



**Efecto del probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa 5L22-01) sobre episodios de diarrea y parámetros zootécnicos en terneras en lactancia**

Mier Ortiz, Pamela Mishel

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Dr. Rueda Ortiz, Darwin Arturo

22 diciembre de 2020



## Document Information

<b>Analyzed document</b>	TESIS MIER ORTIZ PAMELA MISHEL.docx (D90178919)
<b>Submitted</b>	12/18/2020 10:32:00 PM
<b>Submitted by</b>	Rueda Ortiz Darwin
<b>Submitter email</b>	darueda@espe.edu.ec
<b>Similarity</b>	8%
<b>Analysis address</b>	darueda.espe@analysis.orkund.com

## Sources included in the report

<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE</b> Document Submitted by: palandazuri@espe.edu.ec Receiver: palandazuri.espe@analysis.orkund.com	 3
<b>W</b>	URL: <a href="http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/1629/1/T-UTC-1502.pdf">http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/1629/1/T-UTC-1502.pdf</a> Fetched: 12/3/2020 11:29:27 PM	 6
<b>SA</b>	<b>Tesis de maestria Braulio Loor 11.docx</b> Document Tesis de maestria Braulio Loor 11.docx (D53737433)	 1
<b>SA</b>	<b>Carrera X. Tesis 11 de febrero 2020.pdf</b> Document Carrera X. Tesis 11 de febrero 2020.pdf (D64069437)	 1
<b>W</b>	URL: <a href="https://pt.qaz.wiki/wiki/Bacillus_amyloliquefaciens">https://pt.qaz.wiki/wiki/Bacillus_amyloliquefaciens</a> Fetched: 12/19/2020 7:43:00 AM	 1
<b>W</b>	URL: <a href="https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1248&amp;context=medicina_v...">https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1248&amp;context=medicina_v...</a> Fetched: 7/22/2020 12:56:37 AM	 1



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Efecto del probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa 5L22-01) sobre episodios de diarrea y parámetros zootécnicos en terneras en lactancia**” fue realizado por la señorita **Mier Ortiz, Pamela Mishel** el mismo que ha sido revisado y analizado en su totalidad, por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 22 diciembre de 2020



Dr. Rueda Ortiz, Darwin Arturo  
C.C: 0400688727  
Director



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo, **Mier Ortiz, Pamela Mishel** con cédula de ciudadanía n°1722690227, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Efecto del probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa 5L22-01) sobre episodios de diarrea y parámetros zootécnicos en terneras en lactancia”** es de mí autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas

Sangolquí, 22 diciembre de 2020



Mier Ortiz, Pamela Mishel

**C.C.:** 1722690227



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo, **Mier Ortiz, Pamela Mishel** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “**Efecto del probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa 5L22-01) sobre episodios de diarrea y parámetros zootécnicos en terneras en lactancia**” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 22 diciembre de 2020

Mier Ortiz, Pamela Mishel

C.C.: 1722690227

### **Dedicatoria**

A Dios, por nunca desampararme, darme fuerzas para seguir adelante y demostrarme su misericordia en todo momento.

A mis adorados padres, Job y Consuelo, por su ejemplo de amor, paciencia, fortaleza, honorabilidad y dedicación. Me han dado todo lo que soy como persona: valores, principios, educación, dignidad; cualidades que cada vez se vuelven más escasas en la sociedad.

A mi hermana, Mari, porque con ella he compartido mi infancia y juventud; por ser mi ejemplo a seguir. A ella, quien me enseña que siempre existen motivos para continuar adelante, luchar por los sueños y nunca dejarse vencer.

## **Agradecimientos**

A la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a sus docentes, en especial a la Dr. Darwin Rueda por su apoyo incondicional y por brindarme la oportunidad de formar parte de este proyecto.

A los Ingenieros Gustavo Naranjo y Erika Guanochanga, gracias por sus consejos, por su amistad y guía tanto en la parte académica como personal.

A los Doctores Julio Paredes Muñoz y Julio Renán Ortiz; profesionales, amigos y excelentes personas; gracias por compartir sus enriquecedores conocimientos que apoyaron a la realización de este trabajo

A la empresa IMVAB, quienes me ayudaron con los insumos necesarios y la atención técnica para el desarrollo de mi proyecto.

A mi familia; mi motor, gracias por su amor incondicional y por su invaluable apoyo durante el transcurso de este camino, sin ustedes este sueño no hubiese sido posible.

A mis amigos, gracias por los momentos compartidos y apoyo durante este hermoso viaje que emprendí.

A Agadir Julián, gracias por apoyarme incondicionalmente en todo y por ser el impulso para continuar con el proyecto.

## Índice de contenidos

Carátula.....	1
Urkund.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas.....	11
Índice de figuras.....	13
Resumen.....	15
Abstract.....	16
Capítulo I.....	17
Introducción.....	17
Antecedentes.....	17
Justificación.....	19
Objetivos.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Hipótesis.....	21
Capítulo II.....	22
Revisión de literatura.....	22



Generalidades de la ganadería.....	22
Desarrollo de los terneros.....	23
Anatomía digestiva de los terneros.....	24
Diarrea neonatal en terneros.....	28
Probiótico.....	30
Probiótico en terneras.....	31
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	32
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en animales.....	33
Capítulo III.....	34
Metodología.....	34
Ubicación del lugar de investigación.....	34
Elaboración del Probiótico.....	34
Preparación de la cepa de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	34
Masificación de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	35
Animales en estudio.....	36
Administración del probiótico.....	38
Medición de parámetros productivos.....	38
Parámetros fecales.....	40
Parámetros Hematológicos.....	40
Análisis Histopatológicos.....	42
Diseño experimental.....	43
Tipo de diseño.....	43

	10
<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo IV.....</b>	<b>46</b>
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>46</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>46</b>
<b>Parámetros productivos.....</b>	<b>46</b>
<b>Parámetros fecales.....</b>	<b>51</b>
<b>Parámetros Hematológicos.....</b>	<b>52</b>
<b>Parámetros Histopatológicos.....</b>	<b>53</b>
<b>Análisis microscópicos.....</b>	<b>54</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>60</b>
<b>Capítulo V.....</b>	<b>65</b>
<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>65</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>65</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>67</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b>	<i>Datos de identificación de los terneros en estudio.....</i>	<b>37</b>
<b>Tabla 2</b>	<i>Tratamientos de B. amyloliquefaciens a diferentes dosis de UFC.....</i>	<b>38</b>
<b>Tabla 3</b>	<i>Escala de índice condición corporal en terneros lactantes.....</i>	<b>39</b>
<b>Tabla 4</b>	<i>Escala de la consistencia fecal según su apariencia.....</i>	<b>40</b>
<b>Tabla 5</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> error estándar del peso de los terneros para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens durante 91 días.....</i>	<b>48</b>
<b>Tabla 6</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> error estándar de la altura de los terneros para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens durante 91 días.....</i>	<b>49</b>
<b>Tabla 7</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> error estándar de la ganancia de peso de los terneros para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens durante 91 días.....</i>	<b>49</b>
<b>Tabla 8</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> error estándar del consumo de alimento (balanceado) de los terneros para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens durante 91 días .....</i>	<b>50</b>
<b>Tabla 9</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> error estándar del índice de consistencia fecal para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens.....</i>	<b>52</b>
<b>Tabla 10</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> error estándar del hematocrito (%) y proteína totales (g/dl) para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens.....</i>	<b>53</b>
<b>Tabla 11</b>	<i>Características clínicas de los diferentes órganos de los terneros en fase de lactancia.....</i>	<b>54</b>
<b>Tabla 12</b>	<i>Promedio <math>\pm</math> error estándar del ancho de papila (porción apical), ancho de papila (porción basal) y largo de papila del rumen para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens .....</i>	<b>55</b>

- Tabla 13** *Promedio  $\pm$  error estándar del ancho de vellosidad (porción apical), ancho de vellosidad (porción basal), largo de vellosidad y profundidad de cripta de duodeno para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens..... 56*
- Tabla 14** *Promedio  $\pm$  error estándar del ancho de vellosidad (porción apical), ancho de vellosidad (porción basal), largo de vellosidad y profundidad de cripta de yeyuno para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens ..... 58*
- Tabla 15** *Promedio  $\pm$  error estándar del ancho de vellosidad (porción apical), ancho de vellosidad (porción basal), largo de vellosidad y profundidad de cripta de íleon para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens ..... 59*

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Ubicación del proyecto en la Hacienda “El Prado” – IASA I.....	<b>34</b>
<b>Figura 2</b> Siembra de cepa de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en medio sólido PDA, cajas petri.....	<b>35</b>
<b>Figura 3</b> Toma de estatura y altura de los terneros semanalmente.....	<b>38</b>
<b>Figura 4</b> Elaboración de hematocrito y lectura de los valores de glóbulos rojos.....	<b>41</b>
<b>Figura 5</b> Análisis de proteína en sangre con la ayuda del refractómetro.....	<b>41</b>
<b>Figura 6</b> Laminillas de las biopsias para el análisis histológico: a) rumen. b) duodeno c) yeyuno. d) íleon .....	<b>43</b>
<b>Figura 7</b> Distribución de los tratamientos en un diseño completamente al azar.....	<b>44</b>
<b>Figura 8</b> Comportamiento del peso de los terneros por semana bajo tres dosis de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 9</b> Comportamiento de la altura de las terneras por semana bajo tres dosis de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 10</b> Porcentaje de terneros con índice de condición corporal en los diferentes tratamientos.....	<b>51</b>
<b>Figura 11</b> Porcentaje de terneros con presencia de diarrea en los diferentes tratamientos.....	<b>52</b>
<b>Figura 12</b> Observación macroscópica del rumen de los terneros con 91 días de edad: a. Testigo (T0) b. $1 \times 10^8$ UFC (T1) c. $1 \times 10^{11}$ UFC (T2) .....	<b>53</b>
<b>Figura 13</b> Sección histológica de las papilas ruminales y parte de la pared ruminal: a) Tejido del animal con aplicación de probiótico ( $1 \times 10^{11}$ UFC). b) Tejido del animal sin aplicación de probiótico (Testigo).....	<b>55</b>

- Figura 14** *Sección histológica de las vellosidades intestinales y parte de la pared del duodeno:*a) *Tejido del animal con aplicación de probiótico ( $1 \times 10^{11}$  UFC).*  
b) *Tejido del animal sin aplicación de probiótico (Testigo) ..... 57*
- Figura 15** *Sección histológica de las vellosidades intestinales y parte de la pared del yeyuno* a) *Tejido del animal con aplicación de probiótico ( $1 \times 10^{11}$  UFC).*  
b) *Tejido del animal sin aplicación de probiótico (Testigo) ..... 58*
- Figura 16** *Sección histológica de las vellosidades intestinales y parte de la pared del íleon:*a) *Tejido del animal con aplicación de probiótico ( $1 \times 10^{11}$  UFC).*  
b) *Tejido del animal sin aplicación de probiótico (Testigo) ..... 60*

## Resumen

*Bacillus amilolyquefaciens* es una bacteria Gram positiva, utilizada como promotor del rendimiento en animales y como agente antibacteriano de amplio espectro. La implementación de este microorganismo en la dieta de los terneros ha sido poco estudiada, por tal motivo el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de *Bacillus amilolyquefaciens* (cepa 5L22-01) sobre episodios de diarrea y parámetros zootécnicos en las terneras en fase de lactancia. Se utilizaron 15 animales en un diseño completamente al azar, a las que se suministró probiótico vía oral, cuyas dosificaciones fueron: 0 UFC (Testigo),  $1 \times 10^8$  UFC (T1) y  $1 \times 10^{11}$  UFC (T2). Las variables que se evaluaron fueron: peso vivo, altura, ganancia de peso, consumo de alimento diario, índice de condición corporal, episodio de diarreas, índices de diarreas, hematocrito, proteína total en sangre, profundidad de criptas, dimensiones de microvellocidades intestinales y profundidad de criptas. Los resultados evidenciaron, el incremento de peso vivo, altura y ganancia de peso durante los 3 meses con la dosis  $1 \times 10^{11}$  UFC ( $P \leq 0.05$ ). También, se encontró un efecto significativo en el hematocrito y proteína total en la sangre de los terneros. En los estudios microscópicos de los órganos, se evidencia un aumento en la longitud de microvellocidades intestinales, sin embargo, no se observa una diferencia significativa en las papilas ruminales y consumo de alimento diario ( $P \geq 0.05$ ). La ingesta de probiótico, disminuye los episodios de diarrea, siendo la enfermedad con más índices de mortalidad en la fase de lactancia.

Palabras claves: *Bacillus amilolyquefaciens*, terneros, probiótico

### Abstract

*Bacillus amilolyquefaciens* is a Gram positive bacteria, used as a yield promoter in animals and as a broad spectrum antibacterial agent. The implementation of this microorganism in the diet of calves has not been studied extensively, thus the aim of this study was to evaluate the effects of *Bacillus amilolyquefaciens* (strain 5L22-01) on episodes of diarrhea and zootechnical parameters in lactating calves. 15 animals were used in a completely randomized design. The probiotic was administered orally at different concentrations: 0 UFC (Ctrl),  $1 \times 10^8$  CFU (T1) and  $1 \times 10^{11}$  CFU (T2). The variables in study were: live weight, height, weight gain, daily food intake, body condition index, diarrhea episode, diarrhea indices, hematocrit, total blood protein, crypt depth, intestinal microvillus dimensions and crypt depth. Results showed an increase in live weight, height and weight gain during 3 months of  $1 \times 10^{11}$  CFU ( $P \leq 0.05$ ). Besides, a significant effect was found on the hematocrit and total protein in the blood of calves. In the microscopic studies of the organs, an increase in the length of intestinal microvilli was observed, however a significant difference was not observed in the ruminal papillae and daily food consumption ( $P \geq 0.05$ ). Additionally, it was found that probiotic intake reduces diarrhea episodes, being the disease with the highest mortality rates in the lactation phase.

Keywords: *Bacillus amilolyquefaciens*, calve, probiotic



## Capítulo I

### Introducción

#### Antecedentes

La ganadería en el Ecuador ha sido tradicionalmente un sector clave para la economía nacional, siendo mejorada con la introducción de nuevas tecnologías que han permitido en la actualidad incrementar el aporte de alrededor del 1.5 % del PIB del país (Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2017).

En el país, la actividad lechera ha tenido un desarrollo productivo importante en los últimos años, razón por la cual se requieren mejoras en el crecimiento, condición corporal y nutrición a temprana edad de los bovinos, lo que podría llevar a un aumento en la producción, y una mejora sustancial en la capacidad productiva del hato (Calvopiña et al., 2007)

La crianza de terneras es la fase más crítica e importante dentro del sistema de producción ganadero, por lo que requiere un manejo con mayor atención a los detalles que pueden interferir significativamente en la producción final (Toquanto, 2018). Teniendo en cuenta que a presentarse algún problema en el manejo de los animales puede aumentar la tasa de mortalidad provocando grandes pérdidas económicas (Gonçalves et al., 2020).

La mortalidad obedece, en muchos casos, a la mala alimentación, causante de infecciones y depresión del sistema inmunológico en los animales. Estas pérdidas han incrementado el uso de antibióticos para proteger a los animales y tratar las diarreas (Görgülü et al., 2003). Provocando una alta presión selectiva en las bacterias patógenas que pueden dar lugar a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos, por lo

que se han buscado alternativas preventivas para la salud y bienestar de las terneras (Arenas & Melo, 2018).

En la actualidad existe una tendencia por el uso de alternativas biotecnológicas preventivas como los probióticos, han mostrado ser capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en las mucosidades intestinales, así como mejorar parámetros productivos, disminuyendo el uso de antibióticos, y por lo tanto controlando la generación de resistencias (García *et al.*, 2005).

Los estudios con el uso de probióticos han mostrado que alimentar terneras con sustitutos de leche, suplementados con *Lactobacillus*, evita la pérdida de peso durante sus dos primeras semanas de vida; también se observó una disminución en la incidencia de diarrea (Görgülü *et al.*, 2003). La cepa H57 de *Bacillus amyloliquefaciens* ha permitido el mejoramiento del rendimiento nutricional, particularmente incrementa eficiencia de conversión alimenticia (FCE) durante el crecimiento de la ternera (Le *et al.*, 2017)

En este contexto Guanochanga (2019) aisló varias cepas de *B. amyloliquefaciens* a partir de muestras ruminales de vacas sanas adultas de las instalaciones del IASA I – Universidad de las Fuerzas Armadas, con el objetivo de obtener cepas con un futuro uso probiótico. Evaluando su capacidad In Vitro de inhibir en crecimiento de algunas cepas de Enterobacterias, las causantes comunes de infecciones gastrointestinales. De este estudio se obtuvo la cepa de *B. amyloliquefaciens* 5L22-01, la cual presentó los más grandes halos de inhibición, por lo cual esta cepa es una buena candidata para evaluar su comportamiento In Vivo como probiótico, tanto para prevenir diarreas como para mejorar los parámetros zootécnicos durante la crianza de terneras

## Justificación

Los probióticos son beneficiosos en la salud del huésped, ya que mantiene el equilibrio de la microbiota intestinal, fomentando la competencia entre cepas probióticas sobre las enteropatógenas por los sitios de unión a la mucosa y los nutrientes (Fonseca et al., 2010). La microbiota promovida por bacterias probióticas, proporcionan una mejor digestibilidad de los alimentos, para aumentar ganancias de peso, peso final, disminución de diarreas y aumento de inmunidad (Arcuri et al., 2006).

La implementación de suplementos en los terneros en fase de lactancia permite mejorar la puntuaciones fecales, reducir en la incidencia diarreas y el número promedio de episodios por día (Jatkauskas et al., 2010). Al igual, aumenta la productividad, promueve el crecimiento y es un posible sustituto de los antibióticos, quienes generan reacciones alérgicas, inflamatorias, efectos tóxicos y promueven la resistencia bacteriana (Gewehr et al., 2003). La disminución de la incidencia de patógenos en el tracto gastrointestinal puede ser proporcionada por las bacterias ácido lácticas productoras de compuestos antimicrobianos, como bacteriocinas y peróxido (Fonseca et al., 2010).

*Bacillus amyloliquefaciens* es una bacteria probiótica, aeróbica, gram-positiva, productora de bacteriocinas con propiedades antimicrobianas, contra diferentes enterobacterias incluyendo *Salmonella sp*, *Escherichia coli* y *Shigella sp*. (Le et al., 2017). Este microorganismo prometedor, no requiere condiciones de crecimiento estrictas que incluyan temperatura, humedad, oxígeno, medio de fermentación y es fácil de procesar, estable y beneficioso en el tracto gastrointestinal del huésped (Hong et al., 2005).

El potencial probiótico de la bacteria promueve el desarrollo de intestino delgado (Suo et al., 2012), reducen la frecuencia de la diarrea, aumentar la ingesta de materia, aumento de peso diario y mejora la condición corporal, lo que coadyuva a un mejor desarrollo productivo del animal (Ji et al., 2013)

Con la presente investigación se muestra alternativa para mejorar la salud de las terneras, donde el probiótico con *Bacillus amyloliquefaciens* permite la optimización de la ganancia de peso, reducción de los trastornos digestivos, reducción de la presencia de diarreas a temprana edad y disminución del insumo de medicinas.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa 5L22-01) sobre episodios de diarrea y parámetros zootécnicos en terneras en lactancia.

### **Objetivos específicos**

Establecer el efecto de *B. amyloliquefaciens* en la presencia de diarreas y parámetros productivos en terneras.

Estimar la acción de *B. amyloliquefaciens* en los parámetros hematológicos bovinos.

Analizar histológicamente el efecto del probiótico en rumen, duodeno, yeyuno e íleon de las terneras lactantes.

**Hipótesis**

**H0:** La ingesta de *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa 5L22-01) como probiótico no mejora los parámetros zootécnicos de las terneras en fase de lactancia en la Hacienda el Prado

**H1:** La ingesta de *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa 5L22-01) como probiótico mejora los parámetros zootécnicos de las terneras en fase de lactancia en la Hacienda el Prado.

## Capítulo II

### Revisión de literatura

#### Generalidades de la ganadería

La vaca es un mamífero, rumiante del tipo ungulado doméstico (animal con pezuñas), pertenece al orden *Artiodactyla*, a la familia *Bovidae*, a la especie *Bos taurus* y desciende del extinto Auroch (*Bos primigenius*). La principal razón de la domesticación de la vaca fue proporcionar un suministro regular de alimentos frescos como son los productos lácteos, también proporcionar estiércol para el abono de los cultivos y proporcionar después del sacrificio cuero, cuerno, huesos y grasa para velas (Aspinall & Cappello 2020). El ganado se ha dividido en dos clasificaciones básicas, *Bos taurus* y *Bos indicus* (Cebú) (Hammack, 2008).

*Bos taurus* es originario de Europa occidental, reconocidas por su alta producción de leche, se adaptan a climas fríos, sus características fenotípicas incluyen la ausencia de joroba pelo largo, pocos pliegues cutáneos, ombligo no colgante, orejas pequeñas, cuernos cortos, ubres anchas y desarrolladas. *Bos indicus* es originario del centro sur de Asia, reconocida por su alta producción de carne, se adaptan a climas cálidos, sus caracterizada por la presencia de joroba, pelo corto, grandes pliegues cutáneos, ombligo colgante, orejas largas, cuernos largos y ubres poco desarrolladas (Hammack, 2008).

Las principales razas productoras de leche incluyen Holstein, Brown Swiss, Jersey, Ayrshire y Guernsey. Razas productoras de carne: Brahman, Shortorn, Gyr, Simental, Red-Polled, Aberdeen-Angus, Hereford, Charolais, Santa Gertrudis y Limousina. Razas de doble propósito: Montbéliarde y Normando (Chaves et al., 2017)

La ganadería en el Ecuador representó el 1.5 por ciento del PIB en el año 2017, donde el ganado de leche es el que más contribuye al sistema pecuario (Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2017). La producción ganadera ecuatoriana tiene un estimado de 4 millones de vacas, convirtiéndose la especie rumiante predominante del país, en donde la raza más común es la mestiza (Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC, 2018)

El sistema de producción más utilizado es el de doble propósito que representa el 69 por ciento, después el sistema de producción de solo leche representa el 19 por ciento y el sistema de producción de carne es el 12 por ciento (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2015)

La crianza de animales en la producción ganadera es el más crítico, debido al cuidado de los terneros, especialmente los recién nacidos, que requiere de una mayor atención, debido a la interferencia directa con la producción final del hato (Caixeta & Carmo, 2020). Se estiman que las pérdidas hasta el año de edad ocurren durante la fase neonatal, representando alrededor del 75% de las pérdidas (Martini, 2018)

### **Desarrollo de los terneros**

El crecimiento y la salud de los terneros están estrechamente relacionados con factores que ocurren antes, durante y en el período posparto inmediato. Los desafíos de los terneros comienzan desde el nacimiento, ya que esta es la fase en la que el animal es más susceptible a las adversidades de la vida extrauterina (Caixeta & Carmo, 2020).

En el momento del nacimiento, el abomaso del ternero ocupa aproximadamente el 60% de su tamaño adulto final, mientras que el rumen y el retículo son muy pequeños y parecen estar colapsados (Aspinall & Cappello, 2020).

El omaso también es pequeño y forma un puente de unión entre el rumen y el abomaso. El revestimiento del abomaso es inmaduro y solo comienza a cambiar después de unos días. Esto puede estar relacionado con su capacidad de absorber anticuerpos calostrales sin cambios durante los primeros años de vida (Aspinall & Cappello, 2020).

Existen pocos cambios en la estructura del estómago a medida que el ternero se desarrolla, hasta que el animal empieza a tener interés por la comida sólida, esto generalmente ocurre entre la 2 y 3 semana de edad y la disponibilidad de forraje que afectará el desarrollo normal (Aspinall & Cappello, 2020).

La exposición a una dieta en plantas debe permanecer durante algún tiempo para continuar con el desarrollo, el regreso a una dieta láctea detendrá el proceso. Posteriormente, el abomaso crece de manera constante, mientras que el rumen y el retículo se desarrollan extremadamente rápido. El estómago compuesto alcanza sus proporciones adultas finales entre los 3 y 12 meses de edad (Aspinall & Cappello, 2020).

### **Anatomía digestiva de los terneros**

El estómago se describe como compuesto y está formado de cuatro segmentos: rumen, retículo, omaso y abomaso, cada órgano está cubierto por epitelio escamoso estratificado queratinizado y tiene un aspecto característico según su ubicación y función (Aspinall & Cappello, 2020).

El retículo es un órgano pequeño y descansa coronal al rumen, debajo de la cubierta de la sexta a la octava costilla. Se encuentra por encima de la apófisis xifoides, opuesto al diafragma, al otro lado del cual está el corazón. Está dispuesto en pliegues



de aproximadamente 1 cm de alto que encierran espacios de cuatro, cinco o seis lados, dándole un aspecto de panal o retículo.

Los espacios se subdividen en celdas más pequeñas y el piso está cubierto de papilas córneas. Hacia el cruce con el rumen, el patrón se modifica y se fusiona con el patrón del epitelio ruminal (Aspinall & Cappello, 2020).

El rumen se extiende desde la octava costilla hasta la entrada de la pelvis, ocupando la mayor parte del lado izquierdo del animal. Consta de numerosas papilas que varían en prominencia, dependiendo de la edad y la dieta individual del ternero y el área del rumen. Las formas de las papilas varían de redondeadas a cónicas o en forma de hoja. El retículo y el rumen forman la cámara de fermentación donde la población de microorganismos comienza la degradación de carbohidratos complejos como la celulosa (Aspinall & Cappello, 2020).

El omaso se encuentra dentro del abdomen a la derecha de la línea media, bajo la cubierta de las costillas 8-11. Está casi lleno con un centenar de pliegues o láminas longitudinales, que cuelgan de la curvatura mayor y los lados, dándole la apariencia de un libro. Existen alrededor de una docena de pliegues largos intercalados con unos más cortos e incluso pliegues cortos intercalados entre ellos. El área alrededor de las aberturas retículo-omasal y omaso-abomasal está libre de estos pliegues (Aspinall & Cappello, 2020).

El abomaso se encuentra dentro del abdomen a la izquierda, flexionado sobre el piso del abdomen, adherido externamente al rumen y al retículo para que se mueva cuando se contraen y es aquí donde la digestión enzimática ocurre. Se divide en el fondo y el cuerpo, que se conecta con el omaso y, la parte pilórica, que se conecta con el duodeno (Aspinall & Cappello, 2020).

Todo el órgano está revestido con una mucosa glandular rosada, en la unión omaso-abomasal el epitelio se vuelve columnar con células caliciformes ocasionales. La mucosa del fondo y del cuerpo contiene glándulas gástricas, la cual tiene como función se relaciona con la del estómago simple, mientras que la mucosa de la parte pilórica segrega solo moco (Aspinall & Cappello, 2020).

La superficie interna se incrementa por la presencia de grandes pliegues en espiral sobre las paredes del fondo y el cuerpo. Los pliegues se reducen en el área flexionada del abomaso y terminan en forma de tapón que previene el reflujo de la ingesta hacia el omaso. El revestimiento de la parte pilórica tiene algunos pliegues inferiores (Aspinall & Cappello, 2020).

El intestino delgado es el sitio principal de digestión enzimática y absorción. Se divide en tres partes, cada una de las cuales tiene una estructura similar, pero muestra adaptaciones funcionales (Aspinall & Cappello, 2020).

El duodeno es un tubo en forma de U, corto y fijo; en el interior de sus paredes se encuentran glándulas conocidas como glándulas de Brunner, que secretan una mezcla de enzimas digestivas. El yeyuno y el íleon son difíciles de distinguir el uno del otro, constituyen un tubo largo sin posición fija, lo que permite que el tracto llene cualquier espacio disponible en la cavidad peritoneal. Dentro de las paredes se encuentran glándulas digestivas conocidas como las criptas de Lieberkiihn. El íleon termina en la unión ileocecal, donde se une al ciego (Aspinall & Cappello, 2020).

Hay seis tipos de células epiteliales que recubren el intestino, estas células epiteliales absorbentes se denominan enterocitos, células indiferenciadas o criptas

epiteliales, células caliciformes, células de Paneth, células enterocromafines (neuroendocrinas, argentafines) y células M (Donald & Zachary, 2011).

Los enterocitos son células altas y columnares con microvellosidades luminales, están constituidas por glucocálix en la superficie y en el interior por enzimas absorbentes, existe una absorción de nutrientes entre los espacios intercelulares laterales. Estas células ascienden por la cripta y las vellosidades intestinales hasta la zona de extrusión en la punta de las vellosidades, donde los enterocitos dañados se descartan hacia la masa fecal (Donald & Zachary, 2011).

Las criptas epiteliales tienen poca o ninguna capacidad digestiva, son células progenitoras que reemplazan a todos los demás tipos de células epiteliales y poseen microvellosidades cortas y escasas (Donald & Zachary, 2011).

Las células caliciformes intervienen en la formación de moco, su número aumenta gradualmente a través del intestino. Las células de Paneth ejercen funciones secretoras, fagocíticas, producen criptina, lisina y sustancias tóxicas para las bacterias, lo que las protege de infecciones. Las células enterocromafines se encuentran en las criptas y principalmente producen serotonina, catecolamina, gastrina, somatostatina, secretina, enteroglucagón, entre otras dentro de los tejidos (Donald & Zachary, 2011).

Las células M se denominan así porque tiene una superficie membranosa en el epitelio de la cúpula que cubre el tejido linfático asociado al intestino; desempeñan funciones importantes como la captación y transporte de antígenos al tejido linfático asociado al intestino y además sirven como puerta de entrada para algunos patógenos incluidos virus y bacterias. Las células mesenquimales residen en la lámina propia y su número aumenta con la exposición al antígeno (Donald & Zachary, 2011).

Los neutrófilos son transitorios, tienen una vida corta en sangre y los tejidos; su ruta normal de eliminación del cuerpo es migrar a través de la pared del tubo digestivo, llegar a la luz y ser excretado a través de las heces. Los eosinófilos presentes en la lámina propia y submucosa intestinal, indican una reacción de hipersensibilidad, a menudo a antígenos alimenticios o parásitos. Los leucocitos globulares se hallan en la lámina propia o intraepiteliales y su función es desconocida (Donald & Zachary, 2011).

### **Diarrea neonatal en terneros**

La diarrea se describe como un aumento en la frecuencia de las deposiciones o una disminución en la consistencia de las heces que provoca la descarga de heces blandas y acuosas. La aparición de diarrea indica un desequilibrio entre la absorción y secreción de agua y electrolitos. Solo un ligero desbalance en el equilibrio entre secreción y absorción, a favor de la secreción, puede provocar diarrea grave porque grandes volúmenes de fluido fluyen en ambas direcciones. Hay varias causas posibles de desbalance.

Su etiología está relacionada a una alteración en el transporte de iones, malabsorción pasiva, motilidad intestinal, efectos osmóticos, presión hidrostática tisular y permeabilidad incrementada. La diarrea en terneros puede clasificarse en dos tipos: diarrea secretora y diarrea osmótica.

La diarrea secretora resulta del movimiento neto de líquido en el lumen intestinal a pesar del ayuno. Las heces son característicamente isotónicas con el plasma, acuosas y alcalinas, y los volúmenes producidos suelen ser grandes. La diarrea secretora aguda siempre es causada por una infección bacteriana.

En la diarrea osmótica las heces pueden tener una alta osmolalidad debido a moléculas no absorbidas con actividad osmótica, generalmente de origen dietético. Las heces pueden contener lactosa no digerida y el pH fecal puede variar dependiendo de la cantidad de lactosa fermentada a ácidos grasos de cadena corta o ácido láctico.

También se puede pensar en la diarrea osmótica como una diarrea causada por malabsorción y mala digestión. El volumen fecal es menor que en la diarrea secretora y la diarrea se reduce o se elimina más rápido. Los virus son una de las causas de este tipo de diarrea (Andrews et al., 2008)

La evaluación inicial de un ternero diarreico implica un examen físico general; esta evaluación debe valorar la presencia de una arritmia, estado de deshidratación, grado de debilidad y depresión del SNC, gravedad de la diarrea, estado del ombligo, presencia de neumonía, e hipotermia o fiebre. Posteriormente, el tratamiento puede incluir terapia de control y administración oral o intravenosa (Andrews et al., 2008).

La diarrea transitoria es común en los terneros y muchos se curan solos. El suministro de agua de libre elección y un bloque de sal, le facilitará al ternero mantener la homeostasis. En algunos casos, esto es suficiente si los terneros son cuidadosamente supervisados (Anderson & Rings, 2008).

Las indicaciones comunes para administrar antibióticos a algunos terneros diarreicos implican causas bacterianas de diarrea; reducción del sobrecrecimiento bacteriano intestinal y tratamiento de bacteriemia secundaria, septicemia o infecciones intercurrentes. El crecimiento excesivo de bacterias se puede controlar por administración de fármacos o manejo nutricional (Anderson & Rings, 2008).

En la actualidad se usan tratamientos preventivos, ya que los tratamientos con el uso de antibiótico son limitados debido a la generación de resistencia de patógenos,

alteración de la microbiota gastrointestinal, produciendo susceptibilidad a los animales a temprana edad. Una alternativa para el control de diarreas es el uso de probióticos, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de enterobacterias en la mucosa intestinal (Curbelo et al., 2005)

### **Probiótico**

El término probiótico se define como cepas vivas de microorganismos rigurosamente seleccionados, que al administrarse en cantidades adecuadas proporcionan beneficios para la salud del huésped (Hill et al., 2014). Los microorganismos utilizados como probióticos son cepas bacterianas, cepas fúngicas específicas, preparaciones enzimáticas, extracto de cultivos y combinaciones bacterianas (Cangiano et al., 2020)

Los principales mecanismos de acción de los probióticos incluyen el mejoramiento de la barrera epitelial, aumento de adhesión a la mucosa intestinal e inhibición concomitante de la adhesión de patógenos, supresión competitiva de microorganismos patógenos, producción de sustancias anti-microorganismos y modulación del sistema inmunológico (Bermudez-Brito et al., 2012).

Datos recientes han indicado que los probióticos pueden iniciar la reparación de la función de barrera epitelial después de un daño e incluso restaurar la integridad de la mucosa. La interacción entre las proteínas de superficie de las bacterias probióticas y la secreción de inmunoglobulinas, mucina y sales en el gel mucoso secretado por las células epiteliales intestinales, parecen favorecer la exclusión competitiva de patógenos (Bermudez-Brito et al., 2012).

La producción de bacteriocina confiere obtener cepas con una ventaja competitiva en entornos microbianos complejos como consecuencia de su actividad antimicrobiana asociada. Además, puede aumentar la prevalencia y permitir el establecimiento de cepas productoras, así como permitir la inhibición directa del crecimiento de patógenos dentro del tracto gastrointestinal (Bermudez-Brito et al., 2012).

En el sistema inmunológico los probióticos modulan las respuestas inmunitarias (Yirga, 2015), inhiben el crecimiento y translocación de patógenos, reduciendo posibles infecciones (Singh et al., 2011)

Los probióticos permiten el incremento de la consumo de alimento, ganancia diaria de peso, peso final corporal y la reducción de diarreas, efectos de antitoxinas, (Samli et al., 2007). También poseen un efecto fisiológico en el establecimiento de una población bacteriana intestinal promotora de respuesta de tipo protectora para el huésped (Soccol et al., 2010).

En la alimentación animal el uso de probióticos tiene eficacia positiva en los procesos digestivos, especialmente celulíticos y en síntesis de proteína microbiana. (Markowiak & Śliżewska, 2018). Además, pueden combinarse con enzimas que ayudan a descomponer sustancias alimenticias en formas simples, mejorando la digestión de nutrientes en los animales (Singh et al., 2011).

### **Probiótico en terneras**

En el rendimiento del animal, los probióticos proporcionan un aumento significativo del peso, crecimiento y consumo de alimento, durante la etapa de desarrollo (Adams et al., 2007).

Los probióticos promueven el desarrollo de microvellosidades intestinales y papilas ruminales aumenta la superficie de absorción mejorando la asimilación de nutrientes en el animal (Sun et al., 2011). Existe una activación en el desarrollo del sistema digestivo, es decir que la maduración del rumen del ternero es temprana (Alawneh et al., 2020). La ecología de microflora ruminal tiene un mejoramiento lo que permite el incremento de pH ruminal y disminución de acidosis clínica o subaguda (Bahari, 2017).

Los suplementos protegen contra patógenos, mejorando la respuesta inmune, reduciendo el uso de antibióticos y la mortalidad (Bahari, 2017). Además, aminoran la incidencia, episodios, severidad (Galvão et al., 2005), la prevalencia y la mortalidad por diarreas de los rumiantes a edad temprana (Maldonado et al., 2018).

### ***Bacillus amyloliquefaciens***

*Bacillus amyloliquefaciens* es una bacteria Gram positiva, no patógena, en forma de varilla, aeróbica y catalasa positiva y formadores de esporas (Priest et al., 1987).

Tiene un comportamiento bioquímico similar a *Bacillus subtilis*, pero con una mayor producción de  $\alpha$ -amilasa y porcentaje molecular de las bases Guanina-Citosina en su ADN. Su perfil químico se caracteriza por causar hidrólisis de almidón, produciendo acetilmetil, fermentando glucosa, sacarosa y lactosa con la producción de gas, reduciendo el nitrato a nitrito (Welker & Campbell, 1967).

Bacteria altamente resistente a los cambios ambientales (Mahdhi et al., 2012), tiene actividad antibacteriana de amplio espectro y tiene un papel importante en la digestión de carbohidratos (Kaewklom et al., 2013)



### ***Bacillus amyloliquefaciens* en animales**

La adición de probiótico, permite el incremento de peso corporal final, ganancia de peso, crecimiento y consumo de alimento. El índice de conversión alimenticia mejora en el transcurso del desarrollo del animal (Al-Deriny et al. 2020).

Una parte del potencial terapéutica de la bacteria es la regulación de la inmunidad innata, la reducción de la mortalidad y protección contra la infección por patógenos (Lai et al., 2020). Al igual, que la reducción de antibióticos, que causa la reducción de la microbiota intestinal, durante todo el sistema producción (Al-Deriny et al. 2020).

La administración de probiótico influye en cambios significativos en la composición de la microbiota, incluyendo una mayor abundancia de bacterias gram-positivas y gram-negativas, también proporciona una reducción de endobacterias (Zhang et al, 2020).

La suplementación dietética con esta bacteria, mejora la morfología digestiva lo que ayuda a una mayor asimilación de nutrientes y disminuye la respuesta inflamatoria, lo que puede contribuir a mejorar el rendimiento del crecimiento durante la vida temprana (Li et al., 2018).

## Capítulo III

### Metodología

#### Ubicación del lugar de investigación

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Agrobiotecnología y en el proyecto de ganadería de la hacienda “El Prado”, ubicado en la Provincia de Pichincha, Cantón Rumiñahui, Parroquia Sangolquí, Sector San Fernando, en las instalaciones de la Facultad de Ingeniería Agropecuaria – IASA I (Figura 1).

El lugar del estudio está ubicado en las siguientes coordenadas geográficas: 78° 24' 44" Longitud Oeste y 0°23' 20" Latitud Sur; a una altitud de 2748 msnm (Arce, 2009).

#### Figura1

*Ubicación del proyecto en la Hacienda “El Prado” – IASA I*



Fuente: Google Earth Pro, 2019.

#### Elaboración del Probiótico

##### Preparación de la cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*

En el presente estudio se utilizó la bacteria probiótica *B. amyloliquefaciens* (cepa 5L22-01), aislada a partir de medios de capturas en bolsas de digestibilidad colocadas en el rumen de vacas fistuladas sanas e identificada por la morfología de las colonias, actividad bioquímica, tinción Gram y secuenciación del gen 16S, además la cepa fue

evaluada en su actividad antagonista, demostrando un buen potencial de inhibición frente a enterobacterias (Guanochanga, 2019).

Las bacterias preservadas en el criocepario del Laboratorio de Agrobiotecnología (IASA I), fueron reactivadas de los viales mediante la descongelación. Se tomó una muestra de las mismas y se realizaron disoluciones hasta  $10^{-6}$  ml, posteriormente se sembraron 100  $\mu$ l por agotamiento con la ayuda del asa de platino y se extendió con el asa de Digrasky en medio PDA, finalmente se incubó a 37°C por 24 horas. La calidad de la cepa reactivada se evaluó por medio tinción Gram, observándose microscópicamente la presencia bacilos Gram positivos, metodología que permitió determinar la pureza y viabilidad de la bacteria necesarias para su masificación (Figura 2)

### **Figura 2**

*Siembra de cepa de Bacillus amyloliquefaciens en medio sólido PDA, cajas petri*



### **Masificación de *Bacillus amyloliquefaciens***

Se prepararon medios concentrados con la bacteria como semillas para la producción a mayor escala, para ello se realizó la siembra de la bacteria en matraces de 250 ml con medio MOLP, posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas en una incubadora con agitación Innova 40 (New Brunswick, Alemania) y se evaluó por tinción Gram la pureza del cultivo.

A partir de los cultivos madre proliferados en matraces, se inoculó 100 ml de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* en botellones de 6 litros conteniendo 4 litros de medio nutritivo MOLP (Tryptona 30g, Dextrosa 20g, Extracto de levadura 7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,9g, CuSO<sub>4</sub> 0,0001 mg , FeCl<sub>3</sub> 6 H<sub>2</sub>O 0,0005 mg , Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0,0004 mg , KI 0,0002 mg , MnSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 3,6 mg , MgSO<sub>4</sub> 0,45 g , ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,14 mg , H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,01 mg , C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 10 mg , sales MOLP 1 µl pH 5,5). Para la producción masiva se incubó a 37°C por 24 horas en el agitador orbital.

La biomasa obtenida del medio se colocó en frascos HDPE de 250ml, los cuales se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, después se eliminó el sobrenadante con la ayuda de una pipeta de 10ml conservando el sedimento. El pellet bacteriano se disolvió en 250 ml de solución de dextrosa al 2%, utilizado como medio estabilizador de crecimiento.

Se realizaron mediciones para calcular la concentración bacteriana en el preparado final, para lo cual se hicieron diluciones de hasta 10<sup>-6</sup> ml con dextrosa, también se colocó 2 ml de la muestra en tubos de vidrio y se midió la concentración por medio de turbidez con la escala (Escala McFarland) y espectrofotometría a 560nm en el equipo Genesys™ 10 UV-Vis (ThermoElectronics, USA). Finalmente se realizó una transformación a ml de las concentraciones bacterianas (UFC), para su dispensión en los microtubos.

### **Animales en estudio**

Los animales que se emplearon en este proyecto de investigación corresponden a 15 terneros de triple cruza (Montbéliarde x Holstein x Rojo australiano), machos y hembras nacidos entre los meses de febrero y marzo, teniendo una diferencia de edad de un mes (Tabla 1), precedentes del área de ganadería de La Hacienda “El Prado” de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

En el nacimiento se desinfectó el ombligo de los terneros con yodo al 7% y se aseguró el calostramiento con la permanencia junto a su madre durante los tres primeros días de vida.

Una vez cumplido este tiempo los terneros fueron dirigidos a las cunas, las cuales son instalaciones de hierro (1x1.30 m), con cama de tamo, permitiéndole al ternero tener confort y bienestar. La desinfección de esta área, se realizó cada 2 días, con cambio de tamo y cada 2 semanas con desinfectantes químico (yodo – cloro) para evitar enfermedades sanitarias.

La identificación de cada animal se la realizó con aretes en la oreja, los cuales contaron con fecha del nacimiento, número del ternero, nombre asignado al ternero, número de la madre y el nombre del padre.

La alimentación de los terneros durante el periodo de lactancia, consistió en 2 litros/día de leche en mañana y 2 litros/día en la tarde, desde el cuarto día de vida. Al igual, que concentrado elaborado en la planta de balanceado de la facultad, agua a voluntad en recipientes individuales y forraje verde una vez por día.

### **Tabla 1**

*Datos de identificación de los terneros en estudio*

<b>Arete</b>	<b>Sexo</b>	<b>Fecha Nacimiento</b>
V207	Hembra	13-feb
M481	Macho	17-feb
V211	Hembra	27-feb
M484	Macho	6-mar
V214	Hembra	10-mar
V208	Hembra	19-feb
V213	Hembra	8-mar
M486	Macho	9-mar
M487	Macho	11-mar
V216	Hembra	26-mar
V209	Hembra	25-feb
V210	Hembra	27-feb
V212	Hembra	28-feb
M482	Macho	29-feb
M483	Macho	1-mar

### Administración del probiótico

Los microtubos con probiótico fueron dosificados semanalmente, se conservaron en refrigeración a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el transporte se lo realizó en una hielera con hielo seco para preservar la viabilidad de la cepa. Las dosis obtenidas se disolvieron en 10 ml de leche, posteriormente con jeringas de 20 ml estériles se suministró vía oral al ternero, una vez al día en el ordeño en la tarde. *Bacillus amyloliquefaciens* fue inoculado a 10 terneros desde la entrada a las cunas hasta la finalización de la fase de lactancia (Tabla 2).

**Tabla 2**

*Tratamientos de B. amyloliquefaciens a diferentes dosis de UFC*

Tratamiento	Descripción
T0	0 UFC de probiótico
T1	$1 \times 10^8$ UFC de probiótico
T2	$1 \times 10^{11}$ UFC de probiótico

### Medición de parámetros productivos

Semanalmente se tomó el peso de los terneros con la ayuda de una balanza electrónica previamente calibrada y la altura se obtuvo por medio de una cinta métrica en centímetros, midiendo desde la parte inicial de la pezuña hasta la cruz (Figura 3).

**Figura 3**

*Toma de estatura y altura de los terneros semanalmente*



De manera observacional se asignó un índice de condición corporal durante toda la investigación, expresado en una escala de 1 a 3 (Tabla 3) y la ganancia diaria promedio del peso de los animales durante el tiempo de alimentación en la fase de lactancia, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$GP = \frac{PF - PI}{\#días}$$

**GP** = Ganancia de peso (g/día)

**PF** = Peso final (g)

**PI** = Peso inicial (g)

**#días** = Número de días

**Tabla 3**

*Escala de índice condición corporal en terneros lactantes*

<b>Categorías</b>	<b>Escala</b>
Delgada	1
Promedio	2
Gorda	3

En el consumo de alimento por animal se midió con la ayuda de una balanza, teniendo un control estricto del alimento balanceado, así como del forraje cada semana, Este parámetro fue calculado con la siguiente fórmula:

$$CA = CAO - ANC$$

**CA** = Consumo de alimento

**CAO** = Consumo de alimento ofrecido

**ANC** = Alimento no consumido.

### Parámetros fecales

Los episodios de diarreas se evaluaron diariamente de manera visual en los terneros en cunas individuales, se calculó con el número de terneros que mostraron diarrea en relación a la cantidad total de terneros de cada tratamiento y se asignó una escala según sus particularidades (Tabla 4). El índice de consistencia fecal es un indicador de la intensidad y duración de las deposiciones, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$ICF = \frac{(dE1 \times 1) + (dE2 \times 2) + (dE3 \times 3) + (dE4 \times 4)}{Td \times 4}$$

**ICF** = Índice de consistencia fecal

**dE**= Número de días con consistencia fecal puntuada

**Td**= Número total de días del experimento

#### Tabla 4

*Escala de la consistencia fecal según su apariencia*

Categorías	Escala
Normal	1
Blanda	2
Fluido	3
Acuoso	4

### Parámetros Hematológicos

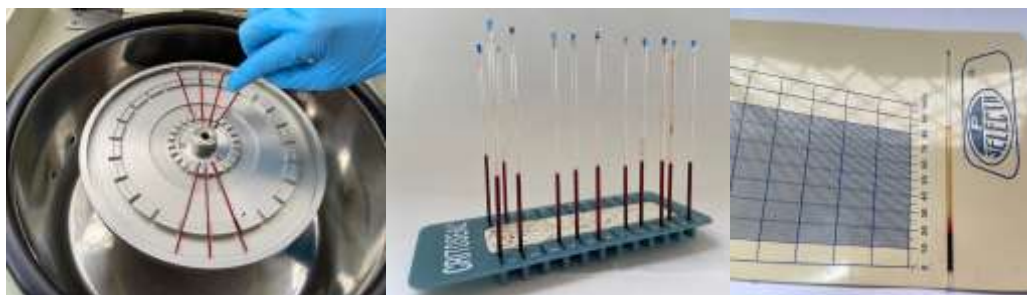
El hematocrito consta de la extracción de la sangre de la vena yugular del ternero, depositada en tubos con EDTA (tapa lila) y homogenizada previo su análisis. Los tubos se sometieron a 180°, es decir hasta que la muestra llegue al borde del tubo.



A continuación, se colocó un capilar que fue llenado al 80% con sangre y se lo selló con plastilina; posteriormente se puso los capilares en el canal respectivo de la microcentrífuga y se procedió a centrifugar por 5 minutos a 1000 rpm. Finalmente, se retiró los capilares en el orden establecido por muestras y con la ayuda de una tabla de lectura de hematocrito se determinó el valor de glóbulos rojos por cada uno de los terneros (Figura 4)

#### Figura 4

*Elaboración de hematocrito y lectura de los valores de glóbulos rojos*



La proteína sérica total en la sangre se obtuvo colocando una muestra de 30  $\mu$ l de suero en el refractómetro previamente limpio y calibrado. Después se observó la escala a través del refractómetro con la ayuda de la luz solar, registrando el valor de la proteína total en gramos/100 ml. Finalmente para el análisis de una nueva muestra, se limpia la cámara quitando los residuos y se procedió a secar con una toalla (Figura 5)

#### Figura 5

*Análisis de proteína en sangre con la ayuda del refractómetro*



### **Análisis Histopatológicos**

Se sacrificó un ternero de cada tratamiento (T0, T1 y T2) al final del experimento a los 90 días. Los animales fueron desensibilizados con Acepromacina 0,4 ml/kg, posteriormente se registraron los signos vitales (temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria) y se procedió al sacrificio del animal, recolectando los órganos del sistema digestivo post mortem.

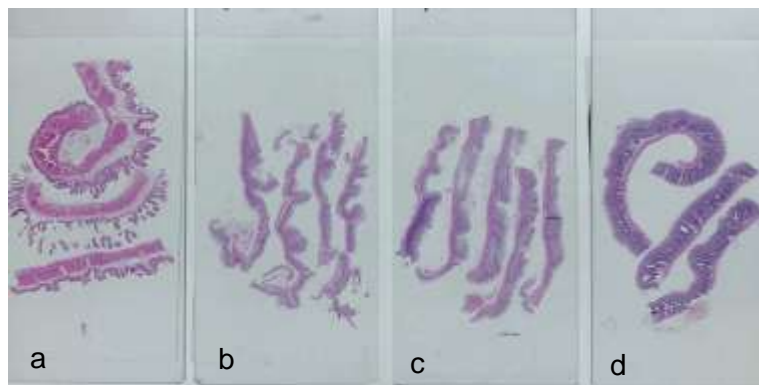
Los cortes de los órganos rumen e intestino delgado, se realizaron con la ayuda de un bisturí y con la guía de una sonda acanalada previamente esterilizadas, posteriormente se lavó los órganos con abundante agua, se conservó en envases de vidrio de 6 litros con formol al 10%, y se realizaron exámenes macroscópicos de color y forma de los órganos por cada tratamiento

El análisis histopatológico se realizó en el laboratorio Histodiagnóstico Veterinario, en donde se elaboraron cortes histológicos de 3 mm de grosor, que incluían rumen, duodeno, yeyuno e íleon, posteriormente se tomaron fotografías de la superficie del corte, para luego ser depositadas en cassettes de histología previamente identificados. Todos los cassettes fueron depositados en un frasco con formol al 10% y posteriormente se elaboraron las laminillas histológicas con la tinción de hematoxilina-eosina.

Las laminillas fueron evaluadas histopatológicamente en el microscopio Carl Zeiss, posteriormente con microfotografías previamente obtenidas se realizó la toma mediciones en el programa ZEN 2012 (blue edition) Carl Zeiss Microscopy GmbH (Figura 6).

**Figura 6**

Laminillas de las biopsias para el análisis histológico: a) rumen. b) duodeno. c) yeyuno. d) íleon

**Diseño experimental****Tipo de diseño**

El experimento se dispuso mediante un diseño completamente al azar (DCA) con 3 tratamientos y 5 repeticiones, bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + e_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = Variable de Respuesta

$\mu$  = Media general
















$P_i$  = Efecto de la  $i$  - ésima dosis de *B. amyloliquefaciens*

$e_{ij}$  = Error experimento

La disposición del experimento en el campo se puede apreciar en la Figura 7

**Figura 7**

Distribución de los tratamientos en un diseño completamente al azar

 T1	 T2	 T0
 T0	 T1	 T2
 T0	 T2	 T0
 T2	 T1	 T1
 T2	 T1	 T0

Para la evaluación de los parámetros productivos como peso, ganancia de peso, altura y consumo de alimento se dispuso un diseño completamente al azar en parcela dividida considerando como unidad experimental a cada uno de los terneros. El modelo matemático se detalla a continuación:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + \delta_{k(i)} + T_j + (PT)_{ij} + e_{ijk}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = Peso, Ganancia de peso, altura y consumo de alimento

$\mu$  = Media general

$P_i$  = Efecto de la  $i$ -ésima dosis de *B. amyloliquefaciens*

$\delta_{k(i)}$  = Error de la dosis de *B. amyloliquefaciens*

$T_j$  = Efecto de la  $j$ -ésimo día

$(PT)_{ij}$  = Efecto interacción dosis de *B. amyloliquefaciens* x día

$e_{ijk}$  = Error experimental

Para la evaluación de los parámetros histológicos como ancho papila (porción apical), ancho papila (porción basal), largo papila, profundidad de cripta, ancho vellosidad (porción apical), ancho vellosidad (porción basal) y largo vellosidad, se dispuso un diseño completamente al azar (DCA), considerando como unidad experimental a los órganos rumen, duodeno, yeyuno e íleon. El modelo matemático se detalla a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + e_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = Parámetros histológicos

$\mu$  = Media general

$P_i$  = Efecto de la *i*-ésima dosis de *B. amyloliquefaciens*

$e_{ij}$  = Error experimental

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda del programa Infostat® (Di Rienzo et ál., 2016). Se hicieron las pruebas con un nivel de confianza del 95%, se utilizó análisis de varianza mediante modelos mixtos y lineales para las variables paramétricas, adicional a esto se realizó pruebas de comparación de medias Tuckey y LSD. Para las variables cualitativas se realizó tablas de contingencia por observación en el tiempo.

## Capítulo IV

### Resultados y discusión

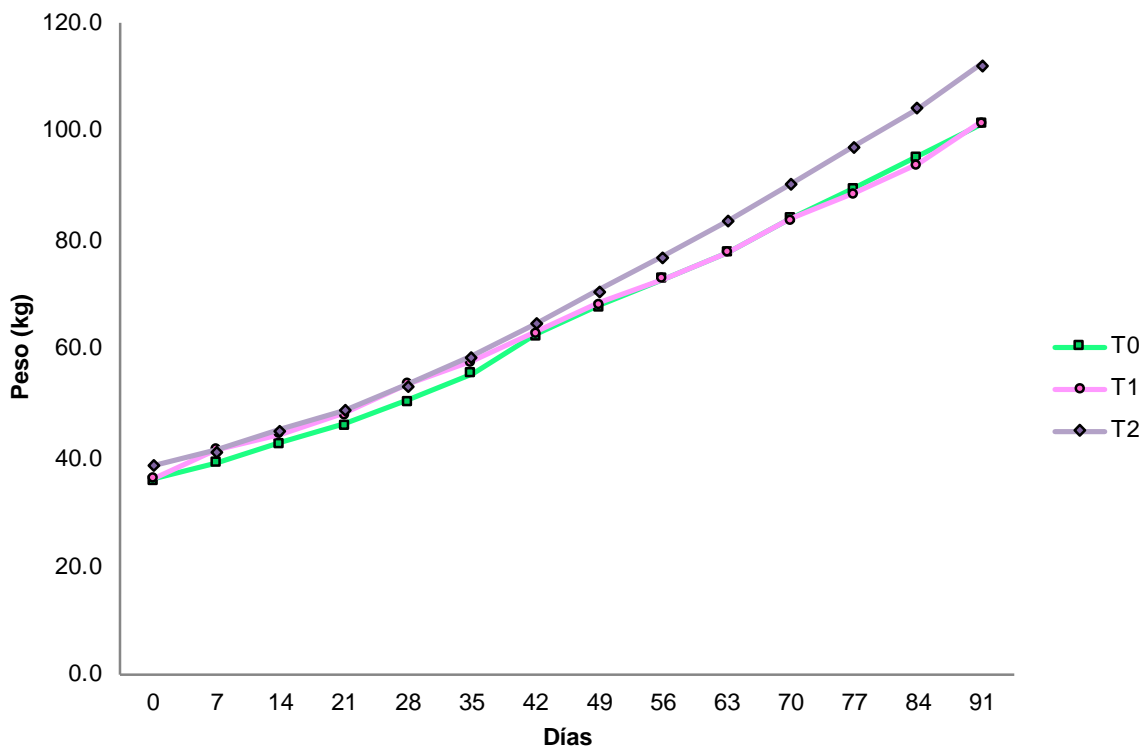
#### Resultados

#### Parámetros productivos

*Bacillus amyloliquefaciens* aplicado en las dietas de los terneros, presentó un aumento de peso con el tratamiento T2 a partir del día 42 (Figura 8), lo que fue corroborado por el análisis de varianza mediante modelos mixtos (Tabla 5) en el que se encontró diferencia entre los tratamientos desde día 56, durante la fase de lactancia.

#### Figura 8

*Comportamiento del peso de los terneros por semana bajo tres dosis de Bacillus amyloliquefaciens*

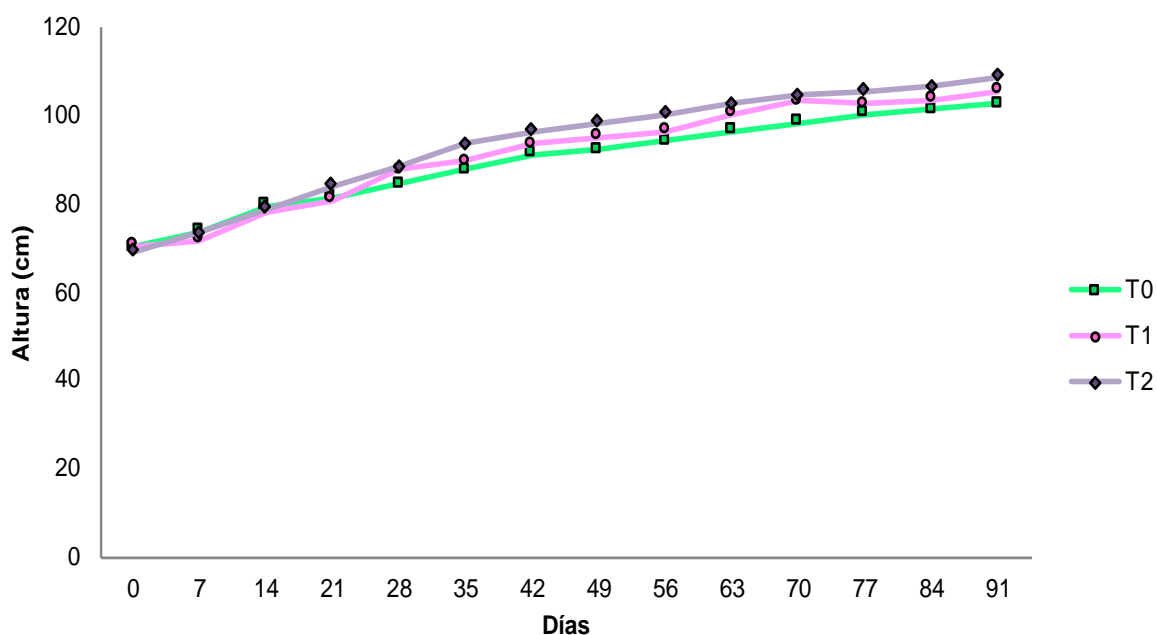


Nota. T0=Testigo, T1=1x10<sup>8</sup> UFC de probiótico, T2=1x10<sup>11</sup> UFC de probiótico.

Los resultados obtenidos en la investigación indican que la inclusión del probiótico a la dieta de los terneros, presentan un incremento en el crecimiento con el tratamiento T2 a partir del día 28 (Figura 9), lo que fue corroborado por el análisis de varianza mediante modelos mixtos (Tabla 6) en el que se encontró diferencias significativas con el tratamiento T2, respecto al testigo.

### Figura 9

*Comportamiento de la altura de las terneras por semana bajo tres dosis de Bacillus amyloliquefaciens*



Nota. T0=Testigo, T1=1x10<sup>8</sup> UFC de probiótico, T2=1x10<sup>11</sup> UFC de probiótico.

El consumo de alimento, no presentó efecto significativo para la interacción *B. amyloliquefaciens* x tiempo ( $F_{26,156}=0.31$ ,  $p=0.9996$ ) (Tabla 8). Sin embargo, se encontró un efecto significativo para la interacción sobre peso, ganancia de peso y altura ( $F_{26,156}=1.31$ ,  $p=0.0405$ ;  $F_{24,144}=2.51$ ,  $p<0.0001$ ;  $F_{26,156}=1.58$ ;  $p=0.0449$ ).

Los terneros con la inclusión de  $1 \times 10^{11}$  UFC *Bacillus amyloliquefaciens* registraron mayor promedio de peso y altura al final del experimento en comparación con resto de tratamientos. Los animales con la dosis más alta de *Bacillus amyloliquefaciens* presentaron mayor ganancia de peso a partir del día 7 hasta finalizar la fase de lactancia (Tabla 5, 6 y 7)

**Tabla 5**

*Promedio  $\pm$  error estándar del peso de los terneros para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens durante 91 días*

Tiempo (días)	Peso (kg)			p-valor		
	T2	T1	T0			
				0.0405		
0	38.60 $\pm$ 1.32	a	37.10 $\pm$ 1.97	a	36.04 $\pm$ 1.21	a
7	41.28 $\pm$ 1.45	a	41.70 $\pm$ 1.24	a	39.20 $\pm$ 1.45	a
14	45.10 $\pm$ 2.11	a	45.20 $\pm$ 1.36	a	42.90 $\pm$ 1.59	a
21	48.90 $\pm$ 2.33	a	48.50 $\pm$ 1.52	a	46.10 $\pm$ 1.93	a
28	53.40 $\pm$ 2.04	a	53.70 $\pm$ 1.62	a	50.62 $\pm$ 1.64	a
35	58.70 $\pm$ 2.13	a	57.70 $\pm$ 1.67	a	55.70 $\pm$ 1.51	a
42	64.78 $\pm$ 2.04	a	63.10 $\pm$ 1.30	a	62.50 $\pm$ 1.60	a
49	70.90 $\pm$ 1.92	a	68.30 $\pm$ 1.24	a	67.82 $\pm$ 1.48	a
56	77.10 $\pm$ 1.81	a	73.00 $\pm$ 1.20	b	73.00 $\pm$ 0.99	b
63	83.60 $\pm$ 1.71	a	77.70 $\pm$ 1.41	b	77.70 $\pm$ 1.17	b
70	90.30 $\pm$ 1.66	a	83.80 $\pm$ 1.45	b	84.00 $\pm$ 1.12	b
77	97.30 $\pm$ 1.63	a	88.80 $\pm$ 1.39	b	89.70 $\pm$ 1.25	b
84	104.50 $\pm$ 1.79	a	94.00 $\pm$ 1.35	b	95.40 $\pm$ 1.29	b
91	112.30 $\pm$ 1.44	a	101.60 $\pm$ 0.94	b	101.40 $\pm$ 0.97	b

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

T2= $1 \times 10^{11}$  UFC de probiótico, T1= $1 \times 10^8$  UFC de probiótico, T0=Testigo; d= Día



**Tabla 6**

*Promedio  $\pm$  error estándar de la altura de los terneros para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens durante 91 días*

Tiempo (días)	Altura (cm)			p-valor
	T2	T1	T0	
				0.0449
0	69.40 $\pm$ 0.51	a 70.60 $\pm$ 2.16	a 70.20 $\pm$ 1.02	a
7	73.48 $\pm$ 0.44	a 72.00 $\pm$ 2.16	a 73.80 $\pm$ 1.02	a
14	78.88 $\pm$ 0.42	a 78.32 $\pm$ 2.31	a 79.80 $\pm$ 0.66	a
21	84.16 $\pm$ 0.58	a 81.04 $\pm$ 2.35	a 81.48 $\pm$ 0.73	a
28	88.56 $\pm$ 0.77	a 87.76 $\pm$ 2.10	ab 84.48 $\pm$ 1.01	b
35	93.56 $\pm$ 0.98	a 89.76 $\pm$ 2.10	ab 87.68 $\pm$ 1.14	b
42	96.36 $\pm$ 0.97	a 93.56 $\pm$ 2.20	ab 91.36 $\pm$ 1.44	b
49	98.56 $\pm$ 1.10	a 95.36 $\pm$ 2.31	ab 92.36 $\pm$ 1.44	b
56	100.44 $\pm$ 1.02	a 96.36 $\pm$ 2.31	ab 94.36 $\pm$ 1.44	b
63	102.64 $\pm$ 1.15	a 100.36 $\pm$ 2.31	ab 96.36 $\pm$ 1.44	b
70	104.64 $\pm$ 1.15	a 103.36 $\pm$ 2.31	ab 98.36 $\pm$ 1.44	b
77	105.64 $\pm$ 1.15	a 102.56 $\pm$ 2.28	ab 100.36 $\pm$ 1.44	b
84	106.64 $\pm$ 2.37	a 103.76 $\pm$ 2.45	ab 101.36 $\pm$ 1.44	b
91	108.80 $\pm$ 1.16	a 105.60 $\pm$ 2.59	ab 102.80 $\pm$ 1.56	b

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

T2=1x10<sup>11</sup> UFC de probiótico, T1=1x10<sup>8</sup> UFC de probiótico, T0=Testigo.

**Tabla 7**

*Promedio  $\pm$  error estándar de la ganancia de peso de los terneros para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens durante 91 días*

Tiempo	Ganancia de Peso (g. animal. d <sup>-1</sup> )			p-valor
	T2	T1	T0	
				< 0.0001
d 0 al 7	382.86 $\pm$ 81.11	b 728.57 $\pm$ 41.65	a 451.43 $\pm$ 99.45	b
d 0 al 14	464.29 $\pm$ 83.76	b 585.72 $\pm$ 83.45	a 490.00 $\pm$ 105.19	ab
d 0 al 21	490.48 $\pm$ 85.05	a 557.14 $\pm$ 44.29	a 479.05 $\pm$ 89.88	a
d 0 al 28	528.57 $\pm$ 59.12	a 617.86 $\pm$ 19.23	a 520.71 $\pm$ 94.05	a
d 0 al 35	574.28 $\pm$ 57.75	a 608.57 $\pm$ 21.48	a 561.71 $\pm$ 85.76	a
d 0 al 42	623.81 $\pm$ 42.36	a 633.33 $\pm$ 22.08	a 630.00 $\pm$ 70.23	a

Tiempo	Ganancia de Peso (g. animal. d <sup>-1</sup> )			p-valor
	T2	T1	T0	
d 0 al 49	659.18 ± 27.30 a	651.02 ± 24.23 a	648.57 ± 60.82 a	< 0.0001
d 0 al 56	687.50 ± 17.4 a	653.57 ± 21.58 a	660.00 ± 38.86 a	
d 0 al 63	714.29 ± 17.92 a	655.55 ± 17.50 a	661.27 ± 32.12 a	
d 0 al 70	738.57 ± 14.57 a	677.14 ± 17.7 a	685.14 ± 23.83 a	
d 0 al 77	762.34 ± 17.62 a	680.52 ± 16.98 a	696.88 ± 17.73 a	
d 0 al 84	784.52 ± 14.38 a	685.71 ± 6.98 a	706.67 ± 13.41 a	
d 0 al Final	810.02 ± 14.16 a	717.58 ± 13.19 b	718.24 ± 9.91 b	

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

T2=1x10<sup>11</sup> UFC de probiótico, T1=1x10<sup>8</sup> UFC de probiótico, T0=Testigo; d= Día.

**Tabla 8**

*Promedio ± error estándar del consumo de alimento (balanceado) de los terneros para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens durante 91 días*

Tiempo	Consumo de alimento (kg)			p-valor
	T2	T1	T0	
0	0.12 ± 0.02 a	0.12 ± 0.01 a	0.13 ± 0.01 a	0.9996
7	0.28 ± 0.03 a	0.27 ± 0.04 a	0.26 ± 0.02 a	
14	1.45 ± 0.12 a	1.54 ± 0.05 a	1.38 ± 0.11 a	
21	2.28 ± 0.27 a	2.05 ± 0.13 a	2.02 ± 0.07 a	
28	2.79 ± 0.23 a	2.62 ± 0.19 a	2.54 ± 0.10 a	
35	3.40 ± 0.24 a	3.18 ± 0.09 a	3.28 ± 0.27 a	
42	4.52 ± 0.29 a	4.42 ± 0.19 a	4.36 ± 0.31 a	
49	5.46 ± 0.38 a	5.51 ± 0.21 a	5.32 ± 0.34 a	
56	6.02 ± 0.32 a	6.07 ± 0.24 a	6.05 ± 0.33 a	
63	7.18 ± 0.35 a	7.04 ± 0.18 a	7.25 ± 0.37 a	
70	8.20 ± 0.42 a	8.11 ± 0.18 a	8.19 ± 0.27 a	
77	9.31 ± 0.40 a	9.11 ± 0.15 a	9.11 ± 0.30 a	
84	10.32 ± 0.34 a	9.87 ± 0.20 a	9.98 ± 0.31 a	
91	11.23 ± 0.32 a	10.89 ± 0.19 a	10.77 ± 0.33 a	

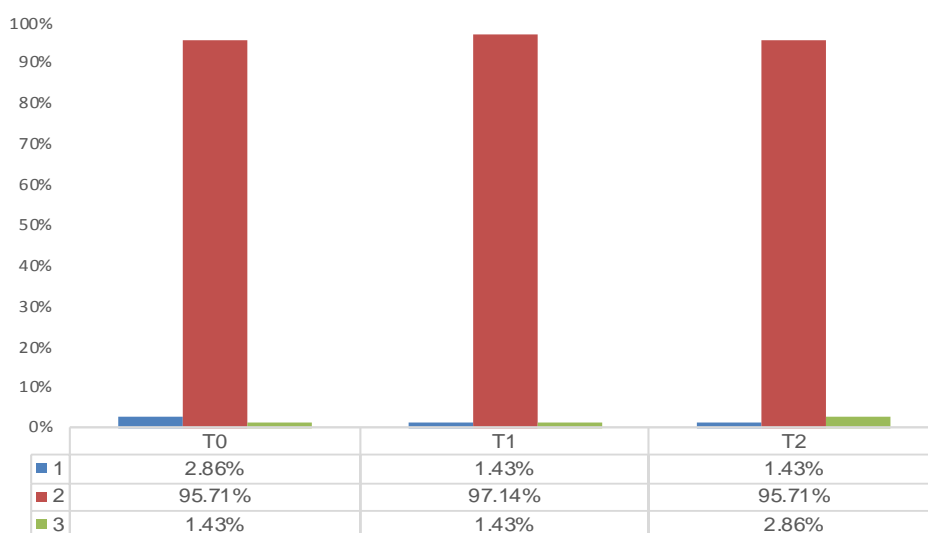
*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

T2=1x10<sup>11</sup> UFC de probiótico, T1=1x10<sup>8</sup> UFC de probiótico, T0=Testigo; d= Día

En el tratamiento T2, T1 y T0 predominaron los terneros con índice de condición corporal normal, obteniendo del total de animales 95.71%, 97.14%, 95.71%, respectivamente (Figura 10).

### Figura 10

Porcentaje de terneros con índice de condición corporal en los diferentes tratamientos



Nota. Rango: 1= ICC Flaco, 2= ICC Normal, 3= ICC Gordo

T0=Testigo, T1=1x10<sup>8</sup> UFC de probiótico, T2=1x10<sup>11</sup> UFC de probiótico.

### Parámetros fecales

El índice de consistencia fecal mostró diferencia significativa entre las dosis de probiótico ( $F_{2,12}= 4.14$ ;  $p=0.0430$ ). Los animales administrados 1x10<sup>11</sup> UFC de *Bacillus amyloliquefaciens* presentaron menor índice de consistencia fecal respecto al grupo testigo. (Tabla 9).

**Tabla 9**

*Promedio  $\pm$  error estándar del índice de consistencia fecal para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens*

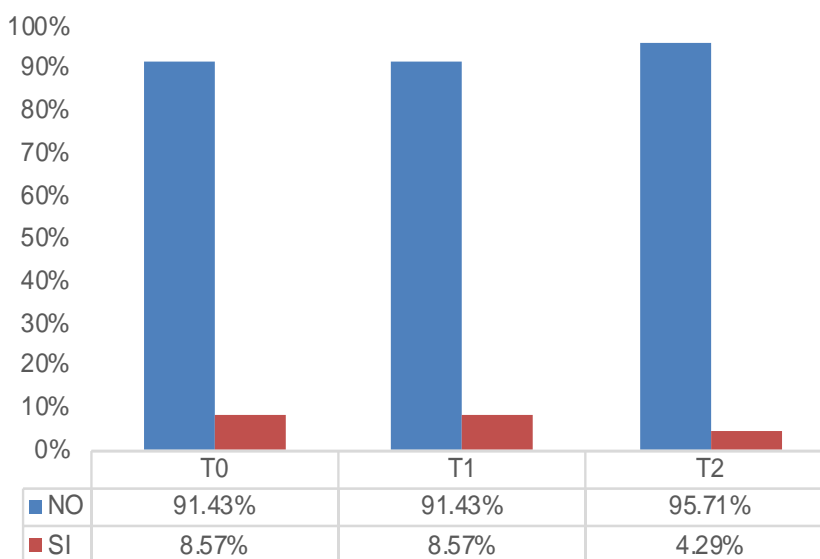
Tratamientos	ICF (%)	
T0	27.10 $\pm$ 0.62	a
T1	26.72 $\pm$ 0.29	ab
T2	25.49 $\pm$ 0.20	b
p-valor	0.0430	

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

En todos los tratamientos predominaron los animales con ausencia de episodios de diarreas, obteniéndose 95.71% T2, 91.43% T1, 91.43% T0. (Figura 11)

**Figura 11**

*Porcentaje de terneros con presencia de diarrea en los diferentes tratamientos*



*Nota.* T0=Testigo, T1=1x10<sup>8</sup> UFC de probiótico, T2=1x10<sup>11</sup> UFC de probiótico.

### Parámetros Hematológicos

El porcentaje de hematocrito mostró diferencia significativa entre las dosis de *B. amyloliquefaciens* ( $F_{2,12}=15.52$ ;  $p=0.0018$ ). También la proteína sérica total presentó

diferencia significativa para todos los tratamientos ( $F_{2,12}=6.68$ ;  $p=0.0197$ ). Los terneros inoculados con la dosis de  $1 \times 10^{11}$  UFC de *Bacillus amyloliquefaciens* (T2) presentaron mayor porcentaje de hematocrito y proteína total respecto a T1 y T0 (Tabla 10).

**Tabla 10**

*Promedio  $\pm$  error estándar del hematocrito (%) y proteína totales (g/dl) para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens*

Tratamientos	Hematocrito (%)		Proteína sérica total (g/dl)	
T2	42.8 $\pm$ 0.37	a	9.10 $\pm$ 0.07	a
T1	40.6 $\pm$ 0.40	b	8.86 $\pm$ 0.05	b
T0	40.0 $\pm$ 0.55	b	8.82 $\pm$ 0.06	b
p-valor	0.0018		0.0197	

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

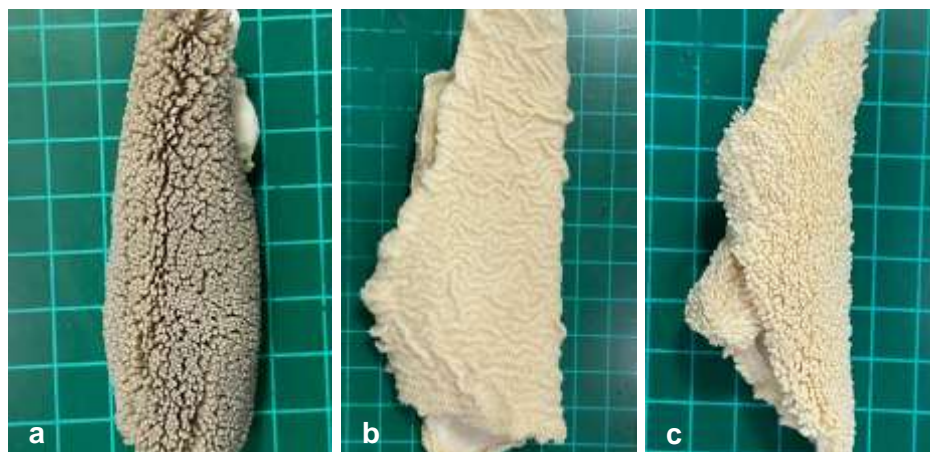
### Parámetros Histopatológicos

Las características macroscópicas y microscópicas son inherente para el rumen e intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), de los terneros sacrificados por cada tratamiento T2, T1 y T0, a los 91 días de vida (Tabla 11) (Figura 12).

**Figura 12**

*Observación macroscópica del rumen de los terneros con 91 días de edad:*

*a. Testigo (T0) b.  $1 \times 10^8$  UFC (T1) c.  $1 \times 10^{11}$  UFC (T2)*



**Tabla 11***Características clínicas de los diferentes órganos de los terneros en fase de lactancia*

Órgano	Tratamiento	Color	Forma	Vellosidad	Inflamación	Edema
Rumen	T2	Crema	Normal	0	0	0
	T1	Crema	Normal	0	0	0
	T0	Café	Anormal	0	1	0
Duodeno	T2	Crema	Normal	0	1	1
	T1	Crema	Normal	AT-2	2	2
	T0	Crema	Normal	AT-2	2	2
Yeyuno	T2	Crema	Normal	AT-1	1	1
	T1	Crema	Normal	AT-1	2	1
	T0	Crema	Normal	AT-1	2	2
Ileón	T2	Crema	Normal	AT-1	2	1
	T1	Crema	Normal	AT-2	2	2
	T0	Crema	Normal	AT-2	2	2

*Nota.* Rango: 0= Normal, 1=Leve, 2= Moderado, 3=Marcado; AT= Atrofiada.

### **Análisis microscópicos**

El ancho de papila ruminal (porción apical) y ancho de papila ruminal (porción basal) no presentaron diferencias significativas entre las diferentes dosis de probiótico ( $F_{2,12}=1.01$ ,  $p=0.4060$ ;  $F_{2,12}=0.62$ ,  $p=0.5638$ ). Sin embargo, se encontró diferencia significativa en el largo de la papila ruminal para las diferentes tratamientos ( $F_{2,12}=5.71$ ,  $p=0.0287$ ). El rumen con el tratamiento testigo (T0) presentó mayor longitud papila ruminal respecto a los demás tratamientos (Tabla 12) (Figura 13)

**Tabla 12**

*Promedio  $\pm$  error estándar del ancho de papila (porción apical), ancho de papila (porción basal) y largo de papila del rumen para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens*

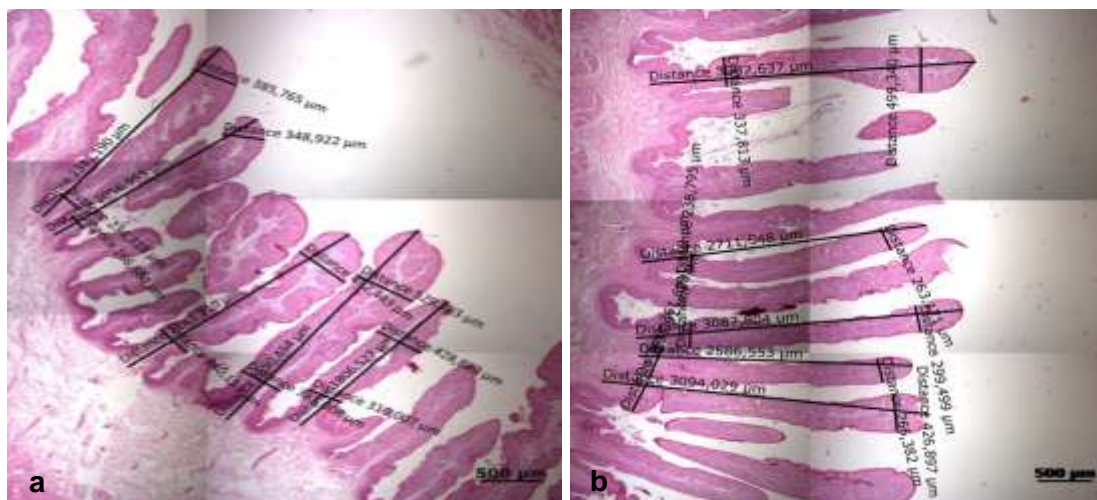
Tratamientos	AP-PAR ( $\mu\text{m}$ )		AP-PBR ( $\mu\text{m}$ )		LPR ( $\mu\text{m}$ )	
T2	443.70 $\pm$ 69.01	a	318.46 $\pm$ 23.79	a	2397.67 $\pm$ 126.70	b
T1	437.16 $\pm$ 33.26	a	286.81 $\pm$ 38.63	a	2215.70 $\pm$ 132.92	b
T0	351.06 $\pm$ 47.59	a	277.26 $\pm$ 19.05	a	2842.87 $\pm$ 155.92	a
p-valor	0.4060		0.5638		0.0287	

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

AP-PA= Ancho de la papila (porción apical) rumen, AP-PB= Ancho de la papila (porción basal) rumen, LP= Largo de la papila rumen.

**Figura 13**

*Sección histológica de las papilas ruminales y parte de la pared ruminal: a) Tejido del animal con aplicación de probiótico ( $1 \times 10^{11}$  UFC). b) Tejido del animal sin aplicación de probiótico (Testigo)*



El ancho de vellosidad (porción apical) y profundidad de cripta del duodeno no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $F_{2,12}=0.38$ ,  $p=0.6939$ ;  $F_{2,12}=1.83$ ,  $p=0.2217$ ). Sin embargo, se encontró diferencia significativa en el ancho de vellosidad (porción basal) y largo de vellosidad del duodeno para las diferentes dosis de probiótico ( $F_{2,12}=26.81$ ,  $p=0.0003$ ;  $F_{2,12}=6.44$ ,  $p=0.0216$ ).

El duodeno con la dosis  $1 \times 10^{11}$  UFC de probiótico (T2) presentó mayor longitud de vellosidad respecto a T1 y T0. También el órgano con la dosis  $1 \times 10^8$  UFC de probiótico presentó aumento en el ancho de vellosidad (porción basal) respecto a el tratamiento Testigo y a la dosis  $1 \times 10^{11}$  UFC (Tabla 13) (Figura 14).

**Tabla 13**

*Promedio  $\pm$  error estándar del ancho de vellosidad (porción apical), ancho de vellosidad (porción basal), largo de vellosidad y profundidad de cripta de duodeno para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens*

Tratamiento	AV-PAD ( $\mu\text{m}$ )	AV-PBD ( $\mu\text{m}$ )	LVD ( $\mu\text{m}$ )	PCD ( $\mu\text{m}$ )
T2	111.41 $\pm$ 8.04 a	104.65 $\pm$ 4.20 b	834.58 $\pm$ 55.92 a	484.8 $\pm$ 9.68 a
T1	103.10 $\pm$ 12.81 a	163.3 $\pm$ 10.19 a	704.79 $\pm$ 19.26 b	457.92 $\pm$ 9.32 a
T0	97.94 $\pm$ 11.56 a	99.67 $\pm$ 4.33 b	662.66 $\pm$ 20.85 b	500.36 $\pm$ 23.9 a
<b>p-valor</b>	0.6939	0.0003	0.0216	0.2217

*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

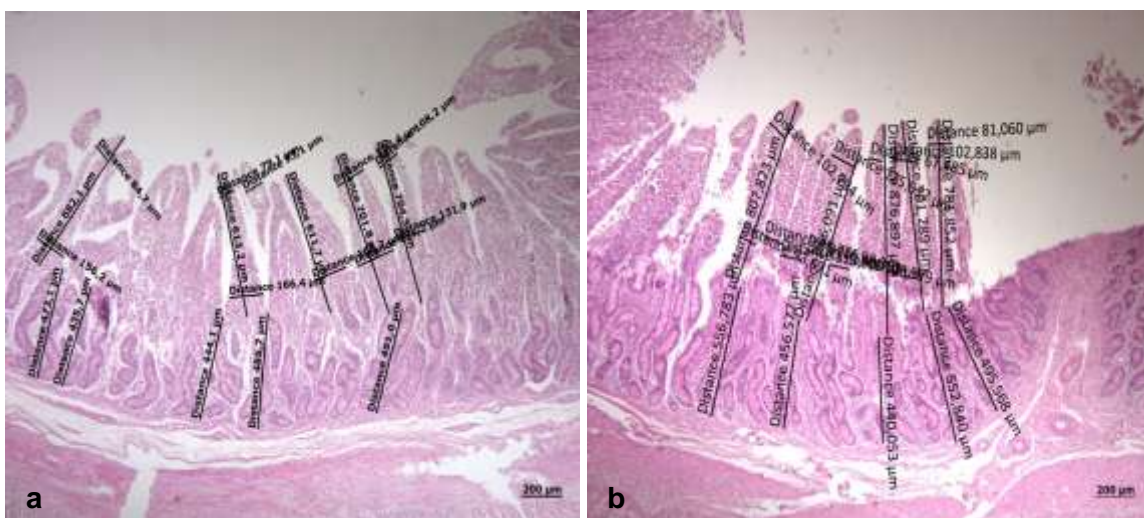
AV-PAD= Ancho vellosidad (porción apical) duodeno, AV-PBD= Ancho vellosidad (porción basal) duodeno, LVD= Largo vellosidad duodeno, PCD=Profundidad de cripta duodeno.



### Figura 14

Sección histológica de las vellosidades intestinales y parte de la pared del duodeno:

a) Tejido del animal con aplicación de probiótico ( $1 \times 10^{11}$  UFC). b) Tejido del animal sin aplicación de probiótico (Testigo)



El ancho de vellosidad (porción apical) y ancho de vellosidad (porción basal) del yeyuno no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $F_{2,12}=3.03$ ,  $p=0.1045$ ;  $F_{2,12}=2.22$ ,  $p=0.1712$ ). Sin embargo, se encontró diferencia significativa en el largo de vellosidad y profundidad de cripta del yeyuno para las diferentes dosis de probiótico ( $F_{2,12}=8.22$ ,  $p=0.0115$ ;  $F_{2,12}=14.29$ ,  $p=0.0023$ ).

El yeyuno con la dosis  $1 \times 10^{11}$  UFC de probiótico presentó mayor longitud de vellosidad y profundidad de cripta, respecto a la dosis  $1 \times 10^8$  UFC y Testigo (Tabla 14) (Figura 15).

**Tabla 14**

Promedio  $\pm$  error estándar del ancho de vellosidad (porción apical), ancho de vellosidad (porción basal), largo de vellosidad y profundidad de cripta de yeyuno para diferentes dosis de *Bacillus amyloliquefaciens*

Tratamiento	AV-PAY ( $\mu\text{m}$ )	AV-PBY ( $\mu\text{m}$ )	LVY ( $\mu\text{m}$ )	PCY ( $\mu\text{m}$ )
T2	153.59 $\pm$ 11.60 a	124.87 $\pm$ 10.10 a	919.71 $\pm$ 41.65 a	517.56 $\pm$ 31.15 a
T1	144.70 $\pm$ 21.60 a	95.54 $\pm$ 14.00 a	621.31 $\pm$ 28.94 b	391.71 $\pm$ 12.41 b
T0	101.45 $\pm$ 12.95 a	116.19 $\pm$ 4.99 a	749.2 $\pm$ 74.99 b	354.40 $\pm$ 20.26 b
p-valor	0.1045	0.1712	0.0115	0.0023

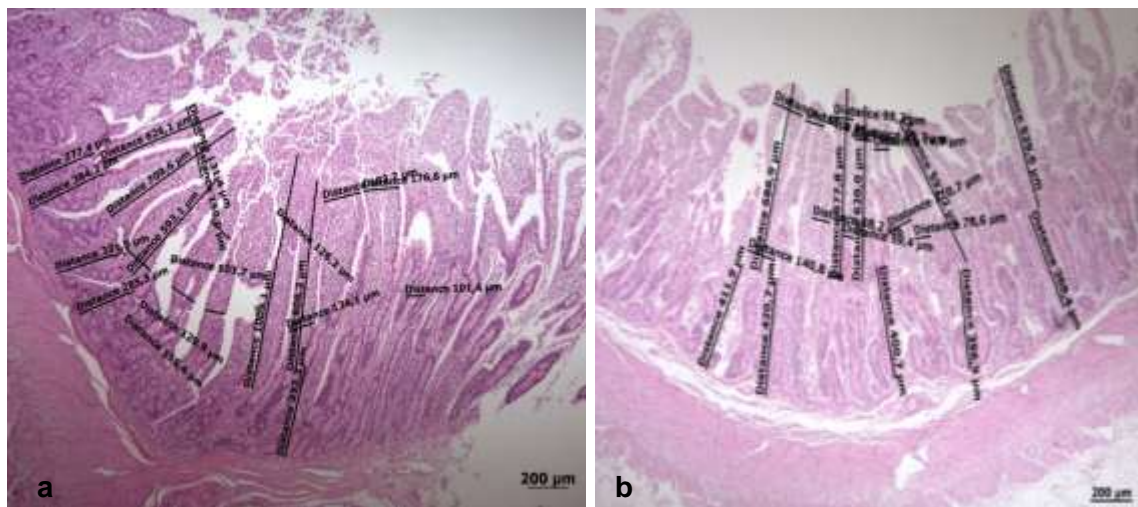
Nota. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

AV-PAY= Ancho vellosidad (porción apical) yeyuno, AV-PBY= Ancho vellosidad (porción basal) yeyuno, LVY= Largo vellosidad yeyuno, PCY=Profundidad de cripta yeyuno

**Figura 15**

Sección histológica de las vellosidades intestinales y parte de la pared del yeyuno:

a) Tejido del animal con aplicación de probiótico ( $1 \times 10^{11}$  UFC). b) Tejido del animal sin aplicación de probiótico (Testigo)



El ancho de vellosidad (porción basal) y profundidad de cripta del íleon no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ( $F_{2,12}= 1.18$ ;  $p=0.3547$ ;  $F_{2,12}=1.27$ ,  $p=0.3307$ ). Sin embargo, se encontró diferencia significativa en el ancho de vellosidad (porción apical) y largo de vellosidad del íleon para las todas las dosis de probiótico ( $F_{2,12}=5.71$ ,  $p=0.0287$ ;  $F_{2,12}=5.66$ ,  $p=0.0294$ ).

El íleon con la dosis más alta de *Bacillus amyloliquefaciens* presentó mayor ancho de vellosidad (porción apical) y largo de vellosidad, respecto a los demás tratamientos (Tabla 15) (Figura 16)

**Tabla 15**

*Promedio  $\pm$  error estándar del ancho de vellosidad (porción apical), ancho de vellosidad (porción basal), largo de vellosidad y profundidad de cripta de íleon para diferentes dosis de Bacillus amyloliquefaciens*

Tratamiento	AV-PAI ( $\mu\text{m}$ )	AV-PBI ( $\mu\text{m}$ )	LVI ( $\mu\text{m}$ )	PCI ( $\mu\text{m}$ )
T2	158.65 $\pm$ 6.71 a	162.23 $\pm$ 20.24 a	712.12 $\pm$ 17.63 a	616.69 $\pm$ 13.47 a
T1	118.94 $\pm$ 4.05 b	145.71 $\pm$ 20.14 a	582.14 $\pm$ 47.03 b	580.68 $\pm$ 59.31 a
T0	111.77 $\pm$ 20.68 b	124.94 $\pm$ 8.35 a	538.16 $\pm$ 51.39 b	532.01 $\pm$ 30.03 a
<b>p-valor</b>	0.0287	0.3547	0.0294	0.3307

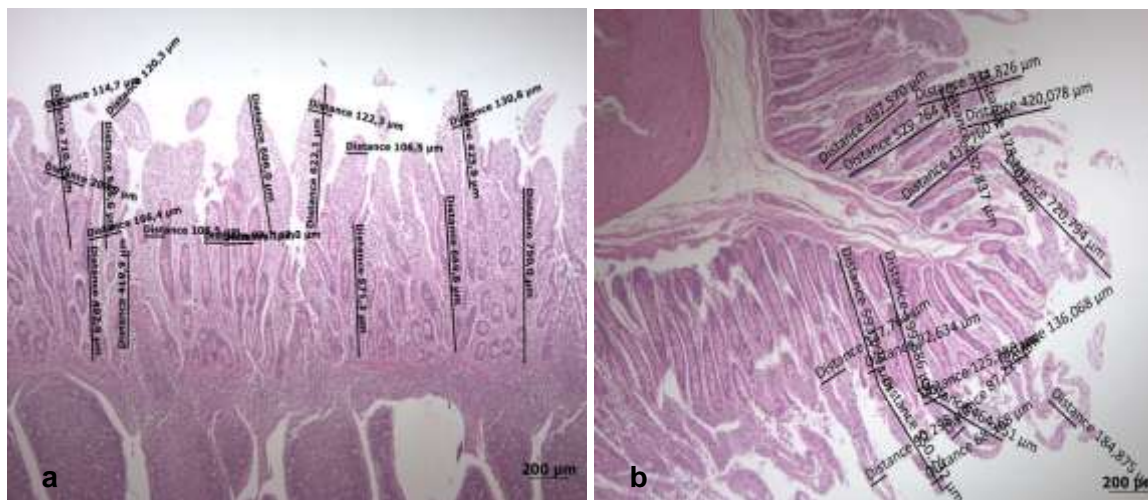
*Nota.* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

AV-PAI= Ancho vellosidad (porción apical) íleon, AV-PBI= Ancho vellosidad (porción basal) íleon, LVI= Largo vellosidad íleon, PCI=Profundidad de cripta íleon.

### Figura 16

Sección histológica de las vellosidades intestinales y parte de la pared del íleon:

a) Tejido del animal con aplicación de probiótico ( $1 \times 10^{11}$  UFC). b) Tejido del animal sin aplicación de probiótico (Testigo)



### Discusión

En la presente investigación con la dosis  $1 \times 10^{11}$  UFC de *Bacillus amyloliquefaciens*, existe un incremento de 810.02 g en peso y 39.4 cm en altura presentando una tendencia creciente durante los 91 días de la fase de lactancia. Los resultados obtenidos concuerdan con Le et al. (2017), donde al suministrar probiótico de la cepa H57 de *Bacillus amyloliquefaciens* sobre parámetro productivos, se hizo evidente una ganancia del 40% más de peso vivo (12.4 kg) y crecimiento de 39.6% más rápido que los terneros del grupo control a las 13 semanas de vida.

De la misma forma Ji et al. (2013), afirmaron que la implementación de *Bacillus amyloliquefaciens* en la dieta de lechones destetados, aumenta el peso corporal final y ganancia de peso diaria de los animales, en un 7.69% y 11.85% respectivamente.

Lo señalado no concuerda con estudios realizados por Le (2018), donde se probó sustituto de leche mezclado con el inóculo H57 ( $2 \times 10^8$  UFC), en el cual la diferencia no fue significativa, por ende, no identificó una mejora en la ganancia de peso y crecimiento del animal, lo que demuestra que los efectos de la suplementación con probióticos son muy variables dependiendo de los factores ambientales, la carga de patógenos y el estrés animal (Frizzo et al., 2011).

La crianza de terneros es la parte más crítica y delicada en la industria láctea, debido a sus altos índices de mortalidad y la pérdida de peso de los animales, causada por la diarrea, la cual es la principal enfermedad que afecta a los neonatos en fase de lactancia (Kayasaki et al. 2020).

Los episodios de diarrea disminuyeron en un 90% en todas las terneras y el índice de consistencia fecal (ICF) fue menor en el grupo de animales inoculados con  $10^{11}$  UFC de probiótico, con estos resultados se corrobora lo indicado por Frizzo et al. (2011), que al incluir bacterias ácido lácticas y lactosa en la dieta de terneras, promueve la disminución del ICF a partir de la primera semana, siendo constante hasta el final del experimento a los 35 días.

De la misma forma Le et al. (2017), mencionan que la cepa H57 redujo el riesgo de diarrea, con 1.33 veces menos números de casos que los animales del grupo control, la duración promedio de cada evento de diarrea fue 2 días y también se indica la disminución del número total de diarreas, en 4.5 días durante el tiempo de lactancia.

Así, los terneros inoculados por suplementos tienen mejores puntajes de salud fecal y en general (Harris et al., 2017), también tienen tasas reducidas de mortalidad, casos de diarrea y casos febriles (Magalhães et al., 2008). Por otro lado existe una

menor incidencia de diarreas graves y una tendencia a reducir los tratamientos con antibióticos (Villot et al., 2019).

El descenso de los episodios de diarrea en neonatos también fue encontrada por Aldan et al. (2009), sin embargo no encontró una asociación con la mejora de crecimiento del animal. Las diarreas promueven el letargo y la pérdida progresiva de apetito, lo que trae como consecuencia la reducción de los parámetros productivos en temprana edad.

Durante la investigación uno de los parámetros productivos que se evaluó fue el consumo de alimento, en el que no se observó una diferencia significativa entre los tratamientos, difiriendo con Aliakbarpour et al. (2018), al referirse que la implementación de las bacterias ácido lácticas, *Codyuven* el aumento de consumo de alimento ingerido al igual que la ganancia de peso de terneros, mejorando así la nutrición del animal a edad temprana.

El uso *B. amyloliquefaciens* tuvo resultados positivos en los parámetros sanguíneos, evidenciándose un aumento de glóbulos rojos en 2.8% y un nivel de proteína total en 0.28 g/dl en comparación del grupo testigo. Se presentaron datos similares en el estudio de Khaziakhmeto et al. (2020), que muestra un incremento de glóbulos rojos en un 1,7% y de proteína total en un 4.3%, con la adición del probiótico Normosil en la dieta de los neonatos.

La cantidad adecuada de glóbulos rojos es favorecedor en el organismo porque ayuda al transporte con mayor eficacia de las moléculas nutricionales para las células así como para la oxigenación de tejidos (Knowles et al., 2010). El aumento de hematocrito es una función característica del probiótico, evitando alcanzar los niveles de deshidratación en el animal (Aldana et al., 2009).

Al realizar un estudio microscópico de los tejidos tratados con la dosis más alta de *Bacillus amyloliquefaciens*, se evidenció un mejoramiento en el longitud de las vellosidades intestinales, sin embargo no se observó un desarrollo en la longitud de las papilas ruminales . Zhang et al. (2020), establecen la importancia de las bacterias *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus pumilus*, con el potencial probiótico, que tienden al aumento considerable en la altura de vellosidades en el duodeno y el yeyuno, el ancho de las vellosidades en el íleon, inclusive la longitud de las papilas ruminales, respecto al grupo control,

En el tracto digestivo, las papilas y las vellosidades son elementos claves para la absorción de nutrientes, necesario para el incremento del rendimiento (Suo et al., 2012). La influencia del rumen e intestino delgado en la digestión esta estrechamente relacionado con la estructura de la mucosa, particularmente la forma y tamaño de las papilas ruminales, al igual de las vollesidades del intestino delgado (Thomsen et al., 2006).

El intestino tiene una capa de células que separa el lumen del intestino, y la implementación con probióticos mejoran la integridad de la barrera intestinal, lo que permite la reducción de la infiltración de antígenos lumbinales tóxicos y bacterias (Liehr et al., 2017). La interacción probiótico-huésped en la superficie de la mucosa intestinal se convierte en una modulación sistémica de la función inmunológica del ternero en crecimiento (Cangiano et al., 2020)

El modo de acción de las bacterias probóticas puede ser específico según la especie y la cepa; por lo tanto, la suplementación en terneros, tiene mejores resultados en la salud, debido a sus características y efectos específicos (Cangiano et al., 2020).

Claramente, estos efectos beneficiosos sobre la salud resultan en una mayor rentabilidad, incluso sin mejoras en el rendimiento del crecimiento, debido a una reducción de los costos de crianza (Magalhães et al., 2008).



## Capítulo V

### Conclusiones y recomendaciones

#### Conclusiones

- Con la inclusión de *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa 5L22-01) vía oral, se registraron menores episodios diarreicos en los animales tratados, así como también se registró mayor tamaño, mayor peso corporal e índice de condición corporal normal.
- La inoculación de  $1 \times 10^{11}$  UFC de *Bacillus amyloliquefaciens* en los animales, disminuyó de manera significativa los índices de consistencia fecal (ICF=25.49 %) y los episodios de diarreas (ED=4.29 %), así como también mejoró los parámetros productivos (Peso=112.30 kg; Altura= 108.8 cm; GP= 810.02; ICC= 2), mientras que el consumo de alimento se mantuvo igual en todos los tratamientos.
- La alimentación de las terneras en fase de lactancia en base a la suplementación de la mayor dosis de probiótico, indujo a un mejoramiento en los parámetros hematológicos (Hematocrito=42.80 %; Proteína=9.10 g/dl).
- La inclusión de  $1 \times 10^{11}$  UFC de *Bacillus amyloliquefaciens*, benefició significativamente en el desarrollo de las secciones del intestino delgado en largo de vellosidad duodeno (LVD=834.58  $\mu\text{m}$ ), largo de vellosidad yeyuno (LVY=919.71  $\mu\text{m}$ ) y largo de vellosidad íleon (LVI= 712.12  $\mu\text{m}$ ), sin embargo no se observó un mejoramiento en la histología ruminal.

## Recomendaciones

- Inocular el probiótico a base de *Bacillus amyloliquefaciens* en concentraciones  $1 \times 10^{11}$  UFC (T2) en la fase de lactancia para mejorar el rendimiento y parámetros productivos de los terneros.
- Se recomienda establecer un plan sanitario y desparasitación previa de los animales para generar inmunidad activa.
- Desafiar a los animales con enteropatógenos para obtener resultados específicos de la acción del probiótico en la incidencia diarreas.
- Elaborar estudios complementarios con mayores concentraciones bacterianas, para determinar el potencial del probiótico en la histología ruminal.

### Bibliografía

- Adams, M., Luo, J., Rayward, D., King, S., Gibson, R., Moghaddam, G. (2007).  
Selection of a novel direct-fed microbial to enhance weight gain in intensively reared calves. *Animal Feed Science and Technology*, 41–52.
- Alawneh, J., Barreto, M., Moore, R., Soust, M., Al-Harbi, H., James, A., Krishnan, D., Olchow, T. (2020). Systematic review of an intervention: the use of probiotics to improve health and productivity of calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 105147.
- Aldana, C., Cabra, S., Ospina, C., Carvajal, F., Rodríguez, F. (2009). Effect of a Probiotic Compound in Rumen Development, Diarrhea Incidence and Weight Gain in Young Holstein Calves. 3(9).
- Al-Deriny, S., Dawood, M., Abou Zaid, A., Wael, F., Paray, B., Van Doan, H., Mohamed, R. (2020). The synergistic effects of *Spirulina platensis* and *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal histomorphology, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Reports*, 17, 100390.
- Aliakbarpour, H., Chashnidel, Y. (2018). The Effect of Lactic Acid Bacteria Based Probiotic use Schedule on Growth Performance and Blood Cell Antimicrobial Activity in Kurd Calves. 55-61.
- Anderson, D., Rings, M. (2008). *Current Veterinary Therapy: Food Animal Practice, Fifth Volume*. Saunders.
- Andrews, A., Blowey, R., Boyd, H., Eddy, R. (2008). *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle*. John Wiley & Sons.
- Arce, M. (2009). Norma climática y distribución de la precipitación de la hacienda El Prado-IASA, serire 1998-2008. *Serie Zoológica*.

- Arcuri, P., Campos, O., Lopes, F., Carneiro, J. (2006). Utilização de probióticos e prebióticos em rações de bovinos. *Minerais e aditivos para bovinos*, 293-320.
- Aspinall, V., Cappello, M. (2020). *Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology 4th Edition*. CABI.
- Bahari, M. (2017). A review on the consumption of probiotics in feeding young ruminants. *Appro Poultr Dairy & Vet Sci*, 1-3.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 6(2), 160-174.
- Caixeta, D., do Carmo, J. . (2020). Criação de bezerros neonatos: manejo e bem estar. *Scientia Generalis*, 1(3), 92-103.
- Calvopiña, A., León, V. (2007). Estudio de lasuplementación de tres niveles de grasa sobrepasante en la alimentaciónde vacas lactantes Holstein friesian, Aloasi-Pichincha. 1-12..
- Cangiano, L., Yohe, T., Steele, M., Renaud, D. (2020). Invited Review: Strategic use of microbial-based probiotics and prebiotics in dairy calf rearing. *Applied Animal Science*, 36(5), 630-651.
- Chaves, A., Limoni, B., Gomes, M., Duarte, M., Brixner, B., Soares, E. (2017). Açãs bovinas e a qualidade da carne . *Anais X Mostra Científica*, 294-300.
- Collins, M., Gibson, G. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American journal of clinical nutrition*, 1052-1057.
- Curbelo, Y. G., García, Y., López, A., Boucourt, R. (2005). Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 39(2), 29-140.

- Donald, M., Zachary, J. (2011). *Pathologic Basis of Veterinary Disease 5th Edition*. Mosby.
- Fairbrother, J., Nadeau, É., Gyles, C. (2005). Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. 6(1), 17.
- Fonseca, B., Beletti, M., Silva, M., Silva, P., Duarte, I., Rossi, D. (2010). Microbiota of the cecum, ileum morphometry, pH of the crop and performance of broiler chickens supplemented with probiotics. *Revista Brasileira de zootecnia*, 756-1760.
- Food and Agriculture Organization of the United Nation. (2017). Ecuador advances towards climate-smart livestock.
- Frizzo, L., Soto, L., Zbrun, M. V., Signorini, M., Bertozzi, E., Sequeira, G., Rosmini, M. (2011). Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves. *Livestock Science*.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*, 365-378.
- Galvão, K., Santos, J., Coscioni, A., Villaseñor, M., Sicho, W., Berge, A. (2005). Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal Escherichia coli. *Reproduction Nutrition Development*, 427-440.
- Gewehr, C., Lawisch, A. (2003). Antibióticos na nutrição animal. *Agropecuária Catarinense*, 43-46.
- Gonçalves, D., Do Carmo, J. (2020). Criação de bezerros neonatos: manejo e bem estar. 1(3), 92-103.

- Guanochanga, E. (2019). Evaluación del potencial antagónico in vitro, de bacterias ácido lácticas aisladas e identificadas molecularmente del contenido ruminal de vacas fistuladas.
- Hammack, S. (2008). Texas adapted genetic strategies for beef cattle V: Type and breed characteristics and uses. Texas FARMER Collection.
- Harris, T., Liang, Y., Sharon, K., Sellers, M., Yoon, I., Scott, M. , Ballou, M. (2017). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products, SmartCare in milk replacer and Original XPC in calf starter, on the performance and health of preweaned Holstein calves challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Journal of dairy science*, 100(9), 7154-7164.
- Hill, C., Guarner,F., Reid,G., Gibson, G., Merenstein,D., Pot,B., Morelli,L., Berni,R.,Flint,H. , Salminen,S., Calder,P.,Sanders,M. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepato*, 11:506–14.
- Hong, H., Duc, L.,Cutting, S. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS microbiology reviews*, 813-835.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC. (2018). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua.
- Jatkauskas, J., Vrotniakiene, V. (2010). Effects of probiotic dietary supplementation on diarrhoea patterns, faecal microbiota and performance of early weaned calves. *Veterinari Medicina*, 494-503.
- Ji, J., Hu, S., Zheng, M., Du, W., Shang, Q., Li, W. (2013). *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 inhibits ETEC-induced pro-inflammatory responses by suppression of

MAPK signaling pathways in IPEC-1 cells and diarrhea in weaned piglets.

*Livestock Science*, 158(1-3), págs. 206-214.

Kaewklom, S., Lumlert, S., Kraikul, W., Aunpad, R. (2013). Control of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage using a novel bacteriocin, amysin, produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from Thai shrimp paste (Kapi).

*Food Control*, 552-557.

Kayasaki, F., Okagawa, T., Konnai, S., Kohara, J., Sajiki, Y., Watari, K., Minato, E. (2020). Direct evidence of preventive effect of severe diarrhea in calf by milk replacer-based probiotic feeding.

Khaziakhmetov, F., Khabirov, A., Tagirov, K., Avzalov, R., Tsapalova, G., & Basharov, A. (2020). The influence of “Stimix Zoostim” and “Normosil” probiotics on fecal microflora, hematologic indicators, nutrient digestibility, and growth of mother-bonded calves. *Veterinary World*, 13(6), 1091.

Knowles, T., Edwards, J., Bazeley, K., Brown, S., Butterworth, A., Warriss, P. (2010). Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *147(2)*, 593-598.

Lai, Y., Luo, M., Zhu, F. (2020). Dietary *Bacillus amyloliquefaciens* enhance survival of white spot syndrome virus infected crayfish. *Fish & Shellfish Immunology*.

Le, O., Dart, P., Harper, K., Zhang, D., Schofield, B., Callaghan, M., McNeill, D. (2017). Effect of probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* strain H57 on productivity and the incidence of diarrhoea in dairy calves. *Animal Production Science*, págs. 912-919.

Le, T. (2018). Response of ruminant health and growth to the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens*.

- Li, Y., Zhang, H., Su, W., Ying, Z., Chen, Y., Zhang, L., Wang, T. (2018). Effects of dietary *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation on growth performance, intestinal morphology, inflammatory response, and microbiota of intra-uterine growth retarded weanling piglets. *Journal of animal science and biotechnology*, 9(1), 22.
- Liehr, M., Mereu, A., Pastor, J., Quintela, J., Staats, S., Rimbach, G., Ipharraguerre, I. (2017). live oil bioactives protect pigs against experimentally-induced chronic inflammation independently of alterations in gut microbiota. *PLoS One*, 12(3), e0174239.
- Magalhães, V., Susca, F., Lima, F., Branco, A., Yoon, I., Santos, J. (2008). Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *Journal of dairy science*, 91(4), 1497-1509.
- Mahdhi, A., Esteban, M., Hmila, Z., Bekir, K., Kamoun, F., Bakhrouf, A., Krifi, B. (2012). Survival and retention of the probiotic properties of *Bacillus* sp. strains under marine stress starvation conditions and their potential use as a probiotic in *Artemia* culture. *Veterinary Science*, 1151-1159.
- Markowiak, P., Śliżewska, K. (2018). The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*.
- Martini, P. (2018). Manejo e criação de bezerros leiteiros no município de Cassilândia-ms. *Anais do semex*, 1(1).
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. (2015). La Política Agropecuaria Ecuatoriana Parte 1. In Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.



- Priest, F., Goodfellow, M., Shute, L. A., Berkeley, R. (1987). *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(1), 9-71.
- Samli, H. E., Senkoylu, N., Koc, F., Kanter, M., Agma, A. (2007). Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. *Archives of animal nutrition*, 61(1), 42-49.
- Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., Thaker, V. (2011). Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 287-S290.
- Soccol, C., Vandenberghe, L., Spier, M., Medeiros, A., Yamaguishi, C., Lindner, J., Pandey, A., Thomaz-Soccol, V. (2010). The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 413-434.
- Sun, P., Wang, J., Zhang, H. (2010). Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. 93(12), 5851-5855.
- Suo, C., Yin, Y., Wang, X., Lou, X., Song, D., Wang, X., Gu, Q. (2012). Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. *BMC Veterinary Research*, 8(1), pág. 89.
- Thomsen, L., Knudsen, K., Hedemann, M., Roepstorff, A. (2006). The effect of dietary carbohydrates and *Trichuris suis* infection on pig large intestine tissue structure, epithelial cell proliferation and mucin characteristics. 142(1-2), 112-122.
- Toquanto, J. (2018). Onfalopatias em Ruminantes e Relato de Persistência de Úraco em Bezerra da Raça Nelore.
- Uyeno Y, Sekiguchi Y and Kamagata Y. (2010). rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. *Lett Appl Microbiol*, 51:570–577.

- Villot, C., Ma, T., Renaud, D., Ghaffari, M., Gibson, D. , Skidmore, A., Steele, M. (2019). *Saccharomyces cerevisiae* boulardii CNCM I-1079 affects health, growth, and fecal microbiota in milk-fed veal calves. *Journal of dairy science*, 102(8), 7011-7025.
- Welker, N., Campbell, I. (1967). Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 1124-1130.
- Yirga, H. (2015). The use of probiotics in animal nutrition. *J.Prob. Health*, 1-10.
- Zhang, N., Wang, L., Wei, Y. (2020). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus pumilus* on Rumen and Intestine Morphology and Microbiota in Weanling Jintang Black Goat. *Animals*, 10(9), pág. 1604.