

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

USO DE INULINA COMO PREBIÓTICO PARA BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y SU EFECTO EN LA ALIMENTACIÓN DE CORDEROS PRE Y POSDESTETE

MARCO ANTONIO AYALA MONTER

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2017

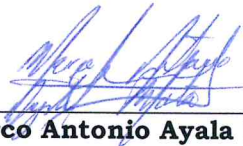
CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Marco Antonio Ayala Monter** Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. David Hernández Sánchez**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Uso de inulina como prebiótico para bacterias ácido lácticas y su efecto en la alimentación de corderos pre y posdestete**

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

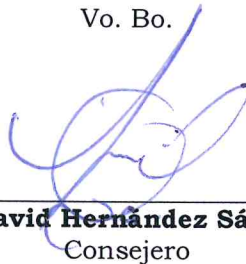
Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a **22** de **Julio** de **2017**

Firma



Marco Antonio Ayala Monter

Vo. Bo.



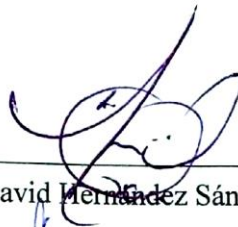
Dr. David Hernández Sánchez
Consejero

La presente tesis titulada: **Uso de inulina como prebiótico para bacterias ácido lácticas y su efecto en la alimentación de corderos pre y posdestete**, realizada por el alumno: **M.C. Marco Antonio Ayala Monter**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

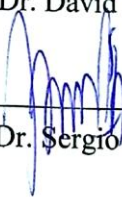
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



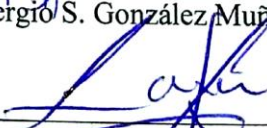
Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR



Dr. Sergio S. González Muñoz

ASESOR



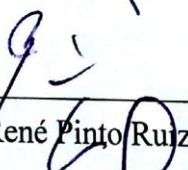
Dr. José Ricardo Bardená Gama

ASESOR



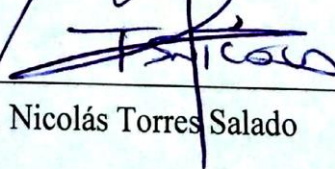
Dr. Omar Hernández Mendo

ASESOR



Dr. René Pinto Ruiz

ASESOR



Dr. Nicolás Torres Salado

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2017.

USO DE INULINA COMO PREBIÓTICO PARA BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y SU EFECTO EN LA ALIMENTACIÓN DE CORDEROS PRE Y POSDESTETE

Marco Antonio Ayala Monter, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto prebiótico de la inulina de *Agave tequilana* para bacterias ácido lácticas, así como en la respuesta de corderos pre y posdestete. En el primer experimento se evaluó el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* (Ls), *Enterococcus faecium* (Ef) y *Lactobacillus casei* (Lc) como testigo positivo, con sustitución de glucosa por inulina de achicoria (IAc) o de agave (IAG) en el medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS). Los tratamientos (T) evaluados fueron T1: MRS-glucosa+Lc; T2: MRS-IAc+Lc, T3: MRS-IAc+Ls, T4: MRS-IAc+Ef, T5: MRS-IAG+Lc, T6: MRS-IAG+Ls y T7: MRS-IAG+Ef. El diseño experimental fue completamente al azar y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. Los tratamientos con MRS-IAG mostraron mayores ($P \leq 0.05$) tasas de crecimiento (0.51^a , 0.50^a y 0.50^a h⁻¹, T5, T6 y T7, respectivamente) y fueron similares al testigo positivo (T2) cuando creció en MRS-IAc (0.48^a h⁻¹). En el segundo y tercer experimento se evaluó el efecto prebiótico de inulina de agave y *L. casei* en el crecimiento, variables hematológicas, metabolitos séricos, población de lactobacilos, coliformes totales y diarreas. En el segundo experimento 45 corderos recién nacidos se evaluaron durante la lactancia, y en el tercer experimento se usaron 30 corderos destetados, todos los corderos fueron cruza Kathadin x Dorset. El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos (T) fueron: T1, Dieta basal (DB); T2, DB + 2 % inulina y T3, DB + 2 % inulina + *L. casei*; se realizó un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. En el segundo experimento, la adición de inulina de agave y *L. casei* aumentó la GDP y peso al destete (PD): GDP = 356^b , 384^{ab} y 415^a g d⁻¹; PD = 24.92^a , 26.18^{ab} y 28.07^a kg para T1, T2 y T3, respectivamente, así como la población de lactobacilos: 5.59^b , 6.32^{ab} y 6.48^a Log₁₀ UFC g⁻¹, T1, T2 y T3, respectivamente ($P \leq 0.05$). La población de coliformes totales (T1= 5.07^b , T2= 6.18^a y T3= 5.77^{ab} Log₁₀ UFC g⁻¹) y el porcentaje de diarreas (T1=46.7, T2=33.3 y T3=20 %) fue menor ($P \leq 0.05$) en los corderos del T3. En el tercer experimento, no se encontraron diferencias ($P >$

0.05) en las variables productivas. Respecto a variables hematológicas, el porcentaje de basófilos aumentó ($P \leq 0.05$) con la adición de inulina y *L. casei* (0.17^b, 0.32^{ab} y 0.45^a % para T1, T2 y T3, respectivamente). La población de coliformes totales en heces fue mayor ($P \leq 0.05$) en el grupo testigo (8.58^a, 7.19^b y 6.51^b Log₁₀ UFC g⁻¹, T1, T2, T3, respectivamente) y la población de lactobacilos aumentó ($P \leq 0.05$) con inulina y *L. casei* (9.02^b, 9.88^a y 10.26^a Log₁₀ UFC g⁻¹, T1, T2 y T3, respectivamente). La inulina de agave favorece el crecimiento de las bacterias probióticas *L. salivarius*, *E. faecium* y *L. casei*, mientras que la combinación de inulina de agave y *L. casei* aumentan la ganancia de peso en corderos durante la lactancia y mejoran la salud intestinal al reducir la población de coliformes e incidencia de diarreas en corderos pre y posdestete.

Palabras clave: Inulina, *Lactobacillus casei*, prebiótico, probiótico, diarreas.

INULIN AS A PREBIOTIC FOR ACID LACTIC BACTERIA AND ITS EFFECT ON FEEDING OF PRE- AND POST-WEANING LAMBS

Marco Antonio Ayala Monter, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the prebiotic effect of *Agave tequilana* inulin on lactic acid bacteria growth, and the effect of inulin and *Lactobacillus casei* on performance of pre- and post-weaning lambs. In the first experiment the *in vitro* growth of *Lactobacillus salivarius* (Ls), *Enterococcus faecium* (Ef) and *Lactobacillus casei* (Lc) as positive control, with glucose substitution by chicory inulin (IAc) or agave inulin (IAg) in the Man-Rogose-Sharpe (MRS) medium. Treatments (T) evaluated were T1: MRS-glucose + Lc; T2: MRS-IAc+Lc, T3: MRS-IAc+Ls, T4: MRS-IAc+Ef, T5: MRS-IAg+Lc, T6: MRS-IAg+Ls y T7: MRS-IAg+Ef. The experimental design was completely randomized and treatments means were compared with Tukey test. In the first experiment, MRS-IAg treatments had higher ($P \leq 0.05$) growth rates (0.51^a , 0.50^a and 0.50^a h⁻¹, T5, T6 and T7, respectively) and were similar to positive control (T2) when grown in MRS-IAc (0.48^a h⁻¹). The second and third experiments evaluated the prebiotic effect of agave inulin and *L. casei* on growth, hematological variables, serum metabolites, lactobacilli population, total coliforms and incidence of diarrheas. In the second experiment, 45 newborn lambs were evaluated during lactation and in the third experiment 30 weaned lambs were used; in both cases, all lambs were Kathadin x Dorset crosses. The experimental design was completely randomized, and treatments (T) were: T1, Basal diet (BD); T2, BD + 2 % inulin and T3, BD + 2 % inulin + *L. casei*; an treatments means were compared with Tukey test. In the second experiment, addition of agave inulin and *L. casei* increased daily weight gain (DWG) and weaning weight (WW): DWG = 356^b , 384^{ab} and 415^a g d⁻¹ and WW = 24.92^a , 26.18^{ab} and 28.07^a kg for T1, T2 and T3, respectively; as well as lactobacillus population: 5.79^b , 6.32^{ab} and 6.48^a Log₁₀ UFC g⁻¹, for T1, T2 and T3, respectively. Total coliform population (T1 = 6.18^a , T2 = 5.77^a y T3 = 5.07^b Log₁₀ UFC g⁻¹) and incidence of diarrhea were lower ($P \leq 0.05$) in lambs of the T3 (T1 = 46.7, T2 = 33.3 and T3 = 20 %). In the third experiment, there were no differences

($P > 0.05$) in variables of animal performance. Regarding hematological variables, percentage of basophils were increased ($P \leq 0.05$) by inulin and *L. casei* (0.17^b, 0.32^{ab} and 0.45^a % for T1, T2 and T3, respectively). Fecal total coliform population was higher ($P \leq 0.05$) in control group (8.58^a, 7.19^b and 6.51^b Log₁₀ CFU g⁻¹, T1, T2, T3, respectively) and the lactobacillus was increased ($P \leq 0.05$) by supplementation of inulin and *L. casei* (9.02^b, 9.88^a and 10.26^a Log₁₀ UFC g⁻¹, T1, T2 and T3, respectively). Agave inulin favors growth of probiotic bacteria *L. salivarius*, *E. faecium* and *L. casei*, whereas the combination of agave inulin and *L. casei* increases weight gain in lambs during lactation and improve intestinal health by reducing population of coliforms and diarrhea incidence in pre-and post-weaning lambs.

Key words: Inulin, *Lactobacillus casei*, prebiotic, probiotic, diarrheas.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por darme fuerza y fortaleza para seguir adelante en cada uno de mis sueños, en la vida personal y profesional.

A MIS PADRES

Lucio Ayala Hernández y Sofía Monter Pérez

Por su amor, cariño y apoyo que me han dado durante toda la vida.

A MIS HERMANOS

José Alejandro Ayala Monter y José Arturo Ayala Monter

Por su apoyo para lograr una meta más en mi formación profesional.

ATENTAMENTE

M.V.Z. M.C. Marco Antonio Ayala Monter

“No hay secretos para el éxito. Este se alcanza preparándose, trabajando arduamente y aprendiendo del fracaso”.

Colin Powell

AGRADECIMIENTOS

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT), por la beca otorgada para realizar estudios de Doctorado.

Al *Colegio de Postgraduados*, por la oportunidad de realizar estudios de Doctorado en Ciencias.

Al *Dr. David Hernández Sánchez*, por su amistad, enseñanzas, consejos y todo el apoyo brindado durante mis estudios de posgrado.

A los miembros del consejo particular, *Dr. Sergio S. González Muñoz, Dr. José Ricardo Bárcena Gama, Omar Hernández Mendo, Dr. Rene Pinto Ruíz y Dr. Nicolás Torres Salado* por su amistad, enseñanzas, observaciones y comentarios en la revisión de la presente tesis.

Al *M.V.Z. José Luis Cordero Mora*, por su amistad, enseñanzas, consejos; además, el apoyo y facilidades otorgadas en las instalaciones de la granja para realizar los experimentos.

A la *Dra. María Magdalena Crosby Galván*, por su amistad, facilidades permitidas en el Laboratorio de Nutrición Animal y participar como sinodal en el examen de grado.

A la *Ing. Margarita Crosby Galván*, por su amistad y apoyo en el trabajo de laboratorio.

Al *Dr. Humberto Vaquera Huerta*, por su amistad y apoyo en los análisis estadísticos de la presente investigación.

Al *Dr. Alfredo Martínez Aispuro* por su amistad, apoyo y oportunidad de participar en su equipo de trabajo.

A los académicos, administrativos, personal de granja, técnicos de laboratorio de Nutrición Animal y Microbiología Ruminal, por su apoyo y amistad durante mi estancia en esta gran institución.

A mis compañeros y amigos por su apoyo y amistad durante la investigación.

ATENTAMENTE

M.C. Marco Antonio Ayala Monter

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 3 |
| ABSTRACT..... | 5 |
| DEDICATORIAS | 7 |
| AGRADECIMIENTOS | 8 |
| LISTA DE CUADROS..... | 13 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 15 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| LITERATURA CITADA | 3 |
| CAPÍTULO I. EFECTO PREBIÓTICO DE DOS FUENTES DE INULINA EN EL CRECIMIENTO <i>in vitro</i> DE <i>Lactobacillus salivarius</i> Y <i>Enterococcus faecium</i> | 7 |
| RESUMEN | 7 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 9 |
| <i>Pureza de las fuentes de inulina</i> | 10 |
| <i>Cepas de bacterias probióticas</i> | 10 |
| <i>Diseño experimental y tratamientos</i> | 10 |
| <i>Medios de cultivo</i> | 11 |
| <i>Reactivación de las cepas bacterianas</i> | 12 |
| <i>Concentración bacteriana del inóculo inicial</i> | 12 |
| <i>Cinética de crecimiento y pH</i> | 12 |
| <i>Tasa de crecimiento</i> | 12 |
| <i>Análisis estadístico</i> | 13 |

| | |
|---|----|
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 13 |
| <i>Cinética de crecimiento</i> | 13 |
| <i>Tasa de crecimiento</i> | 14 |
| <i>pH</i> | 16 |
| CONCLUSIONES | 17 |
| AGRADECIMIENTOS | 18 |
| LITERATURA CITADA | 18 |
| CAPÍTULO II. RESPUESTA PRODUCTIVA, VARIABLES HEMATOLÓGICAS Y COLIFORMES EN CORDEROS LACTANTES CON ADICIÓN DE INULINA Y <i>Lactobacillus casei</i> | 23 |
| RESUMEN | 23 |
| ABSTRACT..... | 24 |
| INTRODUCCIÓN | 25 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| <i>Localización</i> | 26 |
| <i>Corderos y manejo sanitario</i> | 26 |
| <i>Manejo nutricional</i> | 27 |
| <i>Caracterización del alimento preiniciador</i> | 28 |
| <i>Cambio de peso vivo en los corderos</i> | 28 |
| <i>Consumo de materia seca del alimento preiniciador</i> | 29 |
| <i>Análisis químico de calostro y leche</i> | 29 |
| <i>Conteo de coliformes totales y lactobacilos en heces</i> | 29 |
| <i>Incidencia de diarreas</i> | 30 |
| <i>Recolección y análisis de sangre</i> | 30 |
| <i>Metabolitos séricos</i> | 30 |
| <i>Análisis estadístico</i> | 30 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |

| | |
|---|----|
| <i>Cambio de peso vivo y consumo de alimento</i> | 31 |
| <i>Coliformes totales y lactobacilos en heces</i> | 32 |
| <i>Incidencia de diarreas</i> | 33 |
| <i>Variables hematológicas</i> | 35 |
| <i>Metabolitos séricos</i> | 36 |
| CONCLUSIONES | 38 |
| LITERATURA CITADA | 38 |
| CAPÍTULO III. EFECTO DE INULINA Y <i>Lactobacillus casei</i> EN EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO, PARAMETROS HEMATOLÓGICOS Y METABOLITOS SANGUÍNEOS EN CORDEROS DESTETADOS | 46 |
| RESUMEN | 46 |
| ABSTRACT | 47 |
| INTRODUCCIÓN | 48 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 49 |
| <i>Localización</i> | 49 |
| <i>Corderos y manejo</i> | 49 |
| <i>Tratamientos</i> | 49 |
| <i>Comportamiento productivo</i> | 49 |
| <i>Consistencia en heces</i> | 50 |
| <i>Conteo microbiano (UFC g⁻¹) en heces</i> | 50 |
| <i>Biometría hemática</i> | 51 |
| <i>Metabolitos sanguíneos</i> | 51 |
| <i>Variables ruminales</i> | 51 |
| <i>Análisis estadístico</i> | 51 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 52 |
| <i>Comportamiento productivo</i> | 52 |
| <i>Conteo microbiano y consistencia en heces</i> | 53 |
| <i>Variables hematológicas</i> | 55 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| <i>Metabolitos sanguíneos</i> | 56 |
| <i>Variables ruminales</i> | 58 |
| CONCLUSIONES | 58 |
| LITERATURA CITADA | 59 |
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 65 |

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Composición (%) de las fuentes de inulina..... | 10 |
| Cuadro 2. Tratamientos experimentales | 11 |
| Cuadro 3. Medios de cultivo MRS con glucosa o inulina | 11 |
| Cuadro 4. Tasa específica de crecimiento (μ) y tiempo de generación (T) en bacterias ácido lácticas en medio MRS con dos fuentes de inulina..... | 15 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Composición química de calostro y leche de ovejas durante la lactancia de corderos con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 27 |
| Cuadro 2. Tratamientos experimentales y composición química del alimento preiniciador | 28 |
| Cuadro 3. Crecimiento de corderos con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> durante la lactancia | 31 |
| Cuadro 4. Conteo de coliformes totales y lactobacilos en heces de corderos lactantes con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 33 |
| Cuadro 5. Incidencia de diarreas (%) en corderos lactantes con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 34 |
| Cuadro 6. Variables hematológicas de corderos lactantes con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 35 |
| Cuadro 7. Metabolitos sanguíneos en corderos con adición de inulina y <i>Lactobacillus casei</i> al inicio y final de la lactancia | 36 |

CAPÍTULO III

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Variables productivas de corderos con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 52 |
| Cuadro 2. Conteo de coliformes totales y lactobacilos en heces de corderos con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 53 |

| | |
|--|----|
| Cuadro 3. Consistencia fecal (%) de corderos con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 54 |
| Cuadro 4. Variables hematológicas de corderos con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 55 |
| Cuadro 5. Metabolitos sanguíneos en corderos con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 56 |
| Cuadro 6. Variables ruminales de corderos con adición de inulina de agave y <i>Lactobacillus casei</i> | 58 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Crecimiento de *Lactobacillus casei* (Lc), *Lactobacillus salivarius* (Ls) y *Enterococcus faecium* (Ef) en inulina de achicoria (IAc) o inulina de agave (IAg). 13

Figura 2. pH de los medios de cultivo con inulina de achocria (IAc) o inulina de agave (IAg) e inoculados con *Lactobacillus casei* (Lc), *Lactobacillus salivarius* (Ls) y *Enterococcus faecium* (Ef). 17

CAPÍTULO III

Figura 1. Consistencia en heces de corderos con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*. 50

INTRODUCCIÓN GENERAL

En los sistemas de producción para carne ovina la finalidad es obtener el mayor porcentaje de corderos destetados. Sin embargo, durante la lactancia y el destete la baja protección inmunológica (Zhang *et al.*, 2015) y el cambio de dieta líquida a sólida desencadena problemas digestivos, particularmente diarreas (Li *et al.*, 2015; Chatzopoulos *et al.*, 2016) ocasionando bajo rendimiento o muerte en los corderos (Malmuthuge *et al.*, 2015) lo cual es una pérdida económica considerable en el sector ovino; por ello, el destete es considerado un período crítico en la vida de los corderos (Freitas y Ungerfeld, 2016).

Las diarreas en corderos son causadas por agentes etiológicos como bacterias: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp. (Aragão *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014); parásitos: *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. (Yang *et al.*, 2009; Minetti *et al.*, 2014) y virus de las familias *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Rotaviridae*, por ello es considerada un síndrome complejo y multifactorial (Martella *et al.*, 2015). Durante décadas, el manejo profiláctico de las diarreas han sido a través de la aplicación de antimicrobianos; sin embargo, debido a su prohibición (Maron *et al.*, 2013) y uso inadecuado ocasiona resistencia bacteriana (Woolhouse *et al.*, 2015; Founou *et al.*, 2016) así como residuos de los antibióticos en carne y leche (Beyene, 2016). Ante este problema, el uso de probióticos (Khalid *et al.*, 2011; Angelakis, 2017) y el de prebióticos como la inulina (Samanta *et al.*, 2013) son suplementos alternativos al uso de antibióticos para su control (Allen *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2017).

Los prebióticos como la inulina estimulan el crecimiento de bacterias probióticas (Roberfroid *et al.*, 2010), las cuales actúan contra enteropatógenos a través de la producción de bacteriocinas y exclusión competitiva (Musa *et al.*, 2009; Hajati y Rezaei, 2010); además, modulan la microflora intestinal (Samanta *et al.*, 2012).

Los probióticos mejoran la población microbiana ruminal, digestibilidad de nutrientes, conversión alimenticia y sistema inmunológico (Abd El-Tawab *et al.*, 2016); además, tienen acción antagonista a enteropatógenos (Musa *et al.*, 2009), lo que conduce a un mejor rendimiento y salud de los corderos (Allen *et al.*, 2013). Las fuentes de inulina utilizadas en la industria internacional son la achicoria (*Cichorium intybus*) y la alcachofa (*Helianthus tuberosus*) (Leroy *et al.*, 2010); en México, la especie *Agave tequilana* Weber var. Azul, tiene un contenido alto de inulina (Carranza *et al.*, 2015). El uso de inulina de achicoria como sustrato energético para bacterias ácido lácticas (BAL) está documentado en estudios *in vitro* (Díaz-Vela *et al.*, 2010), en terneros (Uyeno *et al.*, 2015), pero las investigaciones son escasas y no concluyentes en corderos (Kazemi-Bonchenari *et al.*, 2013; Moarrab *et al.*, 2016).

En la literatura consultada los estudios con el uso de inulina de agave son escasos y se limitan a investigaciones *in vitro* (Moreno-Vilet *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2016a, 2016b); e *in vivo* (Velázquez-Martínez *et al.*, 2014; García-Curbelo *et al.*, 2016; Márquez-Aguirre *et al.*, 2016), y no se encontró información relacionada con el uso de inulina de agave en corderos pre y posdestete. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto prebiótico de la inulina de *Agave tequilana* en el crecimiento *in vitro* de bacterias probióticas, así como en el crecimiento, población de lactobacilos, coliformes totales e incidencia de diarreas en corderos pre y posdestete.

LITERATURA CITADA

- Abd El-Tawab M. M., Youssef I. M. I., Bakr H. A., Fthenakis G. C., Giadinis N. D. 2016. Role of probiotics in nutrition and health of small ruminants. *Pol. J. Vet. Sci.* 19(4): 893-906.
- Allen H. K., Levine U. Y., Looft T., Bandrick M., Casey T. A. 2013. Treatment, promotion, commotion: Antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends. Microbiol.* 21(3): 114-119.
- Angelakis E. 2017. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microb. Pathogenesis* 106: 162-170.
- Aragão B. A. Z., Ananias T. M., Duarte F. M. C., Viccari G. M. S., Vaz P. A., Yano T. 2012. Colibacillosis in lambs is associated to type I heat-stable enterotoxin in a farm in São Paulo State, Brazil. 2012. *Ciênc Rural* 42(5): 854-857.
- Beyene T. 2016. Veterinary drug residues in food-animal Products: Its risk factors and potential effects on public health. *J. Veterinar. Sci. Technol.* 7(1): 285.
- Carranza O. C., Ávila F. A., Bustillo A. G. R., López-Munguía A. 2015. Processing of fructans and oligosaccharides from Agave plants. In: Preedy R. V. (ed). *Processing and Impact on Active Components in Food*. 1^a ed. Academic Press, USA. pp: 121-129.
- Chatzopoulos D. C., Sarrou S., Vasileiou N. G. C., Ioannidi K. S., Peteinaki E., Valiakos G., Tsokana C. N., Papadopoulos E., Spyrou V., Mavrogianni V. S., Giannakopoulos A., Sbiraki A., Lacasta D., Buesog J. P., Athanasiou L. V., Billinis C., Fthenakis G. C. 2016. Dissemination of intestinal pathogens between lambs and puppies insheep farms. *Small Ruminant Res.* 141: 5-10
- Díaz-Vela J., Mayorga-Reyes L., Alfonso-Totosaus S. A., Pérez-Chabela M. L. 2012. Kinetics parameters and short chain fatty acids profiles of thermotolerant lactic acid bacteria with different carbon sources. *VITAE* 19(3): 253-260.
- Founou L. L., Founou R. C., Essack S. Y. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective. *Front. Microbiol.* 7: 1881.
- Freitas M. A., Ungerfeld R. 2016. Artificial weaning in sheep: stress response and animal welfare. *Review. Rev. Mex. Cienc. Pec.* 7(3): 361-375.
- García-Curbelo Y., Bocourt R., Savon L. L., García-Vieyra M. I., López M. G. 2015. Prebiotic effect of *Agave fourcroydes* fructans: an animal model. *Food Funct.* 6(9): 3177-3182.

- Kazemi-Bonchenari M., Ghasemi H. A., Khodaei-Motlagh M., Khaltabadi-Farahani A. H., Ilani M. 2013. Influence of feeding synbiotic containing *Enterococcus faecium* and inulin on blood metabolites, nutrient digestibility and growth performance in sheep fed alfalfa-based diet. *Sci. Res. Essays* 8(21): 853-857.
- Khalid M. F., Sarwar M., Mahr-Un-Nisa, Zia-Ur-Rehman. 2011. Response of growing lambs fed on different vegetable protein sources with or without probiotics. *Int. J. Agric. Biol.* 13(3): 332-338.
- Leroy G., Grongnet J. F., Mabeau S., Le Corre D., Baty J. C. 2010. Changes in inulin and soluble sugar concentration in artichokes (*Cynara scolymus* L.) during storage. *J. Sci. Food Agric.* 90: 1203-1209.
- Li S., Cui D., Wang S., Wang H., Huang M., Qi Z., Liu Y. 2015. Efficacy of an herbal granule as treatment option for neonatal Tibetan lamb diarrhea under field conditions. *Livest. Sci.* 172: 79-84.
- Malmuthuge N., Griebel P. J., Guan L. L. 2015. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Front. Vet. Sci.* 2(36): 1-10.
- Maron D. F., Smith J. S. T., Nachman E. K. 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization Health* 9(48): 1-11.
- Márquez-Aguirre A. L., Camacho-Ruíz R. M., Gutiérrez-Mercado Y. K., Padilla-Camberos E., González-Ávila M., Gálvez-Gastélum F. J., Díaz-Martínez N. E., Ortuño-Sahagún D. 2016. Fructans from *Agave tequilana* with a lower degree of polymerization prevent weight gain, hyperglycemia and liver steatosis in high-fat diet-induced obese mice. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71: 416-421.
- Martella V., Decaro N., Buonavoglia C. 2015. Enteric viral infections in lambs or kids. *Vet. Microbiol.* 181: 154-160.
- Minetti C., Taweanan W., Hogg R., Featherstone C., Randle N., Latham S. M., Wastling J. M., 2014. Occurrence and diversity of *Giardia duodenalis* assemblages in livestock in the UK. *Transbound. Emerg. Dis.* 61: 60-67.

- Moreno-Vilet L., Camacho-Ruiz R. M., Portales-Pérez D. P. 2016. Prebiotic agave fructans and immune aspects. In: Watson RR y Preedy RV editors. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion. Academic Press, USA. pp: 165-179.
- Mueller M., Reiner J., Fleischhacker L., Viernstein H., Loeppert R., Praznik W. 2016a. Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure. *J. Funct. Foods* 24: 264-275.
- Mueller M., Schwarz S., Viernstein H., Loeppert R., Praznik W. 2016b. Growth of selected probiotic strains with fructans from agaves and chicory. *Agro Food Ind. Hi Tec.* 27(3): 54-57.
- Musa H. H., Wu S. L., Zhu C. H., Seri H. I., Zhu G. Q. 2009. The potential benefits of probiotics in animal production and health. *J. Anim. Vet. Adv.* 8(2): 313-321.
- Roberfroid M., Gibson R. G., Hoyles L., McCartney L. A., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M-J., L  otoing L., Wittrant Y., Delzenne M. N., Cani D. P., Neyrinck M. A., Agnes M. A. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104(2): 1-63.
- Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenco A., Gueimonde M., Margolles A. 2017. Probióticos, microbiota intestinal, y su influencia en la salud y la enfermedad del huésped. 2017. *Mol Nutr Food Res.* 61(1).
- Samanta A. K., Senani S., Kolte A. P., Sridhar M. B. R., Jayapal N. 2012. Effect of prebiotic on digestibility of total mixed ration. *Indian Vet. J.* 89: 41-42.
- Samanta A. K., Jayapal N., Senani S., Kolte A. P., Sridhar M. 2013. Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Braz. J. Microbiol.* 44(1): 1-14.
- Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T. 2015. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes Environ.* 30(2): 126-132.
- Velázquez-Martínez J. R., González-Cervantes R. M., Hernández-Gallegos M. A., Mendiola R. C., Aparicio A. R., Ocampo M. L. 2014. Prebiotic potential of *Agave angustifolia* haw fructans with different degrees of polymerization. *Molecules* 19(8): 12660-12665.
- Woolhouse M., Ward M., van Bunnik B., Farrar J. 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370-377.

- Yang R., Jacobson C., Gordon C., Ryan U. 2009. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. *Vet. Parasitol.* 16: 19-24.
- Yang R., Jacobson C., Gardner G., Carmichael I., Campbell A. J., Ryan U. 2014. Longitudinal prevalence, faecal shedding and molecular characterisation of *Campylobacter* spp. and *Salmonella enterica* in sheep. *Vet. J.* 202: 250-254.
- Zhang S., Regnault T. R. H., Barker P. L., Botting K. J., McMillen I. C., McMillan C. M., Roberts C. T., Morrison J. J. 2015. Placental adaptations in growth restriction. *nutrients* 7: 360-389.

CAPÍTULO I. EFECTO PREBIÓTICO DE DOS FUENTES DE INULINA EN EL CRECIMIENTO *in vitro* DE *Lactobacillus salivarius* Y *Enterococcus faecium*

PREBIOTIC EFFECT OF TWO SOURCES OF INULIN ON *in vitro* GROWTH OF *Lactobacillus salivarius* AND *Enterococcus faecium*

Marco Antonio Ayala-Monter, David Hernández-Sánchez, Rene Pinto-Ruiz, Sergio S. González-Muñoz, José R. Bárcena-Gama, Omar Hernández-Mendo, Nicolás Torres-Salado.

RESUMEN

Las diarreas en especies pecuarias son controladas con antibióticos, pero su uso inadecuado causa problemas de resistencia bacteriana. Las bacterias ácido lácticas (BAL) en la microbiota intestinal ejercen exclusión competitiva contra patógenos causantes de diarreas, y la inulina es un sustrato para las BAL. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* (Ls) y *Enterococcus faecium* (Ef), con el uso de *Lactobacillus casei* (Lc) como control positivo. Las incubaciones *in vitro* se realizaron a 37 °C, con sustitución de glucosa por inulina de achicoria (IAc) o de agave (IAG) en el medio MRS. Los tratamientos (T) evaluados fueron T1: MRS-glucosa+Lc; T2: MRS-IAc+Lc, T3: MRS-IAc+Ls, T4: MRS-IAc+Ef, T5: MRS-IAG+Lc, T6: MRS-IAG+Ls y T7: MRS-IAG+Ef. La curva y la tasa de crecimiento se determinaron mediante densidad óptica (630 nm) a las 0, 3, 6, 12, 24, 30, 36, 48, 54 y 60 h. El diseño experimental fue completamente al azar, los datos se analizaron con PROC GLM (SAS) y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. Los tratamientos con MRS-IAG mostraron mayores ($P \leq 0.05$) tasas de crecimiento (0.51^a , 0.50^a y 0.50^a h⁻¹, T5, T6 y T7, respectivamente) y resultaron similares al control positivo (T2) cuando creció en MRS-IAc (0.48^a h⁻¹). El pH durante el crecimiento fue diferente entre tratamientos ($P \leq 0.05$). La inulina de agave favorece el crecimiento de bacterias probióticas como *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*, y su efecto prebiótico supera a la inulina de achicoria.

Palabras clave: *Agave tequilana*, *Cichorium intybus*, prebiótico, probiótico, *in vitro*.

ABSTRACT

In livestock species, diarrhea is controlled with antibiotics, but its inadequate use causes bacterial resistance. Lactic acid bacteria (LAB) in the intestinal microbiota have competitive exclusion against enteropathogens that cause diarrheas, and inulin is a substrate for LAB. Therefore, the objective of this study was to determine the prebiotic effect of two inulin sources on *in vitro* growth of *Lactobacillus salivarius* (Ls) and *Enterococcus faecium* (Ef), with the use of *Lactobacillus casei* (Lc) as a positive control. *In vitro* incubations were performed at 37 °C, with glucose substitution by chicory inulin (IAc) or agave inulin (IAg) in MRS medium. The treatments (T) evaluated were T1: MRS-glucosa+Lc; T2: MRS-IAc+Lc, T3: MRS-IAc+Ls, T4: MRS-IAc+Ef, T5: MRS-IAg+Lc, T6: MRS-IAg+Ls y T7: MRS-IAg+Ef. The growth curve and growth rate were determined by optical density (630 nm) at 0, 3, 6, 12, 24, 30, 36, 48, 54 and 60 h. A completely randomized design was used and the Tukey test for means comparison. MRS-IAg treatments showed higher ($P \leq 0.05$) growth rates (0.51^a , 0.50^a and 0.50^a h⁻¹, T5, T6 and T7, respectively) and were similar to the positive control (T2) when MRS- IAc was used (0.48^a h⁻¹). The positive control (T1) had low growth rate (0.34^b h⁻¹) when glucose was included in the medium (MRS-glucose). The pH was different ($P \leq 0.05$) between treatments during bacterial growth. Agave inulin favors the growth of probiotic bacteria such as *Lactobacillus salivarius* and *Enterococcus faecium*, and its prebiotic effect is better than chicory inulin.

Key words: *Agave tequilana*, *Cichorium intybus*, prebiotic, probiotic, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción pecuaria, las infecciones entéricas son una de las principales causas de mortalidad en los neonatos (Li *et al.*, 2015), su manejo sanitario se realizaba con antibióticos, pero el uso inadecuado de éstos causa resistencia bacteriana (Woolhouse *et al.*, 2015), así como residuos de los antibióticos en carne y leche (Beyene, 2016). Ante este problema, el uso de probióticos (Yirga, 2015) y el de prebióticos como la inulina (Samanta *et al.*, 2013) son suplementos alternativos que benefician la salud y la productividad de especies pecuarias. La inulina estimula el desarrollo de bacterias ácido lácticas (Roberfroid *et al.*, 2010) que actúan contra entero patógenos causantes de diarreas, mediante la producción de bacteriocinas (Messaoudi *et al.*, 2013).

Las fuentes de inulina utilizadas en la industria internacional son la achicoria (*Cichorium intybus*) y la alcachofa (*Helianthus tuberosus*) (Leroy *et al.*, 2010); en México, la especie *Agave tequilana* Weber var. Azul, tiene un contenido alto de inulina (Carranza *et al.*, 2015). El uso de inulina de achicoria como sustrato energético para bacterias ácido lácticas (BAL) esta documentado en estudios *in vitro* (Díaz-Vela *et al.*, 2012); pero con el uso de inulina de agave son escasas y se limitan a investigaciones *in vitro* (Moreno-Vilet *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2016a; 2016b) e *in vivo* (Velázquez-Martínez *et al.*, 2014; García-Curbelo *et al.*, 2015; Márquez-Aguirre *et al.*, 2016). En el presente estudio, el objetivo fue evaluar el efecto prebiótico de la inulina de achicoria y de agave en el crecimiento *in vitro* de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Posgrado de Ganadería del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, ubicado en Montecillo, Estado de México.

Las incubaciones *in vitro* se realizaron a 37 °C, con sustitución de glucosa por inulina de achicoria o agave en el medio Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (de Man *et al.*, 1961), para determinar el crecimiento de *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus casei* como control positivo.

Pureza de las fuentes de inulina

El grado de pureza (Cuadro 1) de la inulina de agave Inulin Powder[®] (Bestground, Zapopan, Jalisco, México) y de la de achicoria (Inulin from chicory[®], Sigma-Aldrich, USA) se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Knauer, Smartline, Alemania) (Arrizon *et al.*, 2010; Praznik *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Composición (%) de las fuentes de inulina

| | Inulin Powder ^{®1} | Inulin from chicory ^{®2} |
|------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Inulina | 89.56 | 98.80 |
| Azúcar | 3.17 | 0.93 |
| Sacarosa | 2.83 | 0.27 |
| D-glucosa | 1.17 | - |
| D-fructosa | 3.27 | - |

¹Bestground, Zapopan, Jalisco, México; ²Sigma-Aldrich, USA.

Cepas de bacterias probióticas

Las cepas utilizadas fueron *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* aisladas de calostro de vacas Holstein y mucosa oral de becerros, respectivamente (Caballero, 2014), e identificadas mediante técnicas moleculares (Gómez, 2015).

El control positivo fue *Lactobacillus casei* ATCC procedente del Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos de la Facultad de Química, de la Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Las cepas se conservaron a -20 °C en tubos Eppendorf (650 µL de inóculo crecido en medio MRS y 650 µL de glicerol como crioprotector).

Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue completamente al azar con siete tratamientos de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tratamientos experimentales

| Tratamiento | | Descripción |
|-------------|---------------------------------|---|
| T1 | <i>Lactobacillus casei</i> | + MRS – glucosa (Testigo) |
| T2 | <i>Lactobacillus casei</i> | + MRS – inulina de achicoria ¹ |
| T3 | <i>Lactobacillus salivarius</i> | + MRS – inulina de achicoria |
| T4 | <i>Enterococcus faecium</i> | + MRS – inulina de achicoria |
| T5 | <i>Lactobacillus casei</i> | + MRS – inulina de agave ² |
| T6 | <i>Lactobacillus salivarius</i> | + MRS – inulina de agave |
| T7 | <i>Enterococcus faecium</i> | + MRS – inulina de agave |

¹Inulin from chicory[®], Sigma-Aldrich, USA; ²Inulin Powder[®], Bestground, Zapopan, Jalisco, México.

Medios de cultivo

El medio utilizado fue MRS (Fluka Analytical[®], Sigma-Aldrich) descrito para bacterias ácido lácticas, en el cual se sustituyó la glucosa (20 g L⁻¹, 2 % p/v) por inulina de achicoria o de agave de acuerdo con su pureza (Cuadro 3). Después se ajustó el pH a 6.2±0.2 en los medios y se esterilizaron 15 min a 121 °C.

Cuadro 3. Medios de cultivo MRS con glucosa o inulina

| Componente, g L ⁻¹ | MRS – Glucosa ^{††} | MRS – Inulina de achicoria | MRS – Inulina de agave |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------|
| Peptona | 10 | 10 | 10 |
| Extracto de carne | 8 | 8 | 8 |
| Extracto de levadura | 4 | 4 | 4 |
| Glucosa | 20 | 0 | 0 |
| Inulina [†] | 0 | 20.24 | 23.52 |
| Fosfato dipotásico | 2 | 2 | 2 |
| Acetato de sodio | 5 | 5 | 5 |
| Citrato de triamonio | 2 | 2 | 2 |
| Sulfato de magnesio | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Sulfato de manganeso | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| Monoleato de sorbitan, mL | 1 | 1 | 1 |

pH final 6.2±0.2; [†]Ajustado de acuerdo a la pureza de inulina en cada fuente; ^{††}(de Man *et al.*, 1961).

Reactivación de las cepas bacterianas

Las cepas de *L. salivarius*, *E. faecium* y *L. casei* identificadas como BAL, se descongelaron gradualmente de -20 °C a 4 °C y después a temperatura ambiente (18 a 20 °C). Luego se inocularon 1.3 mL de cada cultivo en tubos Labcon (15 mL) con 11.7 mL de medio de cultivo (relación 1/10) según el tratamiento (Cuadro 2) y se incubaron 12 h a 37 °C.

Concentración bacteriana del inóculo inicial

Después de la reactivación (12 h) se tomaron alícuotas de 1 mL de cada cepa evaluada y se hicieron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-12}) en tubos que contenían 9 mL de agua peptonada (8.5%), posteriormente se realizó la siembra por estría en cajas Petri con agar MRS de cada dilución elaborada y se incubaron a 37°C por 24 h; finalmente se estimó la concentración bacteriana mediante el conteo de UFC, y los datos se expresaron con la función \log_{10} : 9.55; 9.21; 9.13; 9.15; 9.34; 9.36; 9.31 UFC mL⁻¹ T1, T2, T3, T4, T5, T6 y T7, respectivamente.

Cinética de crecimiento y pH

Se agregaron 12 mL del cultivo reactivado en matraces Erlenmeyer (125 mL) con 108 mL del medio de cultivo (1/10 v/v) y se incubaron a 37 °C por 60 h. Los tiempos de lectura se establecieron de acuerdo a lo recomendado (Gómez, 2015) con base al inicio y termino de la fase exponencial.

Para determinar la curva de crecimiento se tomaron alícuotas de 3 mL de los cultivos de cada tratamiento (Cuadro 2), y se realizaron lecturas de densidad óptica (630 nm) a las 0, 3, 6, 12, 24, 30, 36, 48, 54 y 60 h, utilizando un espectrofotómetro (Cary 1E UV-Visible, USA); asimismo, se registró el pH (Thermo Scientific Star A121[®], USA) en cada horario de muestreo. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento.

Tasa de crecimiento

A partir de lecturas de densidad óptica (DO) en la fase exponencial se calculó: 1) tasa específica de crecimiento (μ , h⁻¹) y 2) tiempo de generación (T, min), obtenido a partir del valor de μ , mediante las siguientes ecuaciones (McKay *et al.*, 1997):

$$1) \ln N = \ln N_0 + \mu t \quad 2) t = \ln 2 / \mu$$

Dónde: $\ln N$ = DO al inicio y $\ln N_0$ = DO final de la fase exponencial, t = tiempo transcurrido entre N_0 y N .

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las variables estudiadas se analizaron mediante PROC GLM (SAS, 2013) y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de crecimiento

Las Figuras 1a y 1b presentan las curvas de crecimiento de las cepas *L. salivarius* y *E. faecium* con las fuentes de inulina evaluadas. El crecimiento en los tratamientos T6 y T7 con inulina de agave fue mayor ($P \leq 0.05$) a las 24 h (DO: 1.80^c y 1.70^c, respectivamente) respecto a los tratamientos T3 y T4 (DO: 1.19^d y 1.19^d, respectivamente) con inulina de achicoria. Por su parte, *Lactobacillus casei* mostró similar crecimiento en medio MRS-glucosa, MRS-inulina de achicoria y MRS-inulina de agave a las 24 h (DO: 2.54^b, 2.70^a y 2.48^b, respectivamente). Al final de la incubación *L. salivarius* mostró el mayor crecimiento ($P \leq 0.05$) con inulina de achicoria.

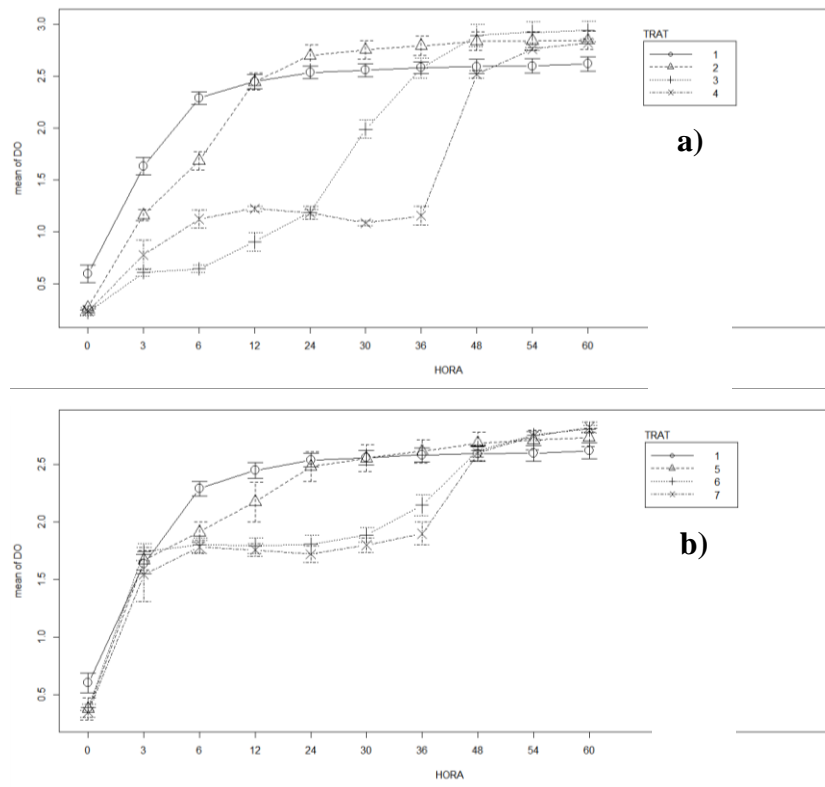


Figura 1. Crecimiento de *Lactobacillus casei* (Lc), *Lactobacillus salivarius* (Ls) y *Enterococcus faecium* (Ef) en inulina de achicoria (IAC) o inulina de agave (IAG).

El mayor crecimiento observado con inulina de agave se relacionó con la estructura tipo mixto de este polímero, compuesto por cadenas lineales de fructosas unidas a enlaces β -[(2→1), (2→6)] con ramificaciones (Praznik *et al.*, 2013); en contraste, la inulina de achicoria presenta enlaces β -(2→1), sin ramificaciones implicando menor degradación, no hidrolizables en mamíferos (Costabile *et al.*, 2010), pero altamente utilizables por las BAL de los géneros *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. (Slavin y Feirtag, 2011; Apolinário *et al.*, 2014). Además, el grado de polimerización (GP) y las ramificaciones de la molécula afectan la degradación de la inulina, donde el bajo GP de la inulina de agave propicia mayor solubilidad, lo cual favorece su degradación y utilización; por lo anterior, la inulina de agave resulta como una alternativa de energía y mostró capacidad prebiótica para las BAL evaluadas en este estudio.

Adicionalmente, el mayor crecimiento de las cepas *L. salivarius* y *E. faecium* con la inulina de agave se asoció al grado de polimerización (GP) según las fuentes de inulina, observándose que el mayor desdoblamiento ocurre con fuentes de bajo GP (Shoaib *et al.*, 2016). El GP varía según la especie vegetal (Mancilla y López, 2006), región de producción, nutrientes en el terreno, régimen hídrico (Pinal *et al.*, 2009) y tiempo de cosecha (Arrizon *et al.*, 2010). La inulina de achicoria y alcachofa tienen alto GP ≤ 60 (Roberfroid *et al.*, 2010), y el agave presenta bajo GP ≤ 30 (Mellado-Mojica *et al.*, 2012). Lo anterior explica el mayor desarrollo de la BAL evaluadas cuando el medio contenía inulina de agave. El crecimiento de *L. salivarius* y *E. faecium* en MRS con inulina de agave (MRS-IAg) se caracterizó por una fase lag nula, y una fase exponencial eminente entre 0 y 6 h de incubación; sin embargo, para *L. salivarius* y *E. faecium* en MRS con inulina de achicoria (MRS-IAc) la fase exponencial fue menos pronunciada (Figuras 1 y 2).

Tasa de crecimiento

La tasa de crecimiento en las bacterias (μ) tuvo un incremento ($P \leq 0.05$) de 41% en promedio, en los tratamientos T5, T6, T7 en MRS-IAg y T2 en MRS-IAc, comparados con el grupo testigo (T1) (Cuadro 4). Las cepas probióticas evaluadas en el presente estudio mostraron la capacidad de utilizar ambas fuentes de inulina; sin embargo, el crecimiento varió entre estas en función del sustrato incluido en el medio como fuente de energía e implicó una reducción ($P \leq 0.05$) de 42.6 min en promedio en el tiempo de generación (T) para las cepas cultivadas con inulina de agave, respecto al grupo testigo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tasa específica de crecimiento (μ) y tiempo de generación (T) en bacterias ácido lácticas en medio MRS con dos fuentes de inulina

| | Tratamientos | | | | | | | | P |
|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|--------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | EEM | |
| μ (h^{-1}) | 0.34 ^b | 0.48 ^a | 0.33 ^b | 0.39 ^b | 0.51 ^a | 0.50 ^a | 0.50 ^a | 0.01 | 0.0001 |
| T (min) | 125.9 ^a | 85.9 ^c | 126.8 ^a | 106.2 ^b | 83.6 ^c | 82.9 ^c | 83.4 ^c | 3.85 | 0.0001 |

T1: MRS-glucosa+Lc; T2: MRS-IAc+Lc, T3: MRS-IAc+Ls, T4: MRS-IAc+Ef, T5: MRS-IAg+Lc, T6: MRS-IAg+Ls y T7: MRS-IAg+Ef. Inulina de achicoria (IAc); Inulina de agave (IAg). ^{a, b, c} Medias con literales distintas en la misma fila son diferentes ($P \leq 0.05$); EEM= Error estándar de la media; Lc: *Lactobacillus casei*; Ls: *Lactobacillus salivarius*; Ef: *Enterococcus faecium*.

Este crecimiento se explica por la rápida degradación observada en la inulina de agave de bajo GP; por el contrario, la inulina de achicoria presenta compuestos remanentes de alto GP los cuáles propiciarán una degradación lenta y un efecto prebiótico prolongado (Ito *et al.*, 2011), lo cual está relacionado también con la longitud de las cadenas en su estructura (Mueller *et al.*, 2016^a, 2016b).

Los fructanos de tipo inulina cuando no son ramificados se dividen en disacáridos o monosacáridos y son degradados extracelularmente, mientras los mixtos como la inulina de agave, son absorbidos intracelularmente, y sólo las bacterias probióticas podrán usarlos (Takagi *et al.*, 2013; Tsujikawa *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2016^a).

El tiempo de generación (T) es 61 min para *L. salivarius* en medio MRS con fructooligosacaridos (Saminathan *et al.*, 2011) y de 40 min en cepas de *E. faecium* cultivadas en MRS (Morandi *et al.*, 2005). Las diferencias en el valor de T indicado por estos autores con relación a los datos del presente estudio se explican por la concentración de nutrientes en el medio y la cinética de las reacciones intracelulares, las cuales afectan la transcripción y traducción del ADN y la velocidad de crecimiento bacteriano (Carvalho *et al.*, 2013). *E. faecium* posee diferentes rutas para el metabolismo de carbohidratos, permitiéndole utilizar amplia variedad de azúcares (van Schaik *et al.*, 2010). Chowdhury *et al.* (2016) hallaron el menor tiempo de generación (T=51 min) de *L. casei* cuando la concentración de lactosa e inulina en el medio MRS fue de 20 y 0.32 g L⁻¹, respectivamente.

Este patrón de crecimiento se debe a la capacidad del género *Lactobacillus* de fermentar fructanos de bajo y alto peso molecular (Paludan-Müller *et al.*, 2002); por el contrario, cepas del género *Bifidobacterium* tienen alta afinidad por los fructanos de bajo peso molecular (Falony *et al.*, 2009). El tipo de cepa y sustrato utilizado en el medio podría explicar el tiempo de generación obtenido en el presente estudio.

Velázquez-Martínez *et al.* (2014) y Mueller *et al.* (2016^a, 2016^b) reportan crecimientos mayores en bacterias prebióticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* cuando se utilizó inulina de agave de bajo GP, similar a lo observado en las cepas *L. salivarius* y *E. faecium* evaluadas en el presente estudio.

La diferencia en la tasa de crecimiento bacteriano se relaciona con enzimas (Tabasco *et al.*, 2014) sintetizadas por las BAL, responsables de la fermentación de diferentes carbohidratos; asimismo, de la presencia de códigos génicos definidos (Saulnier *et al.*, 2007), originando patrones de crecimiento en diferentes sustratos, debido al metabolismo específico en el consumo de inulina (Watson *et al.*, 2013). Lo anterior sustenta las diferencias en el metabolismo de las fuentes de inulina evaluadas en este estudio y su relación con el crecimiento bacteriano observado.

pH

El pH al inicio de la incubación fue menor ($P \leq 0.05$) en T1, seguido de T5 al T7 y T2 al T4 con valores promedio de 5.4^c, 5.5^b y 5.7^c, respectivamente. Los valores de pH en el medio de cultivo fueron disminuyendo gradualmente, independientemente de la fuente de inulina; al final de la incubación también hubo diferencia ($P \leq 0.05$) entre tratamientos para esta variable (Figuras 2^a y 2^b).

La disminución del pH en el medio de cultivo es resultado de la fermentación de carbohidratos y la producción de ácido láctico por las BAL (Özcelik *et al.*, 2016). Pompei *et al.* (2008) evaluaron cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en medio MRS con dos fuentes de inulina, y reportaron un pH de 3.7, similar a lo observado en el presente estudio. El pH inicial en el medio afecta las tasas de crecimiento; sin embargo, *L. casei* se adapta a medios ácidos (pH 3); de manera similar *L. salivarius* resiste pH de 2.6 por un lapso de 6 h (Sanhueza *et al.*, 2015).

El pH y la temperatura afectan la actividad enzimática, el metabolismo (Tang *et al.*, 2016), transporte de nutrientes en la célula, síntesis de ARN y proteínas (Panesar *et al.*, 2010); asimismo; pH bajos afectan el crecimiento celular e inhiben las reacciones bioquímicas para la producción de ácido láctico; las bacterias para sobrevivir en condiciones ácidas regulan su pH intracelular a través de la ATPasa, mediante el bombeo de H⁺ fuera de la célula (Ai *et al.*, 2017).

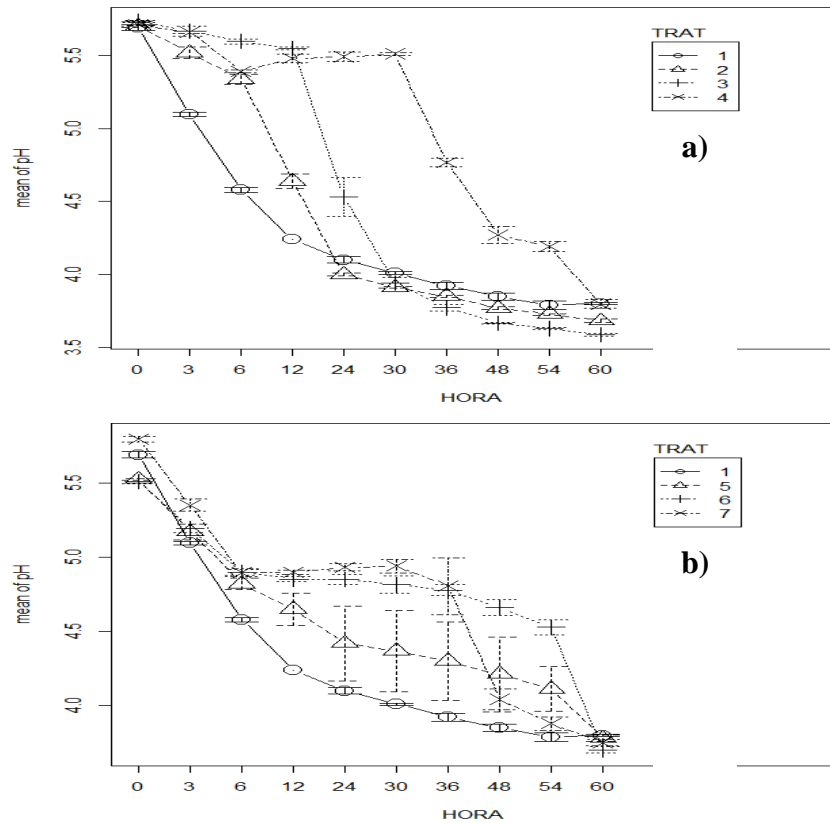


Figura 2. pH de los medios de cultivo con inulina de achocria (IAC) o inulina de agave (IAG) e inoculados con *Lactobacillus casei* (Lc), *Lactobacillus salivarius* (Ls) y *Enterococcus faecium* (Ef).

CONCLUSIONES

La inulina de agave favorece el crecimiento de *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus casei*.

AGRADECIMIENTOS

A la compañía BESTGROUND por la información e inulina de agave donada; al DIPA-FQ de la Universidad Autónoma de Querétaro, México por la donación de la cepa control y a CONACYT, México, por la beca para realizar estudios de doctorado.

LITERATURA CITADA

- Ai Z, Lv X, Huang S, Liu G, Sun X, Chen H, Sun J, Feng Z. The effect of controlled and uncontrolled pH cultures on the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. *Food Sci Technol* 2017;77:269-275.
- Apolinário CA, de Lima Damasceno BPG, de Macêdo BNE, Pessoa A, Converti A, da Silva J. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohyd Polym* 2014;101:368-378.
- Arrizon J, Morel S, Gschaedler A, Monsan P. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. *Food Chem* 2010;122:123-130.
- Beyene T. Veterinary drug residues in food-animal products: Its risk factors and potential effects on public health. *J Veterinar Sci Technol* 2016;7(1):285.
- Caballero CY. Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico en bovinos Holstein [tesis maestría]. México: Colegio de Postgraduados; 2014.
- Carranza OC, Ávila FA, Bustillo AGR, López-Munguía A. Processing of fructans and oligosaccharides from Agave plants. In: Preedy RV editor. *Processing and Impact on Active Components in Food*. 1ª ed. USA: Academic Press; 2015:121-129.
- Carvalho AL, Turner DL, Fonseca LL, Solopova A, Catarino T, Kuipers OP, *et al*. Metabolic and transcriptional analysis of acid stress in *Lactococcus lactis*, with a focus on the kinetics of lactic acid pools. *PLoS ONE* 2013;8(7):68470.
- Chowdhury R, Banerjee D, Bhattacharya P. The prebiotic influence of inulin on growth rate and antibiotic sensitivity of *Lactobacillus casei*. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016;8(4):181-184.
- Costabile A, Kolida S, Klinder A, Gietl E, Buerlein M, Frohberg C, *et al*. A double-blind, placebo-controlled, cross-over study to establish the bifidogenic effect of a very-long-chain inulin extracted from globe artichoke (*Cynara scolymus*) in healthy human subjects. *Br J Nutr* 2010;104(7):1007-1017.

- de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 1960;23:130-135.
- Díaz-Vela J, Mayorga-Reyes L, Alfonso-Totosaus SA, Pérez-Chabela ML. Kinetics parameters and short chain fatty acids profiles of thermotolerant lactic acid bacteria with different carbon sources. *VITAE* 2012;19(3):253-260.
- Falony G, Lazidou K, Verschaeren A, Weckx S, Maes D, De Vuyst L. *In vitro* kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by *Bifidobacterium* species reveals four different phenotypes. *J Appl Microbiol* 2009;75(2):454-461.
- García-Curbelo Y, Bocourt R, Savon LL, García-Vieyra MI, López MG. Prebiotic effect of *Agave fourcroydes* fructans: an animal model. *Food Funct* 2015;6(9):3177-3182.
- Gómez HJL. Inulina como prebiótico para *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium* con potencial probiótico en rumiantes [tesis maestría]. México: Colegio de Postgraduados; 2015.
- Ito H, Takemura N, Sonoyama K, Kawagishi H, Topping DL, Conlon MA, *et al.* Degree of polymerization of inulin-type fructans differentially affects number of lactic acid bacteria, intestinal immune functions, and immunoglobulin a secretion in the rat cecum. *J Agric Food Chem* 2011;59:5771-5778.
- Leroy G, Grongnet JF, Mabeau S, Le Corre D, Baty JC. Changes in inulin and soluble sugar concentration in artichokes (*Cynara scolymus* L.) during storage. *J Sci Food Agric* 2010;90:1203-1209.
- Li S, Cui D, Wang S, Wang H, Huang M, Qi Z, *et al.* Efficacy of an herbal granule as treatment option for neonatal Tibetan lamb diarrhea under field conditions. *Lives Sci* 2015;172:79-84.
- Mancilla MNA, López MG. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *J Agric Food Chem* 2006;54(20):7832-7839.
- Márquez-Aguirre AL, Camacho-Ruiz RM, Gutiérrez-Mercado YK, Padilla-Camberos E, González-Ávila M, Gálvez-Gastélum FJ, *et al.* Fructans from *Agave tequilana* with a lower degree of polymerization prevent weight gain, hyperglycemia and liver steatosis in high-fat diet-induced obese mice. *Plant Foods Hum Nutr* 2016;71:416-421.
- McKay AL, Peters AC, Wimpenny JWT. Determining specific growth rates in different regions of *Salmonella typhimurium* colonies. *Lett Appl Microbiol* 1997;24(1):74-76.

- Mellado-Mojica E, López MG. Fructan metabolism in *A. tequilana* weber blue variety along its developmental cycle in the field. *J Agric Food Chem* 2012;60:11704-11713.
- Messaoudi S, Manai M, Kergourlay G, Prévost H, Connil N, Chobert JM, *et al.* Review: *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol* 2013;36:296-304.
- Morandi S, Brasca M, Alfieri P, Lodi R, Tamburini A. Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Lait* 2005;85(3):181-192.
- Moreno-Vilet L, Camacho-Ruiz RM, Portales-Pérez DP. Prebiotic agave fructans and immune aspects. In: Watson RR y Preedy RV editors. *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion*. USA: Academic Press; 2016:165-179.
- Mueller M, Reiner J, Fleischhacker L, Viernstein H, Loeppert R, Praznik W. Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure. *J Funct Foods* 2016;24:264-275.
- Mueller M, Schwarz S, Viernstein H, Loeppert R, Praznik W. Growth of selected probiotic strains with fructans from agaves and chicory. *Agro Food Ind Hi Tec* 2016;27(3):54-57.
- Özcelik S, Kuley E, Özogul F. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *Food Sci Technol* 2016;73:536-542.
- Paludan-Müller C, Madsen M, Sophanodora P, Gram L, Moller PL. Fermentation and microflora of *plaa-som*, a thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. *Int J Food Microbiol* 2002;73:61-70.
- Panesar PS, Kennedy JF, Knill JC, Kosseva M. Production of L (+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. *Braz Arch Biol Technol* 2010;53(1):219-226.
- Pinal L, Cornejo F, Arellano M, Herrera E, Nuñez L, Arrizon J, *et al.* Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *Journal of Industrial Microbiol Biot* 2009;36(5):655-661.
- Pompei A, Cordisco L, Raimondi S, Amaretti A, Pagnoni AM. *In vitro* comparison of the prebiotic effect of two inulin-type fructans. *Aerobe* 2008;14:280-286.
- Praznik W, Löppert R, Cruz RJM, Zangger K, Huber A. Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* weber, var. azul. *Carbohydr Res* 2013;381:64-73.

- Roberfroid M, Gibson RG, Hoyles L, McCartney LA, Rastall R, Rowland I, *et al.* Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 2010;104(2):1-63.
- Samanta AK, Jayapal N, Senani S, Kolte AP, Sridhar M. Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Braz J Microbiol* 2013;44(1):1-14.
- SAS. SAS/STAT User's Guide (9.4) Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 2013.
- Shoaib M., Shehzada A., Mukama O., Rakha A., Raza H., Sharif H. R. , *et al.* Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydr Polym* 2016;147:444-454.
- Slavin J, Feirtag J. Chicory inulin does not increase stool weight or speed up intestinal transit time in healthy male subjects. *Food Funct* 2011;2(1):72-77.
- Saminathan M, Siew CC, Kalavathy R, Abdullah N, Ho YW. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus* strains used as a probiotic for chickens. *Afr J Microbiol Res* 2011;5(1):57-64.
- Sanhueza E, Paredes-Osses E, González CL, García A. Effect of pH in the survival of *Lactobacillus salivarius* strain UCO_979C wild type and the pH acid acclimated variant. *Electron J Biotechnol* 2015;18:343-346.
- Saulnier DMA, Molenaar D, de Vos, WM, Gibson GR, Kolida S. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. *Appl and Environ Microb* 2007;73(6):1753-1765.
- Tabasco R, Fernández PP, Fontecha J, Peláez C, Requena T. Competition mechanisms of lactic acid bacteria and bifidobacteria: Fermentative metabolism and colonization. *Food Sci Technol* 2014;55:680-684.
- Takagi R, Tsujikawa Y, Nomoto R, Osawa R. Comparison of the Growth of *Lactobacillus delbrueckii*, *L. paracasei* and *L. plantarum* on inulin in co-culture systems. *Biosci Microb Food Health* 2013;33(4):139-146.
- Tang J, Wang X, Hu Y, Zhang Y, Li Y. Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: Effects of pH, temperature and high OLR. *Waste Manage* 2016;52:278-285.
- Tsujikawa Y, Nomoto R, Osawa R. Difference in degradation patterns on inulin-type fructans among strains of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus paracasei*. *Biosci Microb Food Health* 2013;32(4):157-165.

- van Schaik W, Top J, Riley RD, Boekhorst J, Vrijenhoek EPJ, Schapendonk MEC, *et al.* Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. BMC Genomics 2010;11:239.
- Velázquez-Martínez JR, González-Cervantes RM, Hernández-Gallegos MA, Mendiola RC, Aparicio AR, Ocampo ML. Prebiotic potential of *Agave angustifolia* haw fructans with different degrees of polymerization. Molecules 2014;19(8):12660-12665.
- Watson D, O'Connell MM, Schoterman MHC, van Neerven RJ, Nauta A, van Sinderen D. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. J Appl Microbiol 2013;114:1132-1146.
- Woolhouse M, Ward M, van Bunnik B, Farrar J. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. Phil Trans R Soc B 2015;370-377.
- Yirga H. The Use of Probiotics in Animal Nutrition. J Prob Health 2015;3(2):1-10.

CAPÍTULO II. RESPUESTA PRODUCTIVA, VARIABLES HEMATOLÓGICAS Y COLIFORMES EN CORDEROS LACTANTES CON ADICIÓN DE INULINA Y

Lactobacillus casei

GROWTH PERFORMANCE, HEMATOLOGICAL VARIABLES AND COLIFORMES IN SUCKLING LAMBS WITH ADDITION INULIN AND *Lactobacillus casei*

Marco Antonio Ayala-Monter, David Hernández-Sánchez, Rene Pinto-Ruiz, Sergio S. González-Muñoz, José R. Bárcena-Gama¹, Omar Hernández-Mendo, Nicolás Torres-Salado

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto prebiótico de la inulina *Agave tequilana* y la cepa probiótica *Lactobacillus casei* en el crecimiento, variables hematológicas y coliformes totales en corderos durante la lactancia. Se utilizaron 45 corderos recién nacidos (Kathadin x Dorset, 4.8 ± 0.8 kg PV). Se evaluó la ganancia diaria de peso (GDP), consumo de MS (CMS) y la presencia de diarrea en cada cordero durante 56 d. A las 24 h postparto y al final del experimento, se recolectaron muestras de sangre para evaluar variables hematológicas y metabolitos séricos; además, en muestras de heces se estimó la población de coliformes totales y lactobacilos. El diseño fue completamente al azar, los tratamientos (T) fueron: T1, Alimento preiniciador (AP); T2, AP + 2 % inulina y T3, AP + 2 % inulina + *L. casei*, se realizó un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. La adición de inulina de agave y *L. casei* aumentó la GDP y peso al destete (PD): GDP = 356^b , 384^{ab} y 415^a g d⁻¹; PD = 24.92^a , 26.18^{ab} y 28.07^a kg para T1, T2 y T3, respectivamente; así como la población de lactobacilos: 5.79^b , 6.32^{ab} y 6.48^a Log₁₀ UFC g⁻¹, T1, T2 y T3, respectivamente ($P \leq 0.05$). La población de coliformes totales (T1= 6.18^a , T2 = 5.77^a y T3= 5.07^b Log₁₀ UFC g⁻¹) y el porcentaje de diarreas (T1=46.7, T2 =33.3 y T3=20 %) fue menor ($P \leq 0.05$) en los corderos del T3. La concentración de colesterol sérico disminuyó ($P \leq 0.05$) 11 y 13 % en T2 y T3, respectivamente. La combinación de inulina de agave y *L. casei* aumentan la ganancia de peso y mejoran la salud intestinal al reducir los coliformes e incidencia de diarreas en corderos durante la lactancia.

Palabras clave: *Agave tequilana*, inulina, coliformes, lactobacilos, salud intestinal.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the prebiotic effect of the *Agave tequilana* inulin and the probiotic strain *Lactobacillus casei* on performance, hematological variables and total coliforms in suckling lambs. Forty five newborn lambs (Kathadin x Dorset, 4.8 + 0.8 kg PV) were used. Daily weight gain (DWG), dry matter intake (DMI) and diarrhea incidence were evaluated. At 24 h postpartum and at the end of the experiment, blood samples were collected to evaluate hematological variables and serum metabolites; in addition, total coliforms and lactobacilli population was estimated in faeces. The experimental design was completely randomized, and treatments (T) were: T1, preinitiator concentrate (PC); T2, PC + 2 % inulin and T3, PC + 2 % inulin + *L. casei*, an ANDEVA was performed and treatments means were compared with Tukey test. The addition of agave inulin and *L. casei* increased the DWG and weaning weight (WW): DWG = 356^b, 384^{ab} and 415^a g d⁻¹; WW = 24.92^a, 26.18^{ab} and 28.07^a kg for T1, T2 and T3, respectively; as well as lactobacillus population: 5.79^a, 6.32^{ab} and 6.48^a Log₁₀ UFC g⁻¹, T1, T2 and T3, respectively (P ≤ 0.05). The total coliform population (T1 = 6.18^a, T2 = 5.77^b y T3 = 5.07^b Log₁₀ UFC g⁻¹) and diarrheas incidence (T1 = 46.7, T2 = 33.3 and T3 = 20 %) were lower (P ≤ 0.05) in the lambs of T3. The serum cholesterol concentration decreased (P ≤ 0.05) 11 and 13 % in T2 and T3, respectively. Combination of agave inulin and *L. casei* increases DWG and improve intestinal health by reducing coliforms population and diarrhea incidence in suckling lambs.

Key words: *Agave tequilana*, inulin, coliforms, lactobacilli, intestinal health. .

INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción para carne ovina la finalidad es obtener el mayor porcentaje de corderos destetados. Sin embargo, se presentan muertes de 15 a 20 % de los neonatos (Corner *et al.*, 2006, 2007; Dwyer y Morgan, 2006), debido a la inanición y exposición al frío las cuales pueden ocasionar la muerte durante los primeros tres días de vida (Mellor y Stafford, 2004). En los rumiantes la transmisión de anticuerpos se obstaculiza debido a la naturaleza histológica de la placenta (Roa *et al.*, 2012; Haeger *et al.*, 2016) y como consecuencia los corderos nacen sin protección inmunológica (Zhang *et al.*, 2015). Por lo tanto, es importante que ingieran calostro durante las primeras horas de vida (Castro *et al.*, 2011) ya que al transcurrir el tiempo, se reduce el paso de inmunoglobulinas a través de las vellosidades intestinales y esto limita el desarrollo de la inmunidad pasiva (Gokce *et al.*, 2014; Hernández-Castellano *et al.*, 2014a). Durante la lactancia, la protección inmunológica disminuida propicia infecciones respiratorias y digestivas, particularmente diarreas (Chatzopoulos *et al.*, 2016); incluso corderos que reciben calostro en cantidades adecuadas pueden enfermarse cuando este no contiene anticuerpos específicos (Zhang *et al.*, 2015).

Las diarreas en corderos son causadas por agentes etiológicos como bacterias: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp. (Aragão *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014); parásitos: *Cryptosporidium* spp. y *Giardia* spp. (Yang *et al.*, 2009; Minetti *et al.*, 2014) y virus de las familias *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Rotaviridae*. Por ello es considerada un síndrome complejo y multifactorial (Martella *et al.*, 2015), de importancia económica en la industria ovina, por ocasionar baja tasa de crecimiento o muerte en los corderos (Gökce *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2014).

En este contexto, el manejo profiláctico de las diarreas ha sido a través de la aplicación de antimicrobianos; sin embargo, su uso continuo e indiscriminado ocasiona resistencia bacteriana (Founou *et al.*, 2016); por lo anterior, los probióticos y prebióticos (Gaggìa *et al.*, 2010; Angelakis, 2017) son alternativas al uso de antibióticos para su control (Allen *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2017).

Los prebióticos como la inulina estimulan el crecimiento de bacterias probióticas (Roberfroid *et al.*, 2010), las cuales actúan contra patógenos a través de la producción de bacteriocinas y exclusión competitiva (Hajati y Rezaei, 2010; Messaoudi *et al.*, 2013); lo cual beneficia la microflora intestinal y el crecimiento de los corderos; además, favorece el sistema inmunológico (Provenza y Villalba, 2010). En pequeños rumiantes, la fuente de inulina utilizada es la de achicoria (*Cichorium intybus*) (Kara *et al.*, 2012; Kazemi-Bonchenari *et al.*, 2013); no obstante, las investigaciones realizadas en corderos durante la lactancia son escasas (Moarrab *et al.*, 2016). En México, la inulina se obtiene a partir de agave (Carranza *et al.*, 2015); pero en la literatura consultada no se encontró información sobre su uso en corderos lactantes. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto prebiótico de la inulina de *Agave tequilana* y la cepa probiótica *Lactobacillus casei* en la respuesta productiva, variables hematológicas y coliformes en corderos durante la lactancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La investigación se realizó en el módulo de Producción Ovina y en el Laboratorio de Nutrición Animal, pertenecientes al Posgrado de Ganadería del Colegio de Posgraduados, ubicado en Montecillo, Estado de México (19° 29' N y 98° 53' O, 2250 m de altitud). El clima Cb (wo) (w) (i) g, corresponde a templado subhúmedo con lluvias en verano, precipitación pluvial de 636.5 mm y temperatura media anual de 16 °C (García, 2004).

Corderos y manejo sanitario

Se utilizaron 45 corderos machos recién nacidos (Kathadin x Dorset de 4.8±0.8 kg PV), provenientes de un lote de 80 borregas con peso promedio de 60±5.5 kg, 3.0 años de edad y segundo parto. Un mes antes de la fecha de parto, las borregas fueron tratadas con antiparasitario Ivomec® (0.2 mg kg⁻¹ PV, SC) y bacterina múltiple Bobact® 8 (2.5 mL animal⁻¹, IM) para inmunizar contra enfermedades de tipo bacteriano (*Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium sordelli*, *Clostridium perfringes*, *Pasterella multocida* tipo A, *Pasterella multocida* tipo D y *Pasterella haemolytica*).

Después del nacimiento se desinfectó el cordón umbilical de los corderos con Negasunt® y se identificaron con arete. Los procedimientos de cuidado, manipulación y muestreo de los corderos se realizaron de acuerdo al “Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la Investigación en el Colegio de Postgraduados (02.11.16)”.

Manejo nutricional

Posterior al parto y durante el período de lactancia, las borregas fueron alimentadas a las 08:00 h, y se les proporcionaron en los tres tratamientos 800 g animal⁻¹ d⁻¹ de concentrado comercial Ovina Reproductores® (Agribands Purina, 14 % PC), heno de avena (9.2 % PC) y heno de alfalfa (16.9 % PC, durante el primer mes de lactancia) y agua *ad libitum*.

Al momento del parto, los corderos se alimentaron con calostro (Cuadro 1) y se alojaron con sus madres durante 4 d en jaulas individuales equipadas con comedero y bebedero, posteriormente se agruparon por tratamientos (Cuadro 2) en un corral con las borregas hasta el destete, durante este período se ofreció en creep feeding alimento preiniciador Nulamb® (Grupo NUTEC; Cuadro 2), leche materna mediante amamantamiento (Cuadro 1) y agua *ad libitum*; el probiótico e inulina se ofreció a las 09:00 h con el uso de una jeringa con cánula oral durante 56 d, las dosis se ajustaron de acuerdo al peso de los corderos, en los cuatro períodos de evaluación (Cuadro 2). La fuente de inulina evaluada fue Inulin Powder® (Bestground, Zapopan, Jalisco, México) y la cepa probiótica *Lactobacillus casei* Yakult® (Yakult, México) a una concentración de 10⁸ UFC mL⁻¹. El destete se efectuó a los 62 ± 2 d.

Cuadro 1. Composición química de calostro y leche de ovejas durante la lactancia de corderos con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*

| Composición, % | Calostro* | Leche | |
|-------------------|-------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | Inicio lactancia [§] | Mitad lactancia ^ϕ |
| Grasa | 8.9 ± 3.3 | 5.8 ± 2.4 | 5.2 ± 1.4 |
| Proteína | 7.5 ± 0.4 | 4.1 ± 1.4 | 3.7 ± 0.7 |
| Lactosa | 3.5 ± 0.3 | 6.2 ± 2.1 | 5.5 ± 1.0 |
| Sólidos no grasos | 16.0 ± 4.3 | 11.3 ± 3.9 | 10.0 ± 1.8 |
| Densidad | 1056 ± 21.7 | 1031 ± 9.7 | 1032 ± 2.6 |

*A 6 h, [§]a 5 días, ^ϕa 28 días posparto, respectivamente.

Caracterización del alimento preiniciador

En el alimento se determinó el contenido de materia seca, proteína cruda, cenizas, extracto etéreo de acuerdo a la metodología descrita por AOAC (2005), fibra detergente neutro y fibra detergente ácido mediante el analizador ANKOM (Ankom Technology Corp. A200 Fairport, NY, USA) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos experimentales y composición química del alimento preiniciador

| | Tratamientos (T) | | |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| | T1: Alimento preiniciador (AP) | T2: AP + 2 % inulina* | T3: AP + 2 % inulina* + <i>Lactobacillus casei</i> [§] |
| | | g | g, mL |
| <i>Periodos (14 d)</i> | | animal ⁻¹ d ⁻¹ | |
| 1 | - | 5 | 5 y 15 |
| 2 | - | 8 | 8 y 30 |
| 3 | - | 12 | 12 y 45 |
| 4 | - | 15 | 15 y 45 |
| <i>Componente</i> | Alimento preiniciador (%) | | |
| Materia seca | 92.51 | | |
| Proteína cruda | 18.47 | | |
| Extracto etéreo | 3.50 | | |
| Cenizas | 6.71 | | |
| FDN | 24.74 | | |
| FDA | 6.21 | | |

*Aportada al 2 % con base al consumo de MS y estuvo en función del PV del animal (Inulin Powder[®]), [§]10⁸ UFC mL⁻¹ (Yakult[®]). FDN, Fibra detergente neutro; FDA, Fibra detergente ácido.

Cambio de peso vivo en los corderos

En los corderos se registró el peso al nacimiento (PN, entre las 6 h posteriores al parto), la ganancia diaria de peso (GDP, g d⁻¹) fue estimada mediante el pesaje de los corderos al inicio del experimento y cada 14 d (08:00 h) durante el período de lactancia. El peso final (PF) se registró al momento del destete a los 62±2 d. El aumento de peso total (PT, kg) se calculó como la diferencia entre PF y PI.

Consumo de materia seca del alimento preiniciador

El consumo de materia seca (CMS, g d⁻¹) se estimó de forma grupal mediante la diferencia entre el alimento ofrecido y el rechazado, y se dividió entre el número de corderos por grupo.

Análisis químico de calostro y leche

Se recolectaron muestras de calostro y leche (50 mL) en recipientes de plástico, mediante ordeño manual a las 6 h, 5 y 28 días posparto, para determinar las características químicas (grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos, densidad) mediante un analizador ultrasónico (Lactoscan LA, Milkotronic, Bulgaria). Adicionalmente, en las muestras de calostro se midió la gravedad específica para estimar la concentración de inmunoglobulinas (Fleener y Stott, 1980; El-Loly y Mansour, 2013; Chigerwe y Hagey, 2014) con un refractómetro digital (HANNA 96801, España).

Conteo de coliformes totales y lactobacilos en heces

Al final del experimento (09:00 h), mediante estimulación rectal y uso de guantes de látex, se recolectaron muestras de heces (10 g animal⁻¹) en tubos recolectores estériles y conservados a 4°C, los cuales se trasladaron al laboratorio para determinar la población de coliformes totales y lactobacilos (UFC g⁻¹).

De cada muestra se pesó 1 g, se colocó en un tubo Labcon que contenían 9 mL de solución peptonada (8.5%) y se homogeneizó para realizar diluciones en serie de 10⁻¹ a 10⁻¹²; a continuación, 100 µL de cada dilución fueron sembrados por estría en cajas Petri que contenían agar selectivo para coliformes (Mac Conkey) o para lactobacilos (MRS) y se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 h, respectivamente. Pasado el tiempo de incubación, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) para estimar la población bacteriana y los datos se expresaron con la función logaritmo base 10 (log₁₀).

La solución peptonada y agares se prepararon siguiendo las metodologías descritas por de Man *et al.* (1960). El material y los medios de cultivo empleados en esta fase se esterilizaron en autoclave (LAB-MED, LMV40, México) a 121°C y 15 psi durante 15 min, las diluciones y la siembra bacteriana se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar (LABCONCO, LOGIC A2 800, USA).

Incidencia de diarreas

Durante todo el período de estudio, al momento de ofrecer el suplemento, se observó en cada cordero la presencia de diarrea, para ello las extremidades posteriores teñidas y acumulación de heces alrededor del área perianal fueron evaluadas como hallazgo de diarrea (Kara *et al.*, 2012). Adicionalmente se monitoreo el estado de salud de los corderos.

Recolección y análisis de sangre

A las 24 h postparto y final del experimento (08:00 h), a cada cordero se le extrajo por venopunción de la vena yugular 5 mL de sangre en tubo con anticoagulante (BD Vacutainer® K2 EDTA) y 5 mL de sangre en tubos sin anticoagulante (BD Vacutainer® Serum) respectivamente, las muestras se conservaron a 4 °C y se trasladaron a laboratorio para determinar variables hematológicas (eritrocitos, hematocrito, hemoglobina y diferencial de leucocitos) utilizando un analizador de hematología automatizado (Sysmex XS-1000i, Japón).

Metabolitos séricos

Para evaluar los metabolitos séricos, las muestras de sangre sin anticoagulante se centrifugaron (SIGMA, 2-16k, Alemania) a 3500 x g durante 20 min, el suero obtenido se conservó en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su análisis. Se determinaron las concentraciones séricas de colesterol total (CT); glucosa (GLU), proteína total (PT), albumina (ALB) mediante los métodos enzimático oxidasa-peroxidasa, enzimático, biuret y verde bromocresol, respectivamente, utilizando kits comerciales SPINREACT® (Barcelona, España). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro de luz UV visible (CARY 1-E VARIAN, USA) a una longitud de onda de 505, 540 y 630 nm para CT y GLU, PT y ALB, respectivamente. La concentración sérica de globulinas se estimó por diferencia entre la proteína total y albúmina (Russel y Roussel, 2007).

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y 15 repeticiones. Los datos se analizaron usando PROC GLM (SAS, 2013) y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. Para la variable incidencia de diarreas se utilizó la prueba Chi cuadrada y el conteo de microorganismos mediante la función \log_{10} .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cambio de peso vivo y consumo de alimento

En el presente estudio, la ganancia diaria de peso y el peso al destete de los corderos con adición de inulina y combinación de inulina y *Lactobacillus casei* fue 16 (T3) y 12.6 % (T2) mayor ($P \leq 0.05$) en comparación con los corderos del grupo testigo (Cuadro 3); sin embargo, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) en el aumento de peso en los corderos de los tratamientos T2 y T3. El peso promedio de los corderos al nacimiento fue de 4.8 kg (Cuadro 3) y se ubicó en el intervalo óptimo (3.5 a 5.5 kg) reportado por Corner *et al.* (2006).

Cuadro 3. Crecimiento de corderos con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei* durante la lactancia

| Variable | Tratamientos (T) | | | | |
|------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|------|-------|
| | T1 | T2 | T3 | EEM | P |
| Peso al nacimiento, kg | 4.97 | 4.65 | 4.83 | 0.21 | 0.58 |
| Peso al destete, kg | 24.92 ^b | 26.18 ^{ab} | 28.07 ^a | 0.73 | 0.01 |
| Ganancia total, kg | 19.96 ^b | 21.52 ^{ab} | 23.24 ^a | 0.61 | 0.002 |
| GDP, g d ⁻¹ | 356 ^b | 384 ^{ab} | 415 ^a | 0.01 | 0.002 |
| CMS, g d ⁻¹ | 250 | 252 | 247 | - | - |

T1) Testigo (Alimento preiniciador, AP); T2) AP + 2 % inulina; T3) AP + 2 % inulina + *L. casei*. EEM, Error estándar de la media; ^{a, b} Valores con distinta literal indican diferencias ($P \leq 0.05$); GDP, Ganancia diaria de peso; CMS, Consumo de materia seca.

La mayor ganancia de peso registrada en los corderos se debe en parte con el amamantamiento y disponibilidad de alimento *ad libitum*; sin embargo, la contribución más importante a esta variable fue aportada por el prebiótico y probiótico evaluado. Durante la lactancia los corderos recibieron calostro y leche con una composición similar (Cuadro 1), debido a que las borregas mantuvieron condiciones similares de alimentación, número y tipo de parto.

La disponibilidad del alimento preiniciador permitió cubrir los nutrientes requeridos por los corderos cuando disminuyó la producción láctea en las borregas. Hernández-Castellano *et al.* (2015a) reportan que los corderos criados bajo condiciones de amamantamiento natural presentan mayores ganancias de peso y mejores variables inmunológicas, como ocurrió en los corderos del presente estudio.

Adicionalmente el uso de bacterias ácido lácticas durante la lactancia favorece el crecimiento microbiano y la utilización de nutrientes en rumen (Sun *et al.*, 2010; Mohammed *et al.*, 2013), relacionándose con la ingesta de dietas sólidas y el estímulo del desarrollo fisiológico del rumen en periodos más cortos (Gupta *et al.*, 2016), lo cual favorece el tiempo al destete y la respuesta productiva en los corderos.

Mejoras en la ganancia diaria de peso con el uso de inulina y bacterias probióticas también fueron reportadas por Moarrab *et al.* (2016) quienes incluyeron una mezcla de inulina y *Enterococcus faecium* en la dieta de corderos durante la lactancia. Asimismo, los efectos positivos en GDP también se documentan con el uso de probióticos en la dieta de corderos en crecimiento (Sarwar *et al.*, 2011; Abdel-Salam *et al.*, 2014; Hossein-Ali *et al.*, 2014; El-Katcha *et al.*, 2016) y cabritos (Bularon y Plata, 2017); por el contrario, otros estudios no registraron una GDP en corderos lactantes (Antunovic *et al.*, 2006; Saleem *et al.*, 2017), cabritos (Ataçoğlu *et al.*, 2010; Kara *et al.*, 2012) y corderos en crecimiento (Kazemi *et al.*, 2013) con el uso de probióticos e inulina.

La mayor GDP también se atribuye a un mayor consumo de MS (De Brito *et al.*, 2017); no obstante, en el presente estudio, la ingesta de alimento no se modificó ($P > 0.05$; Cuadro 3) por la adición de inulina y *L. casei*. Una respuesta productiva similar fue reportada por Kazemi *et al.* (2013) durante el crecimiento de corderos; sin embargo, Moarrab *et al.* (2016) informan que la ingesta de MS tiende a disminuir cuando los corderos recibieron dosis altas de prebióticos y probióticos. Las diferencias en los resultados reportados en la literatura y lo obtenido en el presente estudio se relacionan con el tipo de prebiótico o probiótico, dosis, tiempo de administración, composición de la dieta, etapa productiva y características de los corderos.

Coliformes totales y lactobacilos en heces

La población de coliformes totales y lactobacilos en heces se modificó ($P \leq 0.05$) con la combinación de inulina y *Lactobacillus casei*, observándose menor ($P \leq 0.05$) conteo de coliformes y mayor ($P \leq 0.05$) población de lactobacilos en los corderos del T3 en comparación con los del grupo testigo (Cuadro 4). Los resultados de esta investigación son similares con lo informado por Moarrab *et al.* (2016) al combinar prebióticos y probióticos.

Antes del nacimiento, el tubo digestivo de los corderos es estéril; sin embargo, durante el nacimiento es colonizado por microorganismos del canal de parto y del ambiente, en este momento inicia el establecimiento de la flora ruminal e intestinal (Ewaschuk *et al.*, 2004; Meale *et al.*, 2017) y es aquí donde inicia la importancia del aporte de prebióticos y probióticos. Los resultados de este estudio demuestran que los corderos con adición de inulina y *L. casei* (T3) presentaron la menor población de coliformes totales y este comportamiento se atribuye al efecto de las bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, producidas por las bacterias ácido lácticas, creando condiciones no favorables para los enteropatógenos (Dicks y Botes, 2010; Pringsulaka *et al.*, 2015).

Asimismo, los prebióticos como la inulina estimulan el crecimiento y actividad de bacterias ácido lácticas, particularmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Roberfroid *et al.*, 2010), lo cual mantiene un epitelio intestinal sano y propicia mayor disponibilidad y absorción de nutrientes a través de las vellosidades intestinales (Moarrab *et al.*, 2016). De esta manera, la combinación de inulina y *L. casei* produjeron un efecto sinérgico y redujeron la población de coliformes e incrementaron la de lactobacilos.

Cuadro 4. Conteo de coliformes totales y lactobacilos en heces de corderos lactantes con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*

| Variable | Tratamientos (T) | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|--------------------|-------------------|------|--------|
| | Log ₁₀ UFC g ⁻¹ | | | EEM | P |
| T1 | T2 | T3 | | | |
| Coliformes totales | 6.18 ^a | 5.77 ^a | 5.07 ^b | 0.12 | 0.0001 |
| Lactobacilos | 5.79 ^b | 6.32 ^{ab} | 6.48 ^a | 0.16 | 0.02 |

T1) Testigo (Alimento preiniciador, AP); T2) AP + 2 % inulina; T3) AP + 2 % inulina + *L. casei*; EEM, Error estándar de la media; ^{a, b} Valores con distinta literal indican diferencias ($P \leq 0.05$).

Incidencia de diarreas

En el presente estudio el 46.7 % de los corderos del grupo testigo presentaron diarrea, en comparación con el 20 % observado en los corderos del T3, durante los periodos 2 y 3. Esto se relaciona a la transición de pre-rumiante a rumiante (Nemati *et al.*, 2015), durante la cual los corderos se alimentan de leche materna principalmente; sin embargo, al disminuir la producción láctea al avanzar la lactancia, propicia la ingestión de alimento sólido en los corderos para

satisfacer los requerimientos, pero esto puede ser causa de alteraciones en la flora intestinal y conduce a la presencia de diarreas mecánicas.

Por lo tanto, es importante que los corderos reciban alimentación sólida a temprana edad, con la finalidad que se establezca y adapte la flora ruminal (Liu *et al.*, 2017) y reducir el estrés ocasionado por el cambio abrupto de alimentación (Hernández-Castellano *et al.*, 2014a, 2014b; Abecia *et al.*, 2014), de lo contrario hormonas glucocorticoides liberadas por el estrés ocasionarán una disminución en el consumo de MS y como resultado causarán baja tasa de crecimiento en los corderos (Ali *et al.*, 2015), y aumentará la susceptibilidad a patógenos causantes de diarreas.

La administración de probióticos y prebióticos evaluada en este estudio se pudo relacionar con la estimulación del sistema inmune (Hemarajata y Versalovic, 2013), disminución del estrés, prevención de diarreas (Sánchez *et al.*, 2017), y con ello garantizar un crecimiento saludable en los corderos; aunque los resultados pueden variar por factores como prácticas de alimentación, manejo y edad al destete de los corderos (Chai *et al.*, 2015; Hernández-Castellano *et al.*, 2015a; Freitas y Ungerfeld, 2016).

Cuadro 5. Incidencia de diarreas (%) en corderos lactantes con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*

| <i>Periodos (14 d)</i> | Tratamientos (T) | | |
|------------------------|------------------|-----------|-----------|
| | T1 (n=15) | T2 (n=15) | T3 (n=15) |
| 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 6.7 | 20 | 13.3 |
| 3 | 40.0 | 13.3 | 6.7 |
| 4 | 0 | 0 | 0 |

T1) Testigo (Alimento preiniciador, AP); T2) AP + 2 % inulina; T3) AP + 2 % inulina + *L. casei*.

En este sentido, la menor incidencia de diarreas se debe a la actividad probiótica de *L. casei* en la disminución de coliformes totales mediante exclusión competitiva; adicionalmente, al efecto prebiótico de la inulina en las células caliciformes, las cuales producen moco y forman una capa viscosa en el revestimiento epitelial intestinal, la cual limita la adhesión de enteropatógenos (Steed y Macfarlane, 2009); además de modular la composición de la flora intestinal con el

aumento en la población de lactobacilos y estimula el sistema inmunológico (Awad *et al.*, 2013; Provenza y Villalba, 2010).

Variables hematológicas

Los resultados de los variables hematológicas en los corderos con adición de inulina y *L. casei* no presentaron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos (Cuadro 6). Los valores medios de las variables hematológicas se encuentran en el intervalo fisiológico reportado en la literatura para la especie ovina (Kaneko *et al.*, 2008).

Cuadro 6. Variables hematológicas de corderos lactantes con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*

| <i>Variable</i> | Tratamientos (T) | | | | |
|---|------------------|--------|--------|-------|------|
| | T1 | T2 | T3 | EEM | P |
| Eritrocitos, 10^6 mL^{-1} | 5.06 | 4.91 | 4.92 | 0.16 | 0.76 |
| Hemoglobina, g dL^{-1} | 12.95 | 11.93 | 13.64 | 0.62 | 0.16 |
| Hematocrito, % | 25.65 | 24.51 | 24.53 | 0.71 | 0.43 |
| M.C.V., fl | 50.71 | 50.00 | 49.94 | 0.31 | 0.17 |
| M.H.C., pg | 49.93 | 48.33 | 50.53 | 1.83 | 0.68 |
| M.H.C.H., g dL^{-1} | 25.33 | 26.92 | 25.23 | 1.00 | 0.42 |
| Plaquetas, $\text{mil } \mu\text{L}^{-1}$ | 260.33 | 349.75 | 285.08 | 27.14 | 0.06 |
| Leucocitos, 10^3 mL^{-1} | 46.39 | 51.97 | 51.99 | 9.63 | 0.89 |
| Linfocitos, % | 70.77 | 71.26 | 62.01 | 3.99 | 0.19 |
| Monocitos, % | 5.30 | 4.86 | 3.16 | 0.74 | 0.11 |
| Segmentados, % | 18.02 | 14.32 | 19.83 | 3.53 | 0.53 |
| Basófilos, % | 1.34 | 1.40 | 1.32 | 0.05 | 0.53 |
| Eosinofilos, % | 0.80 | 1.13 | 1.62 | 0.26 | 0.10 |

T1) Testigo (Alimento preiniciador, AP); T2) AP + 2 % inulina; T3) AP + 2 % inulina + *L. casei*; EEM, Error estándar de la media.

Las variables hematológicas reportadas en la literatura son inconsistentes con el uso de inulina y cepas probióticas, ya que existen estudios realizados en cabritos (Kara *et al.*, 2012) y corderos en crecimiento (Kazemi-Bonchenari *et al.*, 2013) en los que no se reportan cambios; mientras que Sarwar *et al.* (2011), Hossein-Ali *et al.* (2014) y Hussein (2014) informan incrementos en hemoglobina, hematocrito y eritrocitos en corderos alimentados con probióticos. Bularon y Plata (2017) reportan aumento en el recuento de leucocitos en cabritos con el uso de probióticos. Las variables hematológicas son afectadas por la edad del animal (Antunović *et al.*, 2012; Ashour *et al.*, 2015); por factores ambientales, durante el procesamiento de la muestra, o por características y manejo del animal (Njidda *et al.*, 2014). En el presente estudio, el estado de salud de los corderos fue saludable.

Metabolitos séricos

En general, las concentraciones séricas de colesterol, glucosa, proteína total, albumina y globulinas en los corderos después del nacimiento no presentaron diferencias ($P > 0.05$) y al destete, tampoco hubo diferencias, con excepción de la concentración sérica de colesterol, la cual disminuyó ($P \leq 0.05$) 11.6 y 13.3 % en los corderos del T2 y T3, respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Metabolitos sanguíneos en corderos con adición de inulina y *Lactobacillus casei* al inicio y final de la lactancia

| <i>Variable</i> | | Tratamientos (T) | | | | |
|------------------------------------|---------------|--------------------|---------------------|--------------------|------|------|
| | | T1 | T2 | T3 | EEM | P |
| Colesterol, mg dL ⁻¹ | <i>Inicio</i> | 105.32 | 98.75 | 96.58 | 6.54 | 0.62 |
| | <i>Final</i> | 79.33 ^a | 70.07 ^{ab} | 68.76 ^b | 2.70 | 0.01 |
| Glucosa, mg dL ⁻¹ | <i>Inicio</i> | 86.35 | 83.82 | 91.80 | 3.45 | 0.25 |
| | <i>Final</i> | 71.75 | 73.90 | 75.26 | 1.05 | 0.07 |
| Proteína total, g dL ⁻¹ | <i>Inicio</i> | 6.96 | 7.10 | 6.71 | 0.25 | 0.54 |
| | <i>Final</i> | 6.65 | 7.06 | 6.84 | 0.15 | 0.19 |
| Albumina, g dL ⁻¹ | <i>Inicio</i> | 2.53 | 2.51 | 2.68 | 0.91 | 0.34 |
| | <i>Final</i> | 3.24 | 3.16 | 3.08 | 0.06 | 0.25 |
| Globulinas, g dL ⁻¹ | <i>Inicio</i> | 4.42. | 4.58 | 4.02 | 0.24 | 0.26 |
| | <i>Final</i> | 3.40 | 3.90 | 3.75 | 0.15 | 0.07 |

T1) Testigo (Alimento preiniciador, AP); T2) AP + 2 % inulina; T3) AP + 2 % inulina + *L. casei*; EEM, Error estándar de la media; ^{a, b} Valores con distinta literal indican diferencias ($P \leq 0.05$).

Los valores de los metabolitos séricos determinados en el presente estudio se encuentran en el intervalo para corderos lactantes (Tsiligianni *et al.*, 2012; Chai *et al.*, 2015). La ausencia de efectos en la concentración sérica de glucosa, proteína total, albumina y globulinas, es consistente con otros estudios en corderos lactantes (El-Katcha *et al.*, 2016; Saleem *et al.*, 2017) y corderos en crecimiento (Kazemi-Bonchenari *et al.*, 2013) con el uso de prebióticos y probióticos. En contraste, Abdel-Salam *et al.* (2014) y Hussein (2014) informan mayor concentración en proteína total, albumina y globulinas; no obstante, Hossein-Ali *et al.* (2014) reportan disminución en la concentración de estos metabolitos. Estas diferencias en los resultados de las concentraciones séricas de los metabolitos reportados en la literatura y lo obtenido en el presente estudio se debe a factores nutricionales, tipo de prebiótico o probiótico (dosis, tiempo de administración) características de los corderos (raza, sexo, edad, estado de salud).

En el destete, se observó una disminución ($P \leq 0.05$) en la concentración de colesterol sérico en los corderos, este resultado es congruente con lo reportado por Moarrab *et al.* (2016) al incluir una mezcla de inulina y *Enterococcus faecium* en corderos lactantes. La reducción en la concentración de este metabolito se atribuye al efecto hipocolesterolémico de la inulina y desconjugación de ácidos biliares por las bacterias probióticas (Anandharaj *et al.*, 2014), en consecuencia, son menos solubles, se reduce su absorción en el intestino y disminuye su concentración en sangre (Yoo y Kim, 2016). Abas *et al.* (2007) reporta que los ácidos grasos de cadena corta también disminuyen el nivel de colesterol sérico.

En los rumiantes, debido a la naturaleza histológica de la placenta (Haeger *et al.*, 2016) los corderos nacen hipogammaglobulinémicos (Hernández-Castellano *et al.*, 2014a), por lo anterior, es necesario una ingesta de calostro de 180 a 210 mL kg⁻¹ PV o bien recibir 10% de su PV durante las primeras 4 h posparto para transferir inmunidad pasiva (Hernandez-Castellano *et al.*, 2015a; Dwyer *et al.*, 2016); de lo contrario, se reduce su absorción a partir de las 6 h posparto (Alves *et al.*, 2015). La transferencia de inmunidad pasiva puede evaluarse a través de la concentración sérica de proteína total (Tsiligianni *et al.*, 2012, Nagyová *et al.*, 2017). Ahmad *et al.* (2000) propusieron que niveles séricos de proteína total menores a 5 g dL⁻¹ se consideran como un indicador de hipogammaglobulinemia.

En el presente estudio, de acuerdo a la concentración sérica de proteína total (Cuadro 7) indica que el calostro ingerido en las primeras horas del nacimiento transfirió inmunidad pasiva a los corderos; adicionalmente, aportó factores de crecimiento y nutrientes como grasa, lactosa, vitaminas y minerales (Banchero *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

El aporte de inulina y *Lactobacillus casei* favoreció la ganancia de peso en los corderos durante la lactancia; asimismo, redujo la población de coliformes, incidencia de diarreas y la concentración de colesterol sérico. La adición de prebióticos y probióticos en el período previo al destete es importante, porque mejora el estado de salud del animal, el crecimiento y reduce el estrés al destete.

LITERATURA CITADA

- Abas I., Kutay H. C., Kahraman R., Toker N. Y., Ozcelik D., Ates F., Kacakci A. 2007. Effects of organic acid and bacterial direct-fed microbial on fattening performance of Kivircik-maale yearling lambs. *Pak J Nutr* 6: 149-154.
- Abdel-Salam A. M., Zeitoun M. M., Abdelsalam M. M. 2014. Effect of synbiotic supplementation on growth performance, blood metabolites, insulin and testosterone and wool traits of growing lambs. *J. Biol. Sci.* 14(4): 292-298.
- Ahmad R., Khan A., Javed M. T., Hussain I. 2000. The level of immunoglobulins in relation to neonatal lamb mortality in Pak-Karakul sheep. *Vet. Arhiv.* 70: 129-139.
- Ali M. H., Norouzian M. A., Khadem A. A. 2015. Performance and measures of stress in lambs weaned at 45 and 90 days. *Iran J. Appl. Anim. Sci.* 4(5). 981-985.
- Allen H. K., Levine U. Y., Looft T., Bandrick M., Casey T. A. 2013. Treatment, promotion, commotion: Antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends. Microbiol.* 21(3): 114-119.
- Alves A. C., Alves N. G., Ascari I. J., Junqueira F. B., Coutinho A. S., Lima R. R., Pérez J. R. O., De Paula S. O., Furusho-Garcia I. F., Abreu L. R. 2015. Colostrum composition of Santa Inês sheep and passive transfer of immunity to lambs. *J. Dairy Sci.* 98: 3706-3716.
- Anandharaj M., Sivasankari B., Rani R. P. 2014. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: A review. *Chinese J. Biol.* 1-7.

- Angelakis E. 2017. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microb. Pathogenesis* 106: 162-170.
- Antunović Z., Šperanda M., Senčić D., Novoselec J., Steiner Z., Djidara M. 2012. Influence of age on some blood parameters of lambs in organic production. *Maced. J. Anim. Sci.* 2(1): 11-15.
- Antunović Z., Šperanda M., D. Amidžić D., Šerić V., Steiner Z., Domaćinović M., Boli F. 2006. Probiotic application in lambs nutrition. *Krmiva* 4: 175-180.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemist. 2005. Official methods of analysis, 18 ed. AOAC, Washington, DC. USA.
- Ashour G., Ashmawy N. A., Dessouki S. M., Shihab O. H. 2015. Blood hematology, metabolites and hormones in newborn sheep and goat from birth to weaning. *Int. J. Adv. Res.* 3(7): 1377-1386.
- Ataşoğlu C., Akbağ H. I., Tölü C., Daş G., Savaş T., Yurtman I. Y. 2010. Effects of kefir as a probiotic source on the performance of goat kids. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 40 (4): 363-370.
- Awad W. A., Ghareeb K., Paßlack N., Zentek J. 2013. Dietary inulin alters the intestinal absorptive and barrier function of piglet intestine after weaning. *Res. Vet. Sci.* 95(1): 249-54.
- Banchero G.E., Milton J. T. B., Lindsay D. R., Martin G. B., Quintans G. 2015. Colostrum production in ewes: a review of regulation mechanisms and of energy supply. *Animal* 9(5): 831-837.
- Bularon S. C., Plata S. E. 2017. Effect of probiotic supplementation on weight gain, blood biochemical and hematological indices of crossbred dairy goat kids. *Glo. Adv. Res. J. Agric. Sci.* 6(5): 128-133.
- Carranza O. C., Ávila F. A., Bustillo A. G. R., López-Munguía A. 2015. Processing of fructans and Oligosaccharides from Agave Plants. In: Preedy R. V. (ed). *Processing and Impact on Active Components in Food*. 1^a ed. Academic Press, USA. pp: 121-129.
- Castro N., Capote J., Bruckmaier R. M., Argüello A. 2011. Management effects on colostrogenesis in small ruminants: a review. *J. Appl. Anim. Res.* 39(2): 85-93.
- Chai J., Diao Q., Wang H., Tu Y., Tao X., Zhang N. 2015. Effects of weaning age on growth, nutrient digestibility and metabolism, and serum parameters in Hu lambs. *Anim. Nutr.* 1: 344-348.

- Chatzopoulos D. C., Sarrou S., Vasileiou N. G. C., Ioannidi K. S., Peteinaki E., Valiakos G., Tsokana C. N., Papadopoulos E., Spyrou V., Mavrogianni V. S., Giannakopoulos A., Sbiraki A., Lacasta D., Buesog J. P., Athanasiou L. V., Billinis C., Fthenakis G. C. 2016. Dissemination of intestinal pathogens between lambs and puppies insheep farms. *Small Ruminant Res.* 141: 5-10.
- Chigerwe M., Hagey J. V. 2014. Refractometer assessment of colostral and serum IgG and milk total solids concentrations in dairy cattle. *BMC Vet. Res.* 10:178.
- Corner R. A., Kenyon P. R., Stafford J. K., West D. M., Oliver M. H. 2006. The effect of mid-pregnancy shearing or yarding stress on ewe post-natal behaviour and the birth weight and post-natal behaviour of their lambs. *Livest. Sci.* 102: 121-129.
- Corner R. A., Kenyon P. R., Stafford K. J., West D. M., Oliver M. H. 2007. The effect of mid-pregnancy shearing and litter size on lamb birth weight and post-natal plasma cortisol response. *Small Ruminant Res.* 73: 115-121.
- de Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 130-135.
- De Brito F. G., Ponnampalam N. E., Hopkins L. D. The effect of extensive feeding systems on growth rate, carcass traits, and meat quality of finishing lambs. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 16: 23-38.
- Dicks L. M. T., Botes M. 2010. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Benef. Microb.* 1(1): 11-29.
- Dwyer C. M., Conington J., Corbiere F., Holmøy I. H., Muri K., Nowak R., Rooke J., Vipond J., Gautier J. M. 2016. Invited review: Improving neonatal survival in small ruminants: science into practice. *Animal* 10(3): 449-459.
- Dwyer C. M., Morgan C. A. 2006. Maintenance of body temperature in the neonatal lamb: Effects of breed, birth weight, and litter size. *J. Anim. Sci.* 84: 1093-1101.
- El-Loly M. M., Mansour A. I. A. 2013. Relationship between the values of density and immunoglobulin concentrations of buffalo's colostrum and their thermal stability. *J. Med. Sci.* 13: 723-729.
- El-Katcha M. I., Soltan M. A., Essi M. S. 2016. Effect of *Pediococcus* spp. supplementation on growth performance, nutrient digestibility and some blood serum biochemical changes of fattening lambs. *Alex. J. Vet. Sci.* 49(1): 44-54.

- Ewaschuk J. B., Naylor J. M., Chirino-Trejo M., Zello G. A. 2004. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential pro-biotic for calves. Canadian J. Vet. Res. 68: 249-253.
- Fleenor W. A., Stott G. H. 1980. Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. J. Dairy Sci. 63: 973-977.
- Founou L. L., Founou R. C., Essack S. Y. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective. Front. Microbiol. 7: 1881.
- Freitas M. A., Ungerfeld R. 2016. Artificial weaning in sheep: stress response and animal welfare. Review. Rev. Mex. Cienc. Pec. 7(3): 361-375.
- Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int. J. Food Microbiol. 141: S15-S28.
- García, E. 2004. Modificación al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4^a ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 217 p.
- Gökce E., Kırmızıgül A. H., Erdogan H. M., Cital M. 2013a. Risk factors associated with passive immunity, health, birth weight and growth performance in lambs: I. Effect of dam health status and parity, birthweight, gender, type of birth and lambing season on morbidity and mortality. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 19 (Suppl. A): A153-A160.
- Gökce E., Atakisi O., Kırmızıgül A. H., Erdogan H. M. 2013b. Risk factors associated with passive immunity, health, birth weight and growth performance in lambs: II. Effects of passive immunity and some risk factors on growth performance during the first 12 weeks of life. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 19: 619-627.
- Gökce E., Atakisi O., Kırmızıgül A. H., Unver A., Erdogan H. M. 2014. Passive immunity in lambs: serum lactoferrin concentrations as a predictor of IgG concentration and its relation to health status from birth to 12 weeks of life. Small Ruminant Res. 116: 219-228.
- Gupta M., Khan N., Rastogi A., ul Haq Z., Varun T. K. 2016. Nutritional drivers of rumen development: A review. Agr. Rev. 37(2): 148-153.
- Haeger J-D., Hambruch N., Pfarrer C. 2016. The bovine placenta *in vivo* and *in vitro*. Theriogenology 86: 306-312.
- Hajati H., Rezaei M. 2010. The application of probiotics in poultry production. Int. J. Poultry Sci. 9: 298-304.

- Hassan N., Sheikh G. N., Hussian S. A., Nazir G. 2014. Variation in clinical findings associated with neonatal colibacillosis in lambs before and after treatment. *Vet. World* 7(4): 262-265.
- Hemarajata P., Versalovic J. 2013. Effects of probiotics on gut microbiota: Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 6:39-51.
- Hernández-Castellano L. E., Almeida A. M., Castro N., Arguello A. 2014a. The colostrum proteome, ruminant nutrition and immunity: A review. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15:64-74.
- Hernández-Castellano L. E., Almeida A. M., Ventosa M., Coelho A.V., Castro N., Argüello A. 2014b. The effect of colostrum intake on blood plasma proteome profile in newborn lambs: low abundance proteins. *BMC Vet. Res.* 10: 85.
- Hernández-Castellano L. E., Moreno-Indias I., Morales-de la Nuez A., Sánchez-Macías D., Torres A., Capote J., Argüello A., Castro N. 2015a. The effect of milk source on body weight and immune status of lambs. *Livest. Sci.* 175: 70-76.
- Hernández-Castellano L. E., Suárez-Trujillo A., Martell-Jaizme D., G. Cugno G., Argüello A., Castro N. 2015b. The effect of colostrum period management on BW and immune system in lambs: from birth to weaning. *Animal* 9(10): 1672-1679.
- Hosseini-Ali A., Mashhadi E. A., Rezaeian M., Mohtasebi M. 2014. Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*-based probiotic on performance, hematological parameters and blood metabolites in lambs. *Int. J. Food Nutr. Sci.* 3(4): 8-15.
- Hussein A. F. 2014. Effect of biological additives on growth indices and physiological responses of weaned Nadji ram lambs. *J. Exp. Biol. Agr. Sci.* 2(6): 597-607.
- Kaneko J. J, Harvey J. W., Bruss M. L. 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6^a ed. Academic Press, USA. 904 p.
- Kara C., Orman A., Gencoglu H., Kovanlikaya A., Meral Y., Cetin I., Yıbar A., Kasap S., Turkmen I., Deniz G. 2012. Effects of inulin supplementation on selected faecal characteristics and health of neonatal Saanen kids sucking milk from their dams. *Animal* 6(12): 1947-1954.
- Kazemi-Bonchenari M., Ghasemi H. A., Khodaei-Motlagh M., Khaltabadi-Farahani A. H., Ilani M. 2013. Influence of feeding synbiotic containing *Enterococcus faecium* and inulin on blood metabolites, nutrient digestibility and growth performance in sheep fed alfalfa-based diet. *Sci. Res. Essays* 8(21): 853-857.

- Liu J., Bian G., Sun D., Zhu W., Mao S. 2017. Starter feeding supplementation alters colonic mucosal bacterial communities and modulates mucosal immune homeostasis in newborn lambs. *Front. Microbiol.* 8: 429.
- Malmuthuge N., Griebel P. J., Guan L. L. 2015. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Front. Vet. Sci.* 2(36): 1-10.
- Martella V., Decaro N., Buonavoglia C. 2015. Enteric viral infections in lambs or kids. *Vet. Microbiol.* 181: 154-160.
- Meale S. J., Li S. C., Azevedo P., Derakhshani H., DeVries T. J., Plaizier J. C. Steele M. A., Khafipour E. 2017. Weaning age influences the severity of gastrointestinal microbiome shifts in dairy calves. *Sci. Rep.* 7(198): 1-13.
- Mellor D. J., Stafford K. J. 2004. Animal welfare implications of neonatal mortality and morbidity in farm animals. *Vet. J.* 168: 118-133.
- Messaoudi S., Manai M., Kergourlay G., Prévost H., Connil N., Chobert J. M., Dousset X. 2013. Review: *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiol.* 36: 296-304.
- Minetti, C., Taweanan, W., Hogg, R., Featherstone, C., Randle, N., Latham, S.M., Wastling, J. M., 2014. Occurrence and diversity of *Giardia duodenalis* assemblages in livestock in the UK. *Transbound. Emerg. Dis.* 61: 60-67.
- Moarrab A., Ghoorchi T., Ramezanzpour S., Ganji F., Koochakzadeh A. R. 2016. Effect of synbiotic on performance, intestinal morphology, fecal microbial population and blood metabolites of suckling lambs. *Iran J. Appl. Anim. Sci.* 6(3): 621-628.
- Mohammed H. H., El-Sayed B. W., Ali M. A. 2013. Effect of commercial feed additives on performance, economic efficiency, blood metabolites and some behaviour in goats. *J. Vet. Anim. Sci Med Diagn.* 2: 2.
- Musa H. H., Wu S. L., Zhu C. H., Seri H. I., Zhu G. Q. 2009. The potential benefits of probiotics in animal production and health. *J. Anim. Vet. Adv.* 8(2): 313-321.
- Nagyová V., Tóthová C., Nagy O. 2017. The impact of colostrum intake on the serum protein electrophoretic pattern in newborn ruminants. *J. Appl. Anim. Res.* 45(1): 498-504.

- Nemati M., Amanlou H., Khorvash M., Moshiri M. M., Khan M. A., Ghaffari M. H. 2015. Rumen fermentation, blood metabolites, and growth performance of calves during transition from liquid to solid feed: Effects of dietary level and particle size of alfalfa hay. *J. Dairy Sci.* 10: 7131-7141.
- Njidda A. A., Shuai'bu A. A., Isidahomen C. E. 2014. Haematological and serum biochemical indices of sheep in semi-arid environment of northern Nigeria. *Global J. Sci. Frontier Res: D Agric. Vet.* 14 (2): 48-56.
- Pringsulaka O., Rueangyotchanthana K., Suwannasai N., Watanapokasin N., Amnueysit P, Sunthornthummas S., Sukkhumet S., Sarawaneeyaruk S., Rangsiruji A. 2015. *In vitro* screening of lactic acid bacteria for multi-strain probiotics. *Livest. Sci.* 174: 66-73.
- Provenza F. D., Villalba J. J. 2010. The role of natural plant products in modulating the immune system: An adaptable approach for combating disease in grazing animals. *Small Ruminant Res.* 89:131-139.
- Roa I., Smok S. C., Prieto G. R. 2012. Placenta; compared anatomy and histology. *Int. J. Morphol.* 30(4): 1490-1496.
- Roberfroid M., Gibson R. G, Hoyles L., McCartney L. A, Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M-J., Léotoing L., Wittrant Y., Delzenne M. N., Cani D. P., Neyrinck M. A., Agnes Meheust A. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104(2):1-63.
- Russell K. E., Roussel A. J. 2007. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 23(3): 403-426.
- Saleem A. M., Zounouny A. I., Singer A. M. 2017. Growth performance, nutrients digestibility, and blood metabolites of lambs fed diets supplemented with Probiotics during pre- and post-weaning period. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 30: 523-530.
- Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenco A., Gueimonde M., Margolles A. 2017. Probióticos, microbiota intestinal, y su influencia en la salud y la enfermedad del huésped. 2017. *Mol. Nutr. Food Res.* 61(1).
- Sarwar M., Shahzad M. A., Farooq M. K., Nisa M. 2011. Performance of growing lambs receiving altered plant protein sources with or without probiotics. *IPCBE.* 13: 139-144.
- SAS. 2013. SAS/STAT User's Guide (9.4) Cary NC, USA: SAS Inst. Inc.

- Tsiligianni Th., Dovolou E., Amiridis G. S. 2012. Efficacy of feeding cow colostrum to newborn lambs. *Livest. Sci.* 149: 305-309.
- Sun P., Wang J. Q., Zhang H. T. 2010. Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. *J. Dairy Sci.* 93:5851-5855.
- Yang R., Jacobson C., Gordon C., Ryan U. 2009. Prevalence and molecular characterisation of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. *Vet. Parasitol.* 16: 19-24.
- Yang R., Jacobson C., Gardner G., Carmichael I., Campbell A.J., Ryan U. 2014. Longitudinal prevalence, faecal shedding and molecular characterisation of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* enterica in sheep. *Vet. J.* 202: 250-254.
- Yoo J. Y., Kim S. S. 2016. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients* 8(173): 1-20.
- Zhang S., Regnault T. R. H., Barker P. L., Botting K. J., McMillen I. C., McMillan C. M., Roberts C. T., Morrison J. J. 2015. Placental adaptations in growth restriction. *Nutrients* 7: 360-389.

**CAPÍTULO III. EFECTO DE INULINA Y *Lactobacillus casei* EN EL
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO, PARAMETROS HEMATOLÓGICOS Y
METABOLITOS SANGUÍNEOS EN CORDEROS DESTETADOS**

**EFFECT OF INULIN AND *Lactobacillus casei* ON THE PRODUCTIVE
PERFORMANCE, HEMATOLOGICAL VARIABLES AND BLOOD METABOLITES
IN WEANED LAMBS**

Marco Antonio Ayala-Monter, David Hernández-Sánchez, Rene Pinto-Ruiz, Sergio S. González-
Muñoz, José R. Bárcena-Gama, Omar Hernández-Mendo, Nicolás Torres-Salado

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto prebiótico de la inulina de *Agave tequilana* y *Lactobacillus casei* en la respuesta productiva, variables hematológicas y metabolitos sanguíneos en corderos destetados. Se utilizaron 30 corderos machos recién destetados (Katadhin x Dorset, 20.6 ± 0.2 kg PV), asignados en tres tratamientos (T): T1, Dieta basal (DB); T2, DB + 2 % inulina y T3 DB + 2 % inulina + *L. casei*. Se estimó la ganancia diaria de peso (GDP), el consumo de MS (CMS) y se evaluó la consistencia fecal diariamente. Al final del experimento, se recolectaron muestras fecales para conteo de coliformes totales y lactobacilos; además, se evaluaron variables hematológicas y metabolitos sanguíneos. El diseño fue completamente al azar, se realizó un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) en las variables productivas. Respecto a variables hematológicas, el porcentaje de basófilos aumentó ($P \leq 0.05$) con la adición de inulina y *L. casei* (0.17^b , 0.32^{ab} y 0.45^a % para T1, T2 y T3). La población de coliformes totales en heces fue mayor ($P \leq 0.05$) en el grupo testigo (8.58^a , 7.19^b y 6.51^b Log₁₀ UFC g⁻¹, T1, T2, T3) y la población de lactobacilos aumentó ($P \leq 0.05$) con inulina y *L. casei* (9.02^b , 9.88^a y 10.26^a Log₁₀ UFC g⁻¹, T1, T2 y T3). La concentración de colesterol sérico disminuyó ($P \leq 0.05$) 10 y 7 % en T3 y T2, con respecto al grupo testigo. La inulina de agave y *L. casei* mejoran la población de bacterias probióticas en tubo digestivo, células del sistema inmune y disminuyen la incidencia de diarreas, sin afectar el consumo de MS y la ganancia de peso de los corderos.

Palabras clave: Inulina, diarreas, lactobacilos, coliformes, heces, antibióticos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the prebiotic effect of *Agave tequilana* inulin and *Lactobacillus casei* on animal performance, hematological variables and serum metabolites in weaned lambs. Thirty weaned male lambs (Katadhin x Dorset, 20.6 ± 0.2 kg PV) were used, assigned in three treatments (T): T1, Basal diet (BD); T2, BD + 2 % inulin and T3 BD + 2 % inulin + *L. casei*. Daily weight gain (DWG), dry matter intake (DMI) and daily fecal consistency were evaluated. At the end of the experiment phase, fecal samples were collected to determine total coliforms and lactobacilli population; in addition, hematological variables and blood metabolites were estimated. The experimental design was completely randomized, an ANDEVA was performed and the means of the treatments were compared with the Tukey test. There were no differences ($P > 0.05$) in animal performance variables. Regarding in the hematological variables, the percentage of basophils were increased ($P \leq 0.05$) by inulin and *L. casei* (0.17^b, 0.32^{ab} and 0.45^a % for T1, T2 and T3, respectively). Coliform population was higher ($P \leq 0.05$) in lambs of the control group (8.58^a, 7.19^b and 6.51^b Log₁₀ CFU g⁻¹, for T1, T2, T3, respectively) and lactobacillus population was increased ($P \leq 0.05$) by inulin and *L. casei* (9.02^b, 9.88^a and 10.26^a Log₁₀ UFC g⁻¹, for T1, T2 and T3, respectively). Serum cholesterol concentration decreased ($P \leq 0.05$) 10 and 7 % in lambs of the T3 and T2 group, with respect to the control group. *Agave* inulin and *L. casei* improve the population of probiotic bacteria in the digestive tube, stimulate immune system cells and reduce the incidence of diarrhea, without affecting DMI and DWG of lambs.

Key words: Inulin, diarrhea, lactobacilli, coliforms, feces, antibiotics.

INTRODUCCIÓN

La mortalidad de los corderos después del destete representa una pérdida económica considerable en el sector ovino; por ello, el destete es considerado un período crítico en la vida de los corderos (Freitas y Ungerfeld, 2016); durante este tiempo inicia el establecimiento de la población microbiana ruminal y el cambio de dieta líquida a sólida desencadena problemas digestivos, particularmente diarreas, disminuyendo la respuesta productiva o muerte en los corderos (Malmuthuge *et al.*, 2015). Durante décadas, las diarreas han sido tratadas con antimicrobianos; sin embargo, debido a su prohibición (Maron *et al.*, 2013), se han buscado aditivos alimenticios para optimizar la utilización del alimento, mejorar la salud y el rendimiento animal. Ante este problema, los probióticos (Khalid *et al.*, 2011) y prebióticos como la inulina (Samanta *et al.*, 2013) son alternativas en la nutrición de pequeños rumiantes. Los probióticos mejoran la población microbiana ruminal, degradación de nutrientes, conversión alimenticia y sistema inmunológico (Abd El-Tawab *et al.*, 2016); además, tienen acción antagónica a enteropatógenos (Musa *et al.*, 2009). Por otro lado, los prebióticos reducen el nitrógeno amoniacal y aumentan la síntesis de proteína microbiana en rumen (Uyeno *et al.*, 2015), modulan la microflora intestinal (Samanta *et al.*, 2012) y reducen el colesterol (Yoo y Kim, 2016), lo que conduce a una mejor productividad y salud de los corderos (Allen *et al.*, 2013).

Se ha documentado el uso inulina de achicoria (*Cichorium intybus*) y alcachofa (*Helianthus tuberosus*) en terneros (Uyeno *et al.*, 2015); sin embargo, las investigaciones realizadas en pequeños rumiantes son escasas y no concluyentes (Kara *et al.*, 2012; Kazemi-Bonchenari *et al.*, 2013). En México, se obtiene inulina de especies de la familia *Agavaceae* (Carranza *et al.*, 2015); no obstante, en la literatura no se encontró información sobre su uso en corderos. Las investigaciones con inulina de agave se centran en estudios *in vitro* (Moreno-Vilet *et al.*, 2016) e *in vivo* (Alvarado-Loza *et al.*, 2009; Márquez-Aguirre *et al.*, 2016) con animales de laboratorio. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto prebiótico de la inulina de agave y *Lactobacillus casei* en la respuesta productiva, variables hematológicas, metabolitos sanguíneos en corderos destetados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La investigación se realizó en la Granja Experimental y en el Laboratorio de Nutrición Animal, pertenecientes al Posgrado de Ganadería del Colegio de Posgraduados, ubicado en Montecillo, Estado de México. El clima de la región es templado sub-húmedo con lluvias en verano, precipitación pluvial y temperatura media anual de 625 mm y 16 °C (García, 2004).

Corderos y manejo

Se utilizaron 30 corderos machos recién destetados (Katadhin x Dorset 20.6 ± 0.2 kg PV y 75 d de edad) alojados en jaulas metabólicas equipadas con comedero y bebedero. Previo al inicio de la fase experimental, se realizó tratamiento profiláctico con antiparasitario (Closantil® 5%, Closantel, 10 mg kg⁻¹ PV) y bacterina (Bobact® 8, 2.0 mL animal⁻¹). El manejo de los corderos y los procedimientos en el presente estudio se realizaron de acuerdo al: “Reglamento para el uso y cuidado de animales destinados a la Investigación en el Colegio de Postgraduados 02.11.16”.

Tratamientos

La dieta se formuló según los requerimientos nutricionales para corderos en finalización, estimando una ganancia de 300 g d⁻¹, 1.23 Mcal ENg kg⁻¹ MS (NRC, 2007). Los tratamientos (T) evaluados fueron: T1) Testigo (dieta basal); T2) Dieta basal + 2 % inulina y T3) Dieta basal + 2 % inulina + *Lactobacillus casei* (60 mL animal⁻¹ día⁻¹). Se utilizó la fuente de inulina Inulin Powder® (Bestground, Zapopan, Jalisco) aportada al 2 % con base en el consumo diario de materia seca, y la cepa probiótica *Lactobacillus casei* (10⁸ UFC mL⁻¹).

La dieta se caracterizó con base a su contenido de materia seca (95.9 %), cenizas (5.1 %), proteína cruda (15.8 %), extracto etéreo (2.6 %) de acuerdo a la metodología descrita por AOAC (2005), fibra detergente neutro (17.3 %) y fibra detergente ácido (8.0 %) mediante el analizador ANKOM (Ankom Technology Corp. A200, Fairport, NY, USA).

Comportamiento productivo

Los corderos fueron adaptados a las dietas por un periodo de 12 d y el tiempo de evaluación fue de 60 d. El alimento se ofreció a las 08:00 y 16:00 h y el agua *ad libitum*. El probiótico se administró vía oral usando una jeringa con cánula, y la inulina se mezcló en el alimento.

El consumo de materia seca (CMS, kg d⁻¹) fue calculado por diferencia entre el alimento ofrecido y rechazado diariamente; la ganancia diaria de peso (GDP, g d⁻¹) se determinó mediante el pesaje de los corderos al inicio del experimento y cada 15 días (7:00 h) obteniendo el promedio de tres días sucesivos; la conversión alimenticia se calculó como la relación entre el CMS/GDP.

Consistencia en heces

Durante todo el periodo de estudio (10:00 a.m.) se evaluó en cada cordero la consistencia de las heces con base a la escala adaptada del método descrito por Le Jambre *et al.* (2007): 1 = Normal (pellets), = Pellets comprimidos y pegajosos, 3 = Pastosas (suaves) y 4 = Acuosas (líquidas).

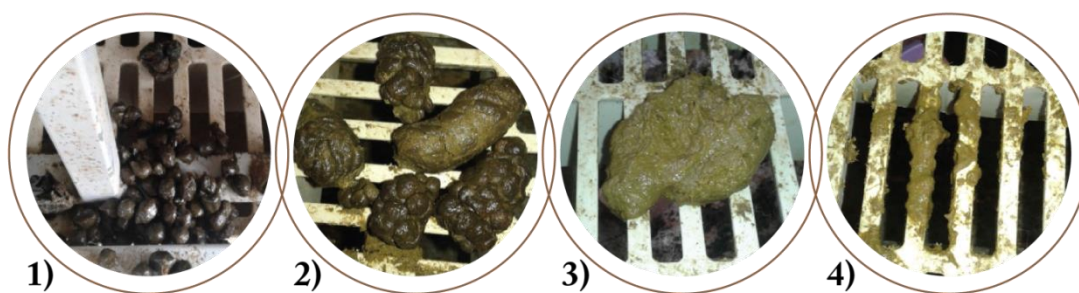


Figura 1. Consistencia en heces de corderos con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*.

Conteo microbiano (UFC g⁻¹) en heces

Al finalizar el experimento, a las 07:00 h se recogieron muestras de heces (10 g animal⁻¹) por estimulación rectal, con el uso de guantes de látex, se depositaron en vasos recolectores estériles y conservaron a 4 °C. De cada muestra se pesó 1 g y se colocó en un tubo Labcon que contenía 9 mL de solución peptonada (8.5%) y homogeneizaron, se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻¹², de cada dilución se sembraron 100 µL por estría en cajas Petri con agar Mac Conkey (coliformes totales) y MRS (lactobacilos) y se incubaron (RIOSSA, E-41, México) a 37 °C por 24 y 48 h, respectivamente; después se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y los datos se expresaron con la función logaritmo base 10 (log₁₀ UFC g⁻¹).

Esta fase experimental se trabajó en campana de flujo laminar (LABCONCO LOGIC A2, 800, USA) y el material se esterilizó en autoclave (LAB-MED, LMV40, México) a 121 °C y 15 psi durante 15 min.

Biometría hemática

Para evaluar las variables hematológicas y cambios en la concentración de los metabolitos sanguíneos, se recolectaron 5 mL de sangre, por venopunción de la vena yugular, en tubo con anticoagulante (BD Vacutainer® K2 EDTA) y 5 ml de sangre en tubo sin anticoagulante (BD Vacutainer®); las muestras se conservaron a 4 °C y se trasladaron al laboratorio para caracterizar las variables hematológicas (eritrocitos, hematocrito, hemoglobina y serie leucocitaria) utilizando un analizador hematológico automatizado (Sysmex, XS-1000i, Japón).

Metabolitos sanguíneos

Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron centrifugadas (SIGMA, 2-16k, Alemania) a 3500 x g durante 20 min, se separó el suero y se almacenó en tubos Eppendorf a -20 °C (SANYO, MDF-436, EUA) hasta su análisis. Se utilizaron kits comerciales SPINREACT® (Barcelona, España) y un espectrofotómetro de luz UV visible (CARY 1- E Varian, USA) para determinar la concentración de colesterol total (método enzimático oxidasa-peroxidasa, 505 nm); glucosa (método enzimático, 505 nm); proteína total (método biuret, 540 nm); albumina (método verde bromocresol, 630 nm) y la concentración de globulinas se calculó por diferencia entre la proteína total y albumina (Russel y Roussel, 2007).

Variables ruminales

Al finalizar el experimento, 3 h después de la alimentación, se extrajeron 50 mL de fluido ruminal vía esofágica. Las muestras se filtraron a través de una capa doble de gasas y se registró el pH con un potenciómetro (Thermo Scientific Star, A121, USA), posteriormente se depositaron 4 mL en un tubo Labcon con 1 mL de ácido metafosfórico al 25 % (v/v) y se conservaron a -20 °C hasta su análisis. La concentración de AGV y N-NH₃ se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Erwin *et al.* (1961) y McCollough (1967), respectivamente.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y 10 repeticiones. Los datos se analizaron usando PROC GLM (SAS, 2013) y las medias de tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. Para la variable consistencia en heces se utilizó la prueba Chi cuadrada y el conteo de microorganismos mediante la función log₁₀.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento productivo

La inclusión de inulina de agave en la dieta y *L. casei* no afectaron ($P > 0.05$) las variables productivas en los corderos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variables productivas de corderos con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*

| Variable | Tratamientos (T) | | | | |
|-----------------------------------|------------------|------|------|------|------|
| | T1 | T2 | T3 | EEM | P |
| Peso inicial, kg | 20.5 | 20.8 | 20.5 | 0.61 | 0.92 |
| Peso final, kg | 38.4 | 38.5 | 38.1 | 0.93 | 0.93 |
| Consumo de MS, kg d ⁻¹ | 1.09 | 1.07 | 1.03 | 0.01 | 0.98 |
| GDP, g d ⁻¹ | 286 | 289 | 286 | 0.02 | 0.22 |
| Conversión alimenticia | 4.05 | 4.06 | 3.83 | 0.15 | 0.46 |

T1) Testigo (dieta basal, DB); T2) DB+2% inulina; T3) DB +2% inulina+*L. casei*; EEM, Error estándar de la media. GDP, Ganancia diaria de peso;

Congruente con los resultados observados en este estudio, la ausencia de efectos en la ganancia diaria de peso y consumo de MS también fue reportada con la inclusión de inulina y *Enterococcus faecium* en la dieta de corderos en crecimiento (Kazemi-Bonchenari *et al.* 2013); en contraste, otros autores informan incrementos del 21.4 y 15.5 % en la ganancia de peso en corderos (Abdel-Salam *et al.*, 2014; El-Katcha *et al.*, 2016) y en el consumo de MS (Desnoyers *et al.*, 2009) con el uso de cepas probióticas. Esta variación con uso de probióticos en la respuesta productiva está en función del tipo de organismo, la dosis, tiempo de inclusión y edad de los corderos; además, de la capacidad del probiótico para adaptarse a las condiciones del tubo digestivo y competir con otros microorganismos (Mukhtar *et al.*, 2010; Khalid *et al.*, 2011). De esta manera, los probióticos que ejercen su efecto a nivel ruminal favorecen la degradación de nutrientes, y aumenta el consumo de MS (Desnoyers *et al.*, 2009); en contraste, géneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Bacillus*, son probióticos utilizados para colonizar regiones del tubo digestivo posterior y tienen como objetivo estabilizar la flora microbiana y reducir enteropatógenos (Gaggia *et al.*, 2010); en el presente estudio el uso de *Lactobacillus casei* no afectó el consumo de MS y la ganancia de peso en los corderos.

La inulina y *L. casei* no afectaron la conversión alimenticia; sin embargo, en estudios similares donde se incluyó inulina y probióticos, se reportan valores superiores (8.3, 7.4 y 9.5) para esta variable (Kazemi-Bonchenari *et al.*, 2013; Hossein-Ali *et al.*, 2014; Saleem *et al.*, 2017), y estas diferencias con los resultados del presente estudio se explican por cambios en la digestibilidad ruminal de los nutrientes y el suministro de estos en intestino delgado (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008; Uyeno *et al.*, 2015), características del animal, tipo de dieta, prebiótico y probiótico (Mousa *et al.*, 2012); además, factores ambientales y el manejo afectan la respuesta animal (Vlková *et al.*, 2009).

Conteo microbiano y consistencia en heces

La población de coliformes totales y lactobacilos en las heces se modificó ($P \leq 0.05$) con la inclusión de inulina y *L. casei* (Cuadro 2). En los corderos del grupo testigo, el conteo de coliformes fue mayor ($P \leq 0.05$) al compararse con el resto de los tratamientos; por otro lado, la población de lactobacilos aumentó ($P \leq 0.05$) en los corderos con adición de *L. casei* e inulina, este aumento se relacionó con la disminución de los coliformes totales e indica la capacidad de *L. casei* para colonizar en el tubo digestivo y ejercer su efecto probiótico.

Cuadro 2. Conteo de coliformes totales y lactobacilos en heces de corderos con adición de inulina de agave y *Lactobcillus casei*

| Variable | Tratamientos (T) | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------|------|--------|
| | Log ₁₀ UFC g ⁻¹ | | | | |
| | T1 | T2 | T3 | EEM | P |
| Coliformes totales | 8.58 ^a | 7.19 ^b | 6.51 ^b | 0.29 | 0.0002 |
| Lactobacilos | 9.02 ^b | 9.88 ^a | 10.26 ^a | 0.20 | 0.0019 |

T1) Testigo (dieta basal, DB); T2) DB + 2 % inulina; T3) DB + 2 % inulina+*L. casei*. EEM, Error estándar de la media; ^{a, b} Valores con distinta literal indican diferencias ($P \leq 0.05$).

Los resultados del presente estudio coinciden con lo reportado por otros autores, al incluir inulina y *E. faecium* en la dieta, observándose disminución en la población de enterobacterias y un aumento de lactobacilos (Moarrab *et al.*, 2016); en contraste, en otros estudios no encontraron cambios en la reducción de coliformes totales al administrar inulina (Kara *et al.*, 2012). No obstante, se ha documentado que la inulina favorece el desarrollo de microorganismos benéficos, los cuales incrementan la absorción de nutrientes a través de las vellosidades intestinales

(Moarrab *et al.*, 2016) e inhiben el crecimiento de enteropatógenos a través de la producción de bacteriocinas (Dicks y Botes 2010), ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y la disminución del pH en intestino (Pringsulaka *et al.*, 2015); lo anterior explica la reducción de coliformes totales con el aporte de inulina sola (T2) o en combinación con *L. casei* (T3).

Los corderos alimentados con *L. casei* e inulina presentaron mayor porcentaje (73.32 y 83.46 %, T2 y T3) de heces normales comparados con los corderos del grupo testigo (65.42 %) (Cuadro 3). Esta consistencia en las heces se relaciona con la digestión y absorción de nutrientes y por la disminución de enterobacterias; lo cual mejora la utilización de nutrientes generada por los lactobacilos (Zhao y Kim, 2015). Adicionalmente, la inulina ha sido caracterizada como fibra dietética y contribuye a mejorar la consistencia de las heces (Król, 2011), como ocurrió en los corderos del T2 y T3. Asimismo, las características de las heces son un indicador para conocer la gravedad y la presencia de diarreas en determinado momento y los corderos que presentaron la consistencia pastosa y líquida en heces, se puede relacionar con una ingesta mayor de alimento, lo que condujo a una diarrea mecánica, particularmente en el período posterior al destete, debido al cambio y composición en la dieta (Yang *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Consistencia fecal (%) de corderos con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*

| Tratamientos (T) | Consistencia fecal | | | |
|------------------|--------------------|-------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| T1 | 65.42 | 24.14 | 6.41 | 4.03 |
| T2 | 73.32 | 19.67 | 5.22 | 1.79 |
| T3 | 83.46 | 12.22 | 2.68 | 1.64 |

T1) Testigo (dieta basal, DB); T2) DB + 2 % inulina; T3) DB + 2 % inulina + *L. casei*. Consistencia fecal: 1= Normal (pellets), 2 = pellets comprimidos y pegajosos, 3 = pastosa (suave) y 4 = acuosa (líquida).

La consistencia normal de las heces observada en los corderos de los tratamientos T2 y T3 se relacionó con la disminución de coliformes totales e incremento de lactobacilos, y se debe al efecto prebiótico de la inulina (Moarrab *et al.*, 2016) y la acción probiótica de *L. casei* al inhibir el crecimiento de enteropatógenos (Musa *et al.*, 2009), propiciando menor incidencia de diarreas.

Variables hematológicas

Las variables hematológicas entre tratamientos obtenidos en el presente estudio fueron similares ($P > 0.05$) excepto para basófilos, donde el porcentaje fue superior ($P \leq 0.05$) en los corderos alimentados con inulina y *L. casei* en comparación con el grupo testigo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Variables hematológicas de corderos con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*

| Variable | Tratamientos (T) | | | | |
|---|-------------------|--------------------|-------------------|-------|-------|
| | T1 | T2 | T3 | EEM | P |
| Eritrocitos, 10^6 mL^{-1} | 6.80 | 6.64 | 6.63 | 0.39 | 0.21 |
| Hemoglobina, g dL^{-1} | 12.58 | 12.37 | 12.75 | 0.19 | 0.63 |
| Hematocrito, % | 28.03 | 28.05 | 27.85 | 0.93 | 0.75 |
| M.C.V., fl | 43.59 | 43.80 | 42.69 | 1.58 | 0.76 |
| M.H.C., pg | 20.00 | 19.83 | 20.24 | 0.06 | 0.89 |
| M.H.C.H., g dL^{-1} | 45.48 | 44.70 | 46.77 | 1.09 | 0.10 |
| Plaquetas, $\text{mil } \mu\text{L}^{-1}$ | 221.00 | 253.50 | 250.80 | 25.71 | 0.13 |
| Leucocitos, 10^3 mL^{-1} | 29.48 | 25.10 | 37.43 | 6.18 | 0.07 |
| Linfocitos, % | 34.65 | 33.19 | 38.08 | 4.29 | 0.15 |
| Monocitos, % | 7.61 | 6.18 | 7.33 | 1.04 | 0.90 |
| Segmentados, % | 56.56 | 59.50 | 53.15 | 3.80 | 0.06 |
| Basófilos, % | 0.17 ^b | 0.32 ^{ab} | 0.45 ^a | 0.08 | 0.003 |
| Eosinofilos, % | 1.01 | 0.79 | 0.97 | 0.17 | 0.65 |

T1) Testigo (dieta basal, DB); T2) DB + 2 % inulina; T3) DB + 2 % inulina + *L. casei*; EEM, Error estándar de la media; ^{a, b} Valores con distinta literal difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos en el presente estudio se obtuvieron a partir de corderos clínicamente sanos y se encuentran dentro del intervalo fisiológico normal reportado en la literatura para la especie ovina (Kaneko *et al.*, 2008), y permiten conocer la deficiencia de nutrientes, estado fisiológico y salud de los corderos (NseAbasi *et al.*, 2014).

Los datos reportados en la literatura son variables, algunos estudios reportan incrementos en hemoglobina, hematocrito y eritrocitos (Hosseini-Ali *et al.*; 2014; Hussein, 2014) con el uso de probióticos; en contraste, otros autores no reportan cambios en variables hematológicas al incluir inulina (Kara *et al.*, 2012; Kazemi-Bonchenari *et al.*, 2013).

Adicionalmente, las variables hematológicas son afectadas por la edad del animal (Antunović *et al.*, 2012; Ashour *et al.*, 2015); por factores ambientales, durante el procesamiento de la muestra, o por características y manejo del animal (Njidda *et al.*, 2014). La ausencia de efectos en las variables hematológicas de los corderos, se puede deber a que la dieta cubrió los requerimientos nutricionales; en consecuencia, no se presentó alguna deficiencia de nutrientes que afecte la fisiología del animal.

La respuesta en el aumento de basófilos en corderos que recibieron inulina y *L. casei* también se observó en terneros alimentados con una mezcla de probióticos (Agazzi *et al.*, 2014) y se explica por el efecto generado por los prebióticos y probióticos al estimular el sistema inmunológico (Gaggia *et al.*, 2010) a través de la producción de citocinas por los macrófagos para combatir infecciones (Dicks y Botes, 2010; Galapero *et al.*, 2015) e implica mejora en la salud y mayor rendimiento en los corderos (Allen *et al.*, 2013).

Metabolitos sanguíneos

La concentración de metabolitos séricos obtenidos en este estudio se muestran en el Cuadro 5, y se encuentran dentro del intervalo normal para ovinos (Kaneko *et al.*, 2008). No se observaron diferencias ($P > 0.05$) en la concentración sérica de glucosa, proteína total, albumina, globulina, solo disminuyó ($P \leq 0.05$) la concentración de colesterol al incluir inulina y *L. casei*.

Cuadro 5. Metabolitos sanguíneos en corderos con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*

| Variable | Tratamientos (T) | | | EEM | P |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------|--------|
| | T1 | T2 | T3 | | |
| Colesterol, mg dL ⁻¹ | 69.54 ^a | 64.43 ^b | 62.36 ^b | 1.20 | 0.0008 |
| Glucosa, mg dL ⁻¹ | 76.61 | 73.60 | 71.20 | 1.56 | 0.06 |
| Proteína total, g dL ⁻¹ | 6.11 | 6.18 | 6.30 | 0.79 | 0.27 |
| Albumina, g dL ⁻¹ | 3.04 | 2.79 | 2.93 | 0.07 | 0.09 |
| Globulinas, g dL ⁻¹ | 3.07 | 3.38 | 3.36 | 0.10 | 0.07 |

T1) Testigo (dieta basal, DB); T2) DB + 2 % inulina; T3) DB + 2 % inulina + *L. casei*; EEM, Error estándar de la media; ^{a, b} Valores con distinta literal indican diferencias ($P \leq 0.05$).

Los reportes en la literatura relacionados con la concentración de metabolitos en suero sanguíneo de corderos alimentados con inulina o probióticos son variables; algunos autores informan mayor concentración en proteína total, albumina y globulinas al usar probióticos (Hillal *et al.*, 2011; Abdel-Salam *et al.*, 2014; Hussein, 2014); en contraste, otros autores reportan disminución en la concentración de estos metabolitos (Hosseini-Ali *et al.*, 2014) y en otros casos no se observan cambios (Kazemi-Bonchenari *et al.*, 2013; El-Katcha *et al.*, 2016; Saleem *et al.* 2017). No obstante, estos metabolitos permiten evaluar las condiciones nutricionales y metabólicas de los corderos (Kaneko *et al.*, 2008).

Los corderos al presentar concentraciones séricas en el intervalo, indican que estuvieron clínicamente sanos y no fueron afectados por alguna patología; debido las condiciones higienico-sanitarias, alimentación y manejo durante la fase experimental.

Los niveles séricos de colesterol descritos en este estudio muestran una disminución de 7 y 10 %, en T2 y T3, e involucró a los corderos que recibieron inulina y *L. casei*. Resultados similares fueron observados por Santillo *et al.* (2012), Hossein-Ali *et al.* (2014) y Moarrab *et al.* (2016) al incluir inulina y un aditivo de cepas probióticas en la dieta de corderos, y se explica por la actividad de las bacterias ácido lácticas al reducir la absorción de lípidos en el intestino por desconjugación de los ácidos biliares (Anandharaj *et al.*, 2014; Yoo y Kim, 2016); en consecuencia, aumenta la eliminación de colesterol en heces y disminuye su concentración en sangre (El-Katcha *et al.*, 2016).

Variables ruminales

La inclusión de inulina y *L. casei* no afectó ($P > 0.05$) el pH ruminal, ni la concentración de nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) y de ácidos grasos volátiles (AGV) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Variables ruminales de corderos con adición de inulina de agave y *Lactobacillus casei*

| Variable | Tratamientos (T) | | | | |
|--|------------------|-------|-------|------|------|
| | T1 | T2 | T3 | EEM | P |
| pH | 6.49 | 6.57 | 6.62 | 0.04 | 0.15 |
| Nitrógeno amoniacal, mg dL ⁻¹ | 10.81 | 9.16 | 9.86 | 0.60 | 0.17 |
| Acetato, % | 57.32 | 55.61 | 55.73 | 1.38 | 0.63 |
| Propionato, % | 24.28 | 27.23 | 26.80 | 1.48 | 0.33 |
| Butirato, % | 11.35 | 9.99 | 10.70 | 1.05 | 0.66 |

T1) Testigo (dieta basal, DB); T2) DB + 2 % inulina; T3) DB + 2 % inulina + *L. casei*; EEM, Error estándar de la media.

Los valores de pH ruminal registrados en este estudio son superiores del intervalo considerado como óptimo (6.0) para la microflora ruminal (Kolver y De Veth 2002), y aunque la inulina se puede degradar en el rumen (Samanta *et al.*, 2012), dependiendo de su grado de polimerización, de acuerdo a la longitud de la cadena en su estructura, (van de Wiele *et al.*, 2007; Paßlack *et al.*, 2012; Praznik *et al.*, 2013) y del pH (Flickinger *et al.*, 2003), la contribución de los metabolitos producto de la hidrólisis de este prebiótico no afectaron el pH ruminal. Además, los probióticos estabilizan el pH (Lettat *et al.*, 2012), lo cual favorece el ambiente microbiano y disminuye la incidencia de acidosis ruminal. Adicionalmente, la baja concentración de nitrógeno amoniacal encontrada en el presente estudio, se explica por los componentes de la dieta evaluada y la utilización de amoníaco por las bacterias ruminales, lo cual favorece la síntesis de proteína microbiana (Uyeno *et al.*, 2015), implicando que el uso de inulina o *L. casei* no tuvo efecto en estas variables.

CONCLUSIONES

La inclusión de inulina de agave y *L. casei* en la dieta de corderos al destete disminuyó la incidencia de diarreas, debido a una mejor salud intestinal y aumento en la población de lactobacilos; asimismo, redujó la concentración de colesterol serico.

LITERATURA CITADA

- Abd El-Tawab M. M., Youssef I. M. I., Bakr H. A., Fthenakis G. C., Giadinis N. D. 2016. Role of probiotics in nutrition and health of small ruminants. *Pol. J. Vet. Sci.* 19(4): 893-906.
- Abdel-Salam A. M., Zeitoun M. M., Abdelsalam M. M. 2014. Effect of synbiotic supplementation on growth performance, blood metabolites, insulin and testosterone and wool traits of growing lambs. *J. Biol. Sci.* 14(4): 292-298.
- Agazzi A., Tirloni E., Stella S., Marocco S., Ripamonti B. 2014. Effects of species-specific probiotic addition to milk replacer on calf health and performance during the first month of life. *Ann. Anim. Sci.* 14(1): 101-115.
- Allen H. K., Levine U. Y., Looft T., Bandrick M., Casey T. A. 2013. Treatment, promotion, commotion: Antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends. Microbiol.* 21(3): 114-119.
- Alvarado-Loza. E., Orozco-Hernández J. R., Ruiz-García I. J., Paredes-Ibarra F. J., Fuentes-Hernández V. O. 2009. Level of agave inulin in the feed and the performance of rabbits. *Res. J. Biol. Sci.* 4(10): 1110-1112.
- Anandharaj M., Sivasankari B., Rani R. P. 2014. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: A review. *Chinese J. Biol.* 1-7.
- Antunović Z., Šperanda M., Senčić D., Novoselec J., Steiner Z., Djidara M. 2012. Influence of age on some blood parameters of lambs in organic production. *Maced. J. Anim. Sci.* 2(1): 11-15.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemist. 2005. Official methods of analysis, 18 ed. AOAC, Washington, DC. USA.
- Ashour G., Ashmawy N. A., Dessouki S. M., Shihab O. H. 2015. Blood hematology, metabolites and hormones in newborn sheep and goat from birth to weaning. *Int. J. Adv. Res.* 3(7): 1377-1386.
- Carranza O. C., Ávila F. A., Bustillo A. G. R., López-Munguía A. 2015. Processing of fructans and oligosaccharides from agave plants. In: Preedy R. V. (ed). *Processing and Impact on Active Components in Food.* 1^a ed. Academic Press, USA. pp: 121-129.
- Chaucheyras-Durand F., Walker N. D., Bach A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 5-26.

- Desnoyers M., Giger-Reverdin S., Bertin G., Duvaux-Ponter C., Sauvant D. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92(4): 1620-1632.
- Dicks L. M. T., Botes M. 2010. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Benef. Microb.* 1(1): 11-29.
- El-Katcha M. I., Soltan M. A., Essi M. S. 2016. Effect of *Pediococcus* spp. supplementation on growth performance, nutrient digestibility and some blood serum biochemical changes of fattening lambs. *Alex. J. Vet. Sci.* 49(1): 44-54.
- Erwin E. S., Marco G. J., Emery E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44(9): 1768-1771.
- Flickinger E. A., Van Loo J., Fahey G. C. 2003. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43(1): 19-60.
- Freitas M. A., Ungerfeld R. 2016. Artificial weaning in sheep: stress response and animal welfare. *Review. Rev. Mex. Cienc. Pec.* 7(3): 361-375.
- Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141: S15-S28.
- García, E. 2004. Modificación al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4^a ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 217 p.
- Galapero J., Fernández S., Carlos J. Pérez C. J., García-Sánchez A., García-Sánchez L., Gómez L. 2015. Valuation of immune response by using phagocytosis index and parameters associated as markers of animal stress in fattening lambs. *Small Ruminant Res.* 133: 58-61.
- Hillal H., El-Sayaad G., Abdella M. 2011. Effect of growth promoters (probiotics) supplementation on performance, rumen activity and some blood constituents in growing lambs. *Arch. Tierz.* 54(6): 607-617.
- Hosseini-Ali A., Mashhadi E. A., Rezaeian M., Mohtasebi M. 2014. Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*-based probiotic on performance, hematological parameters and blood metabolites in lambs. *Int. J. Food Nutr. Sci.* 3(4): 8-15.
- Hussein A. F. 2014. Effect of biological additives on growth indices and physiological responses of weaned Nadji ram lambs. *J. Exp. Biol. Agr. Sci.* 2(6): 597-607.

- Kaneko J. J., Harvey J. W., Bruss M. L. 2008. Clinical biochemistry of domestic animals. 6^a ed. Academic Press, USA. 904 p.
- Kara C., Orman A., Gencoglu H., Kovanlikaya A., Meral Y., Cetin I., Yıbar A., Kasap S., Turkmen I., Deniz G. 2012. Effects of inulin supplementation on selected faecal characteristics and health of neonatal Saanen kids sucking milk from their dams. *Animal* 6(12): 1947-1954.
- Kazemi-Bonchenari M., Ghasemi H. A., Khodaei-Motlagh M., Khaltabadi-Farahani A. H., Ilani M. 2013. Influence of feeding synbiotic containing *Enterococcus faecium* and inulin on blood metabolites, nutrient digestibility and growth performance in sheep fed alfalfa-based diet. *Sci. Res. Essays* 8(21): 853-857.
- Khalid M. F., Sarwar M., Mahr-Un-Nisa, Zia-Ur-Rehman. 2011. Response of growing lambs fed on different vegetable protein sources with or without probiotics. *Int. J. Agric. Biol.* 13(3): 332-338.
- Kolver E. S., De Veth M. J. 2002. Prediction of ruminal pH from pasture-based diets. *J. Dairy Sci.* 85:1255-1266.
- Król B. 2011. Effect of mannanoligosaccharides, inulin and yeast nucleotides added to calf milkreplacers on rumen microflora, level of serum immunoglobulin and health condition of calves. *EJPAU.* 14(2): 18.
- Le Jambre L. F., Dominik S., Eady S. J., Henshall J. M., Colditz I. G. 2007. Adjusting worm egg counts for faecal moisture in sheep. *Vet. Parasitol.* 145:108-115.
- Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D. P., Berger C., Martin C. 2012. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *BMC Microbiol.* 12(142): 1-12.
- Malmuthuge N., Griebel P. J., Guan L. L. 2015. The gut microbiome and its potential role in the development and function of newborn calf gastrointestinal tract. *Front. Vet. Sci.* 2(36): 1-10.
- Maron D. F., Smith J. S. T., Nachman, E. K. 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization Health* 9(48): 1-11.

- Márquez-Aguirre A. L., Camacho-Ruíz R. M., Gutiérrez-Mercado Y. K., Padilla-Camberos E., González-Ávila M., Gálvez-Gastélum F. J., Díaz-Martínez N. E., Ortuño-Sahagún D. 2016. Fructans from *Agave tequilana* with a lower degree of polymerization prevent weight gain, hyperglycemia and liver steatosis in high-fat diet-induced obese mice. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71: 416-421.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta* 17(2): 297-304.
- Moarrab A., Ghoorchi T., Ramezanpour S., Ganji F., Koochakzadeh A. R. 2016. Effect of synbiotic on performance, intestinal morphology, fecal microbial population and blood metabolites of suckling lambs. *Iran J. Appl. Anim. Sci.* 6(3): 621-628.
- Moreno-Vilet L., Camacho-Ruiz R. M., Portales-Pérez D. P. 2016. Prebiotic Agave Fructans and Immune Aspects. In: Watson R. R. y Preedy R. V. (eds). *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion.* Academic Press, USA. pp: 165-179.
- Mousa K. M., El-Malky O. M., Komonna, O. F., Rashwan S. E. 2012. Effect of some yeast and minerals on the productive and reproductive performance in ruminants. *J. Am. Sci* 8(2): 291-303.
- Mukhtar N., Sarwar M., Nisa M. U., Sheikh M. A. 2010. Growth response of growing lambs fed on concentrate with or without ionophores and probiotics. *Int. J. Agric. Biol.* 12: 734-738.
- Musa H. H., Wu S. L., Zhu C. H., Seri H. I., Zhu G. Q. 2009. The potential benefits of probiotics in animal production and health. *J. Anim. Vet. Adv.* 8(2): 313-321.
- Njidda A. A., Shuai'bu A. A., Isidahomen C. E. 2014. Haematological and serum biochemical indices of sheep in semi-arid environment of northern Nigeria. *Global J. Sci. Frontier Res: D Agric. Vet.* 14 (2): 48-56.
- NRC (National Research Council). 2007. *Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids.* The National Academy Press. Washington, DC. USA. 362 p.
- NseAbasi N. E., Williams M. E., Akpabio U., Offiong E. E. A. 2014. Haematological parameters and factors affecting their values. *Agric. Sci.* 2(1): 37-47.
- Paßlack N., Al-samman M., Vahjen W., Männer K., Zentek J. 2012. Chain length of inulin affects its degradation and the microbiota in the gastrointestinal tract of weaned piglets after a short-term dietary application. *Livest. Sci.* 149 (1-2): 128-36.

- Praznik W., Löppert R., Cruz R. J. M., Zangger K., Huber A. 2013. Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* weber, var. azul. *Carbohydr. Res.* 381: 64-73.
- Pringsulaka O., Rueangyotchanthana K., Suwannasai N., Watanapokasin N., Amnueysit P, Sunthornthummas S., Sukkhumet S., Sarawaneeyaruk S., Rangsiruji A. 2015. *In vitro* screening of lactic acid bacteria for multi-strain probiotics. *Livest. Sci.* 174: 66-73.
- Russell K. E., Roussel A. J. 2007. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 23(3): 403-426.
- Santillo A., Annicchiarico G., Caroprese M., Marino R., Sevi A., Albenzio M. 2012. Probiotics in milk replacer influence lamb immune function and meat quality. *Animal* 6(2): 339-345.
- Saleem A. M., Zanouny A. I., Singer A. M. 2017. Growth performance, nutrients digestibility, and blood metabolites of lambs fed diets supplemented with Probiotics during pre- and post-weaning period. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 30: 523-530.
- Samanta A. K., Senani S., Kolte A. P., Sridhar M. B. R., Jayapal N. 2012. Effect of prebiotic on digestibility of total mixed ration. *Indian Vet. J.* 89: 41-42.
- Samanta A. K., Jayapal N., Senani S., Kolte A. P., Sridhar M. 2013. Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Braz. J. Microbiol.* 44(1): 1-14.
- SAS. 2013. SAS/STAT User's Guide (9.4) Cary NC, USA: SAS Inst. Inc.
- Uyeno Y., Shigemori S., Shimosato T. 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ.* 30(2): 126-132.
- van de Wiele T., Boon N., Possemiers S., Jacobs H. Verstraete H. 2007. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced *in vitro* prebiotic effects. *J. Appl. Microbiol.* 102: 452-460
- Vlková E., Grmanova M., Rada V., Homutova I., Dubna S. 2009. Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. *Czech J. Anim. Sci.* 54(12): 552-565.
- Yang B., He B., Wang S. S., Liu J. X., Wang J. K. 2015. Early supplementation of starter pellets with alfalfa improves the performance of pre- and post-weaning Hu lambs. *J. Anim. Sci.* 93: 4984-4994.

- Yoo J. Y., Kim S. S. 2016. Probiotics and prebiotics: Present status and future perspectives on metabolic disorders. *Nutrients* 8(173): 1-20.
- Zhao P. Y., Kim I. H. 2015. Effect of direct-fed microbial on growth performance, nutrient digestibility, fecal noxious gas emission, fecal microbial flora and diarrhea score in weaning pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 200: 86-92.

CONCLUSIONES GENERALES

La inulina de agave favorece el crecimiento de bacterias probióticas como *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus casei*.

La inclusión de inulina y *Lactobacillus casei* en la dieta de corderos durante la lactancia es una alternativa para mejorar la salud intestinal y la proliferación de células del sistema inmune; además, la combinación estos aditivos alimenticios aumentan la ganancia de peso en corderos durante la lactancia y optimizan la función del intestino al reducir la población de coliformes e incidencia de diarreas en corderos pre y posdestete.