharide cannot be assimilated in its natural form, so its hydrolysis is necessary to assimilate monomers it generates (glucose and galactose). The ability to produce β -galactosidase, responsible for hydrolysis in the small intestine, decreases as the individual grows. By the time the animal reaches its maturity, it is possible that it may have partially or totally lost hydrolysis activity in its intestine. This will cause that, when it consumes lactose, either in milk or its derivatives, it presents flatulence, abdominal pain, with or without diarrhea, which is called lactose intolerance (Sánchez *et al.* 2015).

Another important result is inulin fermentation. Some authors, such as Ayala *et al.* (2018), report that this substance stimulates the development of lactic acid bacteria. Rondón *et al.* (2019) developed a symbiotic biopreparation with *Lactobacillus salivarius* and henequen pulp (*Agave fourcroydes* Lem.), rich in inulin, and demonstrated that the application of this bioproduct in calves increased live weight and decreased the incidence of diarrhea in these animals.

Table 3 shows the production of specific enzymes by the strain. Out of 19 substrates present in the API-ZYM Tests, nine were used by *L. salivarius*. It was demonstrated that this bacterium has a strong catabolic action due to the production of peptidases (leucine, valine, and cystine aminopeptidase), phosphatases, phosphohydrolases, and galactosidases. Rada (1997) carried out an enzymatic study of several species of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, including three *Lactobacillus salivarius* species, isolated from feces and caeca of poultry, and obtained similar results.

It is stated that ingestion of lactic acid bacteria, which produce and release hydrolytic enzymes, may help the digestion of farm animals (Seifert and Gessler 1996). The evaluated strain produces β -galactosidase, which is an enzyme that contributes to lactose digestion in the GIT, especially in newborn mammals that consume mother's milk (Marteau *et al.* 1997). In addition, it was found that this bacterium does not produce β -glucuronidase and β -glucosidase, enzymes that generate the release of toxic or carcinogenic substances, out of harmless complexes in GIT (De Ross and Katan 2000).

Figure 1 shows the result of cellulose decomposition test by *Lactobacillus salivarius* C65. The image shows the hydrolysis halo around the colony grown in MRS agar with carboxymethyl cellulose as carbon source.

There are only few studies on cellulolytic activity

eficientemente, por lo que cantidades considerables pueden llegar a la sangre para su utilización posterior. Se considera que el aporte de los AGCC es de 25-30 % para los requerimientos energéticos del mantenimiento en cerdos, 50 % para conejos y 17 % para pollos (Savón 2002). De manera que si se produce en el intestino incremento de los AGCC, habrá mayor biodisponibilidad de estas sustancias como fuentes de energía (Rondón y Laurencio 2008).

Se constató además, que *Lactobacillus salivarius* C-65 fermenta la lactosa. Se conoce que este disacárido no se puede asimilar en su forma natural, por lo que es necesario su hidrólisis para poder asimilar los monómeros que genera (glucosa y galactosa). La capacidad de producir la β -galactosidasa, enzima responsable de la hidrólisis en el intestino delgado, disminuye en la medida que el individuo crece. Cuando llega a la edad adulta, es probable que haya perdido parcial o totalmente la actividad de hidrólisis en su intestino. Esto provocará que cuando consuma lactosa, sea en leche o en sus derivados, presente un cuadro de flatulencia, dolor abdominal, con diarrea o sin ella, al que se le denomina intolerancia a la lactosa (Sánchez *et al.* 2015).

Otro resultado importante es la fermentación de la inulina. Algunos autores como Ayala *et al.* (2018) refieren que esta sustancia estimula el desarrollo de las bacterias ácido lácticas. Rondón *et al.* (2019) elaboraron un biopreparado simbiótico con *Lactobacillus salivarius* y pulpa de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) rica en inulina, y demostraron que la aplicación de este bioproducto en terneros provocaba el incremento de peso y disminuía la incidencia de diarreas en estos animales.

La producción de enzimas específicas por parte de la cepa se muestra en la tabla 3. De 19 sustratos presentes en los Test API-ZYM, nueve se utilizaron por *L. salivarius*. Se demostró que esta bacteria tiene fuerte acción catabólica por la producción de peptidasas (leucina, valina y cistina aminopeptidasa), fosfatasa, fosfohidrolasas y galactosidasas. Rada (1997) realizó un estudio enzimático de varias especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, entre las que se incluían tres especies de *Lactobacillus salivarius*, aisladas de heces y ciegos de pollos, y obtuvo resultados similares.

Se plantea que la ingestión de bacterias ácido lácticas, que producen y liberan enzimas hidrolíticas, puede ayudar a la digestión de los animales de granja (Seifert y Gessler 1996). La cepa que se evaluó produce β -galactosidasa, enzima que contribuye a la digestión de la lactosa en el TGI, en especial en los mamíferos recién nacidos que consumen leche materna (Marteau *et al.* 1997). Se comprobó además, que esta bacteria no produce β -glucuronidasa y β -glucosidasa, enzimas que generan la liberación de sustancias tóxicas o carcinógenas a partir de complejos inocuos en el TGI (De Ross y Katan 2000).

En la figura 1 se muestra el resultado de la prueba de la descomposición de la celulosa por *Lactobacillus salivarius* C65. En la imagen se observa el halo de hidrólisis alrededor de la colonia crecida en agar MRS con carboximetilcelulosa como fuente de carbono.

Table 3. Production of specific enzymes for *Lactobacillus salivarius* C-65 in different substrata

Substrata	Enzyme	<i>L. salivarius</i> C-65
Control	Control	-
2-naphthyl phosphate	Alkaline phosphatase	2
2-naphthyl butyrate	Esterase (C1)	-
2-naphthyl caprylate	Esterase lipase	-
2-naphthyl myristate	Lipase (C14)	2
L-leucyl-2-naphthylamide	Leucine arylamidase	5
L-valyl-2-naphthylamide	Valine arylamidase	4
L-cystyl-2-naphthylamide	Cystine arylamidase	4
N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	Trypsin	-
N-glutaryl-phenylalanin-2-naphthylamide	α -chymotrypsin	-
2-naphthyl-phosphate	Acid phosphatase	4
Naphthol-AS-BI-phosphate	Naphthol-A-S-BI phosphohydrolase	5
6-Br-2-naphthyl-aD-galactopyranoside	α -galactosidase	4
2-naphthyl-bD-galactopyranoside	β -galactosidase	5
Naphthol-AS-BI-bD-glucuronic	β -glucuronidase	-
2-naphthyl-aD-glucopyranoside	α -glucosidase	-
6-BR-2-naphthyl-bD-glucopyranoside	β -glucosidase	-
1-naphthyl-N-acetyl-bD-glucosaminide	N-acetyl- β -glucosaminidase	-
6-BR-2-naphthyl-aD-mannopyranoside	α -mannosidase	-

Numeric values are ranges of color intensity in the test, from 0 (-) (negative reaction) up to 5 (maximum activity)

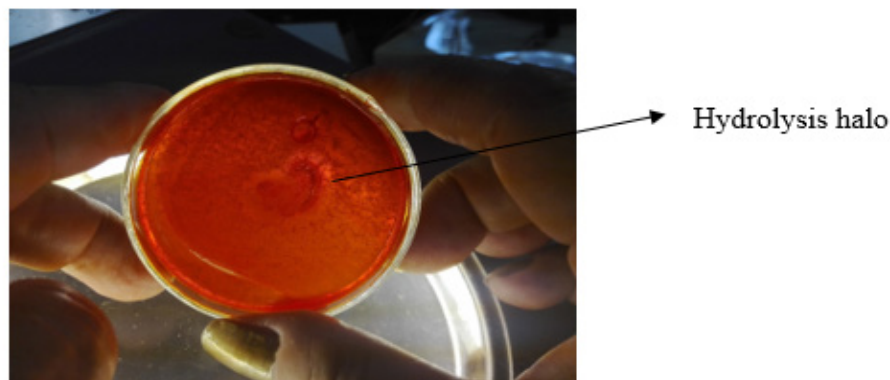


Figura 1. Observación de halo de hidrólisis producido por *Lactobacillus salivarius* C-65 en agar MRS con CMC.

of *Lactobacillus* spp. in the consulted literature. Herdian *et al.* (2018) reported that some LABs, such as *Pediococcus acidilactici* MK 20, isolated from the colon region of an Indonesian duck named Mentok, selected for the highest cellulolytic activity. Other authors, such as Frediansyah and Kurniadi (2017), observed the cellulases produced by *Lactobacillus plantarum*, using cassava (*Manihot esculenta*) meal as a substrate.

The manifestation of this characteristic has great significance because it indicates that this bacterium is capable of producing enzymes that intervene in cellulose decomposition, which is present in the cell walls of plants. It is known that animals do not produce these substances, so they require cellulolytic microorganisms from the tract to obtain these foods.

Los trabajos que demuestran la actividad celulolítica de *Lactobacillus* spp. son escasos en la literatura consultada. Herdian *et al.* (2018) informaron que algunas BAL, como *Pediococcus acidilactici* MK 20, aislada de la región del colon de un pato indonesio llamado Mentok, se seleccionó por la mayor actividad celulolítica. Otros autores, como Frediansyah y Kurniadi (2017), observaron la producción de celulastas por parte de *Lactobacillus plantarum*. al usar como sustrato la harina de yuca (*Manihot esculenta*).

La manifestación de esta característica tiene gran significación, ya que indica que esta bacteria es capaz de producir enzimas que intervienen en la descomposición de la celulosa, componente presente en las paredes celulares de los vegetales. Se conoce que los animales no producen estas sustancias, por lo que requieren de los microorganismos celulolíticos del tracto para obtener

Cellulose is the most abundant renewable carbon source on Earth. However, the structure of this polymer constitutes a physical and chemical barrier to access carbon, which limits its use. In nature, a small percentage of microorganisms can degrade it through the expression of cellulases (Gutiérrez *et al.* 2015). From these results, it would be possible to use this microorganism as an additive in silages, to improve grass conservation process.

Figure 2 shows *In vitro* growth of *Lactobacillus salivarius* C-65 in the RALTEC Milk 17-1 milk replacer for calves. It can be seen that, at 10 h, the two doses of this bacterium grew above 15 LN CFU.mL⁻¹. It was verified that, at that time, there were differences between both treatments, when a higher count was found with the 20 mL inoculum.

These results agree with the previously demonstrated

estos alimentos. La celulosa es la fuente de carbono renovable más abundante de la Tierra. Sin embargo, la estructura de este polímero constituye una barrera física y química para acceder al carbono, lo que limita su aprovechamiento. En la naturaleza, un pequeño porcentaje de microorganismos pueden degradarla por medio de la expresión de celulasas (Gutiérrez *et al.* 2015). A partir de estos resultados se pudiera pensar en la utilización de este microorganismo como aditivo en ensilajes para mejorar el proceso de la conservación de los pastos.

En la figura 2 se muestra el crecimiento *In vitro* de *Lactobacillus salivarius* C-65 en el lactoreemplazante para terneros RALTEC Milk 17-1. Se puede observar que a las 10 h, las dos dosis de esta bacteria crecieron por encima de 15 LN UFC.mL⁻¹. Se comprobó que a esa hora se presentaron diferencias entre ambos tratamientos, al constatarse mayor conteo con el inóculo de 20 mL.

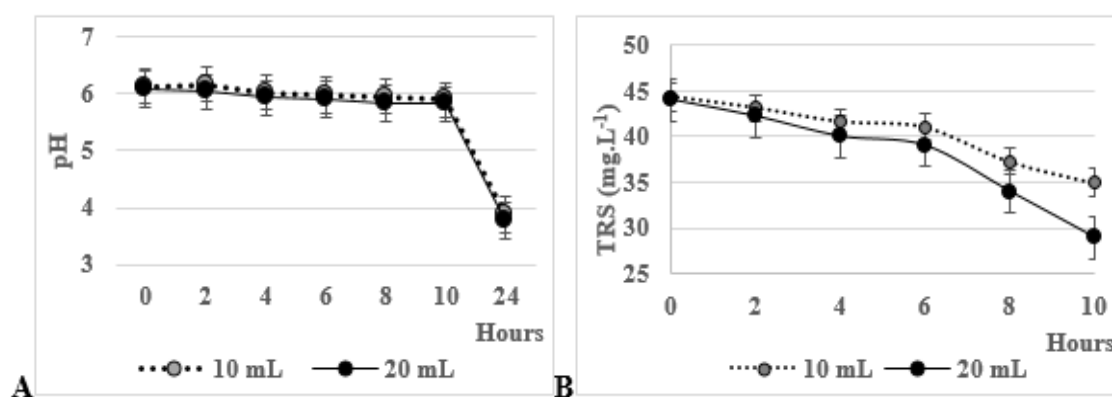


Figure 3. Kinetics of TRS (B) and pH (A) with the application of two doses of PROBIOLACTIL® in RALTEC® milk replacer. Bars represent standard error. There were no differences for $P \leq 0.05$ (Duncan 1955)

metabolic activity, since the milk replacer is enriched with different sugars and proteins that can be decomposed by these microorganisms. Hence, these bacteria could multiply in this food and, subsequently, colonize the digestive tract.

Figure 3 shows the effect of the two doses of PROBIOLACTIL® on TRS concentration and pH. The fermentative activity of this bacterium was verified, when observing the production of organic acids and intake of sugars within the milk replacer. Short chain fatty acids (SCFA) are known to decrease intestinal

Estos resultados concuerdan con la actividad metabólica demostrada anteriormente, ya que el sustituto lácteo o lactoreemplazante es rico en diferentes azúcares y proteínas que pueden descomponerse por estos microorganismos. De ahí que estas bacterias se pudieran multiplicar en este alimento y colonizar posteriormente el tracto digestivo.

En la figura 3 se muestra el efecto de las dos dosis de PROBIOLACTIL® en la concentración de ART y el pH. Se comprobó la actividad fermentativa de esta bacteria, al observar la producción de ácidos orgánicos y el consumo de los azúcares presentes en el lactoreemplazante. Se

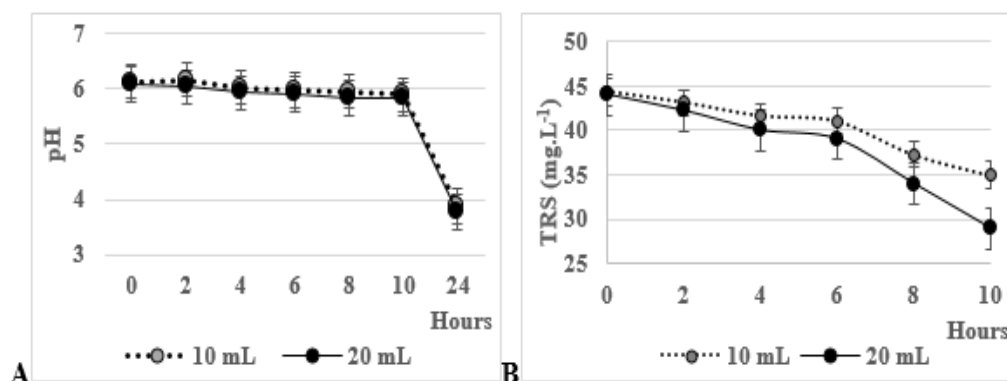


Figure 3. Kinetics of TRS (B) and pH (A) with the application of two doses of PROBIOLACTIL® in RALTEC® milk replacer. Bars represent standard error. There were no differences for $P \leq 0.05$ (Duncan 1955)

pH and inhibit the growth of some pathogens. They also promote the growth of intestinal cells and cell differentiation, which contributes to improving digestion and absorption of nutrients (Papadopoulos *et al.* 2017).

Dairy substitutes are offered up to advanced ages (between 90 and 120 d of age) in intensive artificial calf rearing systems in Cuba, which increases production costs, since part of the liquid feeding of these animals is guaranteed with imported milk replacers (Ybalmea 2015 and Alonso *et al.* 2016). The growth of microorganisms in these foods should improve their digestibility, by decomposing sugars and producing organic acids. These provide energy to animals, inhibit the growth of pathogenic microorganisms, nourish mucosal cells and solubilize minerals, with their consequent bioavailability and greater nutritional contribution (Nomoto 2005 and Uyeno *et al.* 2015).

Schneider *et al.* (2004) carried out the identification of lactic bacteria components of the typical microbiota of calves reared under artificial conditions. These authors demonstrated, by means of 16S DNAr sequence comparison techniques, the presence of *Lactobacillus casei*, *L. salivarius* and *L. reuteri*, indicating that *L. salivarius* is a native bacterium of this ecosystem.

Figure 4 shows the results of liveweight performance of animals during the seven weeks of the experiment. It can be observed that there were no differences among treatments.

Table 4 shows the differences in WG and DMG at the end of the experiment. The best results were obtained with treatment 2 (20 mL).

These results can be associated with the fact that probiotics and prebiotics, once supplied, induce, in the gastrointestinal tract (GIT), several mechanisms

conoce que los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) disminuyen el pH intestinal e inhiben el crecimiento de algunos patógenos. También promueven el crecimiento de células intestinales y la diferenciación celular, lo que contribuye a mejorar la digestión y la absorción de nutrientes (Papadopoulos *et al.* 2017)

En los sistemas intensivos de crianza artificial de terneros en Cuba se ofrecen sustitutos lácteos hasta edades avanzadas (entre 90 y 120 d de edad), lo que incrementa los costos de producción, debido a que parte de la alimentación líquida de estos animales se garantiza con lactoreemplazantes importados (Ybalmea *et al.* 2015 y Alonso *et al.* 2016). Cuando los microorganismos crecen en estos alimentos deben mejorar su digestibilidad, al descomponer los azúcares y producir ácidos orgánicos. Estos aportan energía a los animales, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, nutren a las células de la mucosa y solubilizan minerales, con su consecuente biodisponibilidad y mayor aporte nutricional (Nomoto 2005 y Uyeno *et al.* 2015).

Schneider *et al.* (2004) realizaron la identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales. Estos autores demostraron mediante técnicas de comparación de secuencias de 16S DNAr la presencia de *Lactobacillus casei*, *L. salivarius* y *L. reuteri*, lo que indica que *L. salivarius* es una bacteria autóctona de este ecosistema.

En la figura 4 se presentan los resultados del comportamiento del peso vivo de los animales durante las siete semanas que duró el experimento. Se puede observar que no se produjeron diferencias entre los tratamientos.

En la tabla 4 se muestran las diferencias en el IP y en la GMD al final del experimento. Con el tratamiento 2 (20 mL) se obtuvieron los mejores resultados.

Estos resultados se pueden asociar a que los probióticos y prebióticos, una vez que se suministran,

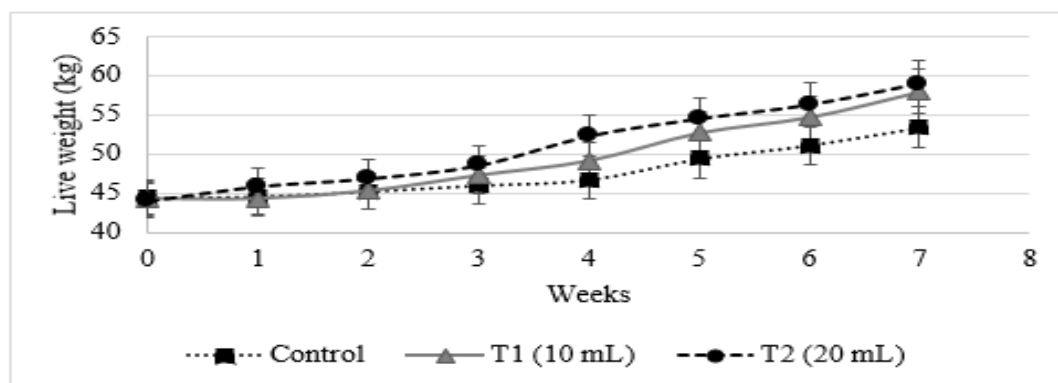


Figure 4. Effect of two doses of PROBIOLACTIL® on liveweight of calves for seven weeks. Bars represent standard error

Table 4. Effect of two doses of PROBIOLACTIL biopreparation on WG and DMG at the end of experiment

Indicators (kg)	Control	T1 (10 mL)	T2 (20 mL)	±SE	P
WG	8 ^b	13.71 ^{ab}	16 ^a	2.04	0.0351
DMG	0.163 ^b	0.280 ^{ab}	0.326 ^a	0.041	0.0351

by which the balance of intestinal microorganisms is favored, and a better response of digestive processes is provided in the host (Flores 2015, and Uyeno *et al.* 2015).

According to these results, the importance of including native microorganisms in the diet of these animals to maintain the microbial balance is demonstrated (Yáñez *et al.* 2015 and Zhang *et al.* 2018). Probiotics, according to Sánchez *et al.* (2015), can endure specific conditions in the GIT. They resist for more than four hours to proteolytic enzymes, to low pH values (1.8-3.2) prevailing in the stomach and to bile concentration, pancreatic juices and mucus found in the small intestine, so that the colonizing microorganisms arrive in viable state and in sufficient quantities, once they overcome the acid and bile barriers in the digestive tract.

There is evidence that using probiotic microorganisms, mainly *Lactobacillus* spp. strains, whether monocultures or mixtures, increases nutrient retention in the diet. Apparent nutrient retention (amount of nutrients consumed minus amount of excreted nutrients) is favored when probiotics are used, mainly due to N, P and Ca retention (Ángel *et al.* 2005).

These results agree with those obtained by Zhang *et al.* (2017), who studied the effect of the probiotics *Lactobacillus plantarum* GF103 and *Bacillus subtilis* B27 in calves. These authors refer to improvements in nutrient digestibility and productive yields. Similarly, Malik and Bandla (2010) demonstrated that the administration of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* improved daily weight gain and forage digestion efficiency.

Figure 5 shows the performance of diarrhea incidence in animals that consumed PROBIOLACTIL®, with respect to control group. It was found that 100 % of animals that reached the rearing had diarrhea. However, from the second week onwards, no dysbiosis was observed in the animals of group III, and, during the third week, they did not appear in group II.

Signorini *et al.* (2012) and Marín *et al.* (2016)

inducen en el tracto gastrointestinal (TGI) numerosos mecanismos mediante los que se favorece el balance de los microorganismos intestinales, y se proporciona una mejor respuesta de los procesos digestivos en el hospedero (Flores 2015, Uyene *et al.* 2015).

De acuerdo con estos resultados, se demuestra la importancia de incorporar microorganismos nativos en la dieta de estos animales para mantener el balance microbiano (Yáñez *et al.* 2015 y Zhang *et al.* 2018). Los probióticos, según refieren Sánchez *et al.* (2015), pueden soportar condiciones específicas en el TGI. Resisten por más de cuatro horas a enzimas proteolíticas, a bajos valores de pH (1.8-3.2) prevalecientes en el estómago y a la concentración de bilis, jugos pancreáticos y mucus que se encuentra en el intestino delgado, de modo que los microorganismos colonizadores llegan en estado viable y en cantidades suficientes, una vez que superan las barreras ácida y biliar en el tracto digestivo.

Existen evidencias de que al utilizar los microorganismos probióticos, fundamentalmente cepas de *Lactobacillus* spp., sean monocultivos o mezclas, se incrementa la retención de los nutrientes incluidos en la dieta. La retención aparente de nutrientes (cantidad de nutrientes consumidos menos cantidad de nutrientes excretados) se favorece cuando se utilizan probióticos, fundamentalmente por la retención de N, P y Ca (Ángel *et al.* 2005).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zhang *et al.* (2017), quienes estudiaron el efecto de los probióticos *Lactobacillus plantarum* GF103 y *Bacillus subtilis* B27 en terneros. Estos autores refrieren mejoras en la digestibilidad de los nutrientes y los rendimientos productivos. De manera similar, Malik y Bandla (2010) demostraron que la administración del probiótico *Lactobacillus acidophilus* mejoró la ganancia de peso diaria y la eficiencia en la digestión del forraje.

En la figura 5 se muestran las proporciones del comportamiento de la incidencia de diarreas en los animales que consumieron PROBIOLACTIL® con respecto al grupo control. Se pudo comprobar que 100 % de los animales que llegaron a la recría presentaban diarreas. Sin embargo, a partir de la segunda semana no se observó disbiosis en los animales del grupo III, y en

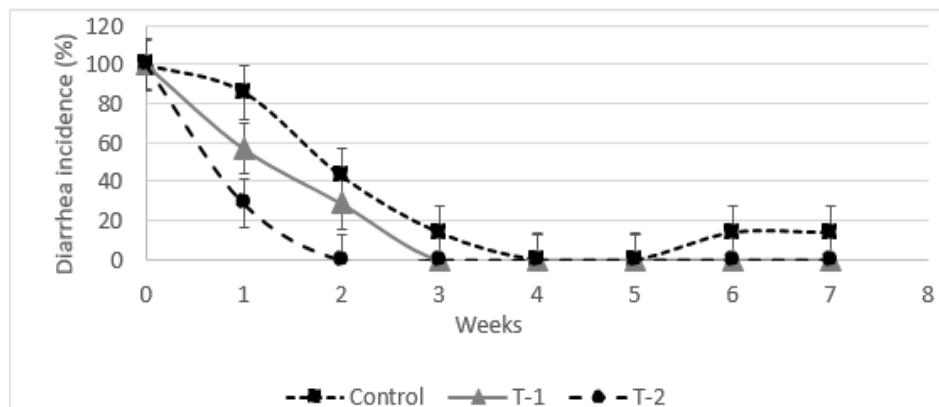


Figure 5. Effect of two doses of PROBIOLACTIL® on diarrhea incidence during the experiment. Bars represent standard error. Dots in the line differ at $P < 0.05$ in weeks 1, 2, 3, 6 and 7 (Duncan 1955)

obtained similar results to those of the current study. These authors defined that the diarrhea index is in correspondence with the proportion of LAB: coliforms. This means that when coliform population is higher than LAB, dysbiosis occurs. Therefore, a systematic supply of *Lactobacillus* cultures during this stage will increase the population of these bacteria in the GIT, and diarrhea will decrease (Sayan *et al.* 2018).

Conclusions

It is concluded that PROBIOLACTIL® bio-preparation presents high metabolic activity and is capable of provoking a probiotic effect on productive and health indicators of lactating calves.

la tercera no se presentaron en el grupo II.

Signorini *et al.* (2012) y Marín *et al.* (2016) obtuvieron resultados similares a los de este trabajo. Estos autores definieron que el índice de diarrea está en correspondencia con la proporción de LAB: coliformes. Esto significa que cuando la población de coliformes es superior a las BAL se produce la disbiosis. Por tanto, si se suministran sistemáticamente durante esta etapa cultivos de *Lactobacillus*, se incrementará la población de estas bacterias en el TGI y disminuirán las diarreas (Sayan *et al.* 2018).

Conclusiones

Se concluye que el biopreparado PROBIOLACTIL® presenta alta actividad metabólica y es capaz de provocar efecto probiótico en los indicadores productivos y de salud en terneros lactantes.

References

- Alonso, A.C., Ybalmea, R. & Guzmán, D. 2016. "Crecimiento de hembras Siboney de Cuba hasta 90 días de edad alimentadas con raciones integrales que contenían diferentes niveles de inclusión de reemplazante lechero seco". Available: <<http://rc.upr.edu/cu/bitstream/DICT/2677/1/Publicaci%C3%B3n%20Alonso%20et%20al%20Revista%20UNICA.pdf>>, [Consulted: June 4th, 2019].
- Ángel, R., Dalloul, R.A. & Doerr, J. 2005. "Metabolism and nutrition: Performance of broiler chickens fed diets supplemented with a direct-fed microbial". *Poultry Science*, 8(4): 12-31, ISSN: 1525-3171, DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/84.8.1222>
- Ayala, M.A., Hernández, D., Hernández, Pinto-Ruiz, R. & Torres, N. 2018. "Efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento *In vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*". *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(2): 346-361, ISSN: 2448-6698, DOI: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4488>
- Blanch, A. 2015. "Aplicación de probióticos, prebióticos y simbióticos en rumiantes". *NutriNews*, p. 95-97, Available: <<https://nutricionanimal.info/download/0615-blanch-pre-pro&simbioticos-rumiantes.pdf>>, [Consulted: December 2nd, 2019]
- Brizuela, M.A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. PhD Thesis, Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, La Habana, Cuba
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L. & Clemente, A. 2015. "Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos". *Nutrición Hospitalaria*, 31(1): 99-118, ISSN: 0212-1611, DOI: <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
- De Mann, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E. 1960. "A medium for the cultivation of lactobacilli". *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130-135, ISSN: 0267-4440, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- De Ross, N.M. & Katan, M.B. 2000. "Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998". *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(2): 405-411, ISSN: 1938-3207, DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.405>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat version 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <<http://www.infostat.com.ar>>
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple range and multiple F test". *Biometrics*, 11(1): 1-42, ISSN: 0006341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>
- Flores, O. 2015. Efecto de PROBIOLACTIL® en indicadores productivos y de salud en terneros lactantes. Trabajo Científico Técnico Salud y Producción bovina. Universidad Agraria de la Habana, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
- Font, H., Noda, A., Torres, V., Herrera, M., Lizazo, D., Sarduy, L. & Rodríguez, L. 2007. Paquete estadístico ComparPro versión 1. Departamento de Biomatemática, Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
- Frediansyah, A. & Kurniadi, M. 2017. "Michaelis kinetic analysis of extracellular cellulase and amylase excreted by *Lactobacillus plantarum* during cassava fermentation". *AIP Conference Proceedings*, 1788(1): 030111-1 - 030111-6, ISSN: 0000-1983, DOI: <https://doi.org/10.1063/1.4968364>
- Gutiérrez, I., Moreno, N. & Montoya, D. 2015. "Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos". *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1): 1-62, ISSN: 1130-1406, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Harrigan, W.F. & McCance, M. 1968. Métodos de laboratorio de Microbiología. Ed. Academia, León, España, ISBN: 84-7000-034-9
- Herdian, H., Istiqomaha, L., Damayantia, E., Suryania, A.E, Anggraenia, A.S., Rosyadab, N. & Susilowatib, A. 2018. "Isolation of cellulolytic lactic-acid bacteria from Mentok (*Anas moschata*) gastro-intestinal tract". *Tropical Animal Science Journal*, 41(3): 200-206, ISSN: 2615-790X, DOI: <https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.3.200>
- IMV. 1998. Instructivo técnico para la crianza del ternero en Cuba. Instituto de Medicina Veterinaria, Ministerio de la

Agricultura, La Habana, Cuba

- Jurado-Gámez, H., Jarrín-Jarrín, V., Parreño-Salas, J. 2015. "Crecimiento de *L. plantarum* y efecto sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens* y *S. aureus*". *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2): 57-66, ISSN: 1909-9959, DOI: [https://doi.org/10.18684/bsaa\(13\)57-66](https://doi.org/10.18684/bsaa(13)57-66)
- Jurado-Gámez, H., Ramírez, C., Aguirre, D. 2013. "Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico". *Veterinaria y Zootecnia*, 7(2): 37-53, ISSN: 2011-5415
- Kolb, E. 1976. *Fisiología Veterinaria I*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, p. 472, ISBN: 84 200-0364-6
- Lu, W., Wan, H. & Yan, S.J. 2006. "Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system". *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51(6): 353-360, ISSN: 1349-8037, DOI: <https://doi.org/10.2323/jgam.51.353>
- Malik, R. & Bandla, S. 2010. "Effect of source and dose of probiotics and exogenous fibrolytic enzymes (EFE) on intake, feed efficiency, and growth of male buffalo (*Bubalus bubalis*) calves". *Tropical Animal Health and Production*, 42(6): 63-90, ISSN: 1573-7438, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9559-5>
- Marín, A., García, A., Gutiérrez, M., González, M. & Ochieng, O. 2012. "Efecto probiótico del BIOPRANAL sobre los indicadores bioproductivos y de salud en terneros". *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 1(2): 33-41, ISSN: 1390-5600
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. & Huist in't Veld, J. 1997. "Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine. Validation and the effects of bile". *Journal of Dairy Science*, 80: 1031, ISSN: 1525-3198, DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76027-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76027-2)
- Miller, G. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428, ISSN: 1520-6882, DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus spp.* y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos (*Gallus gallus domesticus*). PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
- Nomoto, K. 2005. "Prevention of infection by probiotics". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(6): 583-592, ISSN: 1389-1723, DOI: <https://doi.org/10.1263/jbb.100.583>
- Pandey, R.; Suresh, R. N. & Babu, V. 2015. "Probiotics, prebiotics and synbiotics – a review". *Journal of Food Science and Technology*, 52: 7577-7587, ISSN: 0022-1155, DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Papadopoulos, G.A., Poutahidis, T., Tallarico, N., Hardas, A., Teliouis, K., Arsenos, G. & Fortomaris, P.D. 2017. "Dietary supplementation of encapsulated organic acids enhances performance and modulates immune regulation and morphology of jejunal mucosa in piglets". *Research in Veterinary Science*, 115: 174-182, ISSN: 0034-5288, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.04.014>
- Rada, V. 1997. "Detection of Bifidobacterium species by enzymatic methods and antimicrobial susceptibility testing". *Biotechnology Techniques*, 11(12): 909-912, ISSN: 0951-208X, DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1018418518048>
- RALTEC. 2019. RALTEC MILK 17. "Lactoreemplazante para terneros/as recomendado para toda la lactancia artificial". Available: <<https://raltecnutricion.com/raltec-milk-17>>, [Consulted: December 2nd, 2019]
- Rondón, A.J. 2009. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación de su efecto probiótico en estos animales. PhD Thesis. Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba
- Rondón, A., del Valle, A., Milián, G., Arteaga, F., Rodríguez, M., Valdivia, A., & Martínez, M. 2019. "Obtención de un biopreparado simbiótico (mezcla de pulpa de *Agave fourcroydes* Lem. y PROBIOLACTIL®) para su aplicación en terneros". *Revista Agrisost*, 25(2): 1-9, ISSN: 1025-0247
- Rondón, A.J. & Laurencio, M. 2008. "Utilization of mixtures of competitive exclusion in modern poultry production". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 42(1): 3-11, ISSN: 2079-3480
- Rondón, A.J., Milián, G., Arteaga, F., Boucourt, R., Ranilla, M.J., Riaño, J., Samaniego, L.M., Rodríguez, Z., Pérez, M. & Rodríguez, M. 2012. "Identificación y actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* de origen avícola". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 46(4): 403-409, ISSN: 2079-3480
- Rondón, A.J., Milián, G., Arteaga, F., Samaniego, L.M., Boucourt, R., Laurencio, M., Rodríguez, M. & Pérez, M. 2018. "Probiotic effect of *Lactobacillus salivarius* on microbiological and immune indicators in chickens". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 38(1): 21-26, ISSN: 1315-2556
- Rondón, A.J., Ojito, Y., Arteaga, F., Laurencio, M., Milián, G. & Pérez, Y. 2013. "Probiotic effect of *Lactobacillus salivarius* C-65 on productive and health indicators of lactating piglets". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 47(4): 401-407, ISSN: 2079-3480
- Rondón, A.J., Samaniego, L.M., Boucourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M.J., Laurencio, M. & Pérez, M. 2008. "Isolation, identification and partial characterization of the probiotic properties of *Lactobacillus spp.* strains obtained from the gastrointestinal tract of broilers". *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1): 17-22, ISSN: 1135-8122, DOI: <https://doi.org/10.1080/11358120809487628>
- Sánchez, C.E., Rosales, M.F. & Bustamante, A.C. 2015. "Modelo de hidrólisis de lactosa para fermentación láctica en una base probiótica y simbiótica". *RTE-Revista Tecnológica ESPOL*, 28(3): 53-68, ISSN: 1390-3659
- Savón, L. 2002. "Alimentos altos en fibra para especies monogástricas. Caracterización de la matriz fibrosa y sus efectos en la fisiología digestiva". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 36(2): 91-102, ISSN: 2079-3480
- Sayan, H., Assavacheep, P., Angkanaporn, K. & Assavacheep, A. 2018. "Effect of *Lactobacillus salivarius* on growth performance, diarrhea incidence, fecal bacterial population and intestinal morphology of suckling pigs challenged with F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli*". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(8): 1308-1314, ISSN: 1011-2367, DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0746>
- Schneider, R., Rosmini, M., Eherman, M. & Vogel, R. 2004. "Identificación de Bacterias Lácticas Componentes de la Microbiota

- Típica de los Terneros Criados en Condiciones Artificiales". Revista FAVE – Sección Ciencias Veterinarias, 3(1-2): 7-15, ISSN: 2362-5589, DOI: <https://doi.org/10.14409/favecv.v3i1/2.1400>
- Seifert, H.S. & Gessler, F. 1996. "Oral long-term administration of probiotic *B. cereus* an alternative to the prevention of enterotoxaemia". Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 103(10): 386-389, ISSN: 0341-6593
- Seo, H., Bae, S. & Oh, T. 2019. "In vitro: Antimicrobial effect of *Lactobacillus salivarius* on *Staphylococcus pseudintermedius*". Journal of Veterinary Clinics, 36(2): 98-101, ISSN: 1598-298X, DOI: <https://doi.org/10.17555/jvc.2019.04.36.2.98>
- Signorini, M., Soto, L., Zbrun, M., Sequeira, G., Rosmini, M. & Frizzo, L. 2012. "Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria". Research in Veterinary Science, 93(1): 250-258, ISSN: 0034-5288, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.001>
- Uyeno, Y., Shigemori, S. & Shimosato, T. 2015. "Effect of Probiotics/Prebiotics on cattle health and productivity". Microbes and Environments, 30: 126–132, ISSN: 1347-4405, DOI: <https://doi.org/10.1264/jisme.2015.01133>
- Yáñez, D.R., Abecia, L. & Newbold, C.J. 2015. "Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review". Frontiers in Microbiology, 6: 1133, ISSN: 1664-302X, DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01133>
- Ybalmea, R. 2015. "Alimentación y manejo del ternero, objeto de investigación en el Instituto de Ciencia Animal". Cuban Journal of Agricultural Science, 49(2): 141-152, ISSN: 2079-3480
- Zhang, R., Dong, X., Zhou, M., Tu, Y., Zhang, N., Deng, K. & Diao, Q. 2017. "Oral administration of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* on rumen fermentation and the bacterial community in calves". Animal Science Journal, 88(5): 755-762, ISSN: 1740-0929, DOI: <https://doi.org/10.1111/asj.12691>
- Zhang, T., Wu, Z., Hou, Q., Wang, Y., Hu, Z., Lin, X. & Wang, Z. 2018. "Gastrointestinal tract development in unwanted calves feeding different amounts of milk and different starters". Advances in Bioscience and Biotechnology, 9(7): 289-310, ISSN: 2156-8502, DOI: <https://doi.org/10.4236/abb.2018.97019>

Received: June 23, 2019

Accepted: January 1, 2020