



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO EN BOVINOS HOLSTEIN

YESENIA CABALLERO CERVANTES

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

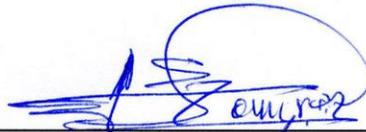
2014

La presente tesis titulada: **Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico de bovinos Holstein**, realizada por la alumna: **Yesenia Caballero Cervantes**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca

ASESOR



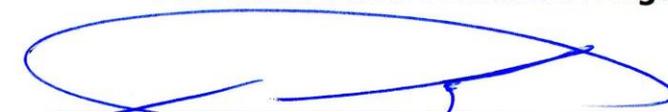
Dr. David Hernández Sánchez

ASESORA



Ph. D. Ana María Hernández Anguiano

ASESOR



Ph. D. David Espinosa Victoria

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo de 2014.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL PROBIÓTICO DE BOVINOS HOLSTEIN

Yesenia Caballero Cervantes, MC

Colegio de Postgraduados, 2014.

RESUMEN

El principal problema de salud en becerras de reemplazo son las diarreas provocadas por *Escherichia coli* enterotóxica. El uso de microorganismos pertenecientes al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) en la etapa de lactancia es benéfico para combatir la incidencia de diarreas e incrementar la ganancia de peso. Sin embargo, se ha reportado inconsistencia en los efectos benéficos de los productos comerciales. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue aislar y seleccionar BAL con potencial probiótico de mucosa oral de becerros lactantes, calostro y leche de vacas Holstein que puedan ser consideradas para el suministro de becerras en México. Para ello, se realizó el aislamiento en caldo Man Rogosa Sharp (MRS) y en agar MRS para la obtención de colonias puras, se establecieron pruebas morfológicas y bioquímicas para su identificación. En base a su morfología de bacilos y cocobacilos se seleccionaron cepas para ser sometidas a condiciones de pH ácido (4.0 y 4.5) usando HCl al 1N y sales biliares (0.3 y 1.5 g de Ovgall) para valorar su resistencia a ambas condiciones. En este estudio fueron seleccionadas 27 cepas ácido lácticas, por sus características morfológicas y bioquímicas, pero finalmente solo se seleccionaron siete cepas; dos de leche (V1/CP, V1/C2 CP), tres de calostro (V2/1 R.X, V3/1R.X, V5/3C2 R.X) y dos de mucosa oral (B1O/1-2MB2, B3O/1-1AB) por su potencial probiotico. Estas se identificaron mediante el Sistema API50CHL como *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* *Leuconostoc mesenteriodes*, *Lactobacillus salivarius* y *L. plantarum*. En conclusión, todas las cepas aisladas del ganado Holstein coincidieron positivamente con las características morfológicas y bioquímicas de las bacterias ácido lácticas, además las siete cepas seleccionadas mostraron la mayor resistencia y capacidad de crecimiento a pH 4.0 y a las dos concentraciones de sales biliares (0.3 y 1.5 g).

Palabras claves: becerras, *Lactobacillus*, cepas, resistencia.

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria with Probiotic Potential in Holstein Cows

Abstract

The main health problem in replacement heifers is diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. The use of organisms belonging to the lactic acid bacteria (LAB) during milking is beneficial to combat diarrhea incidence and increase weight gain. However, inconsistencies have been reported in the beneficial effects of commercial products. Because of this, the objective of this study was to isolate LAB with a probiotic potential from the oral mucosa of lactating calves, colostrum, and milk from Holstein cows that can be considered for heifers in Mexico. For this, isolation was done in Man Rogosa Sharp (MRS) broth and MRS agar to obtain pure colonies. Morphological and biochemical tests were run to identify them. Based on morphology of the bacilli and coccobacilli, strains were collected to be subjected to acid pH (4.0 and 4.5) conditions using HCl at 1N and bile salts (0.3 and 1.5 g Oxygall) to assess their resistance to both conditions. In this study, 27 lactic acid strains were selected based on their morphological and biochemical characteristics. Finally, only seven strains were selected: two from milk (V1/CP, V1 C2 CP), three from colostrum (V2/1 R.X, V3/1R.X, V5/3C2 R.X), and two from oral mucosa (B1O/1-2MB2, B3O/1-1AB), due to their probiotic potential. These were identified through the API50CHL System as *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus salivarius*, and *L. plantarum*. In Conclusion, all the strains isolated from Holstein cows positively coincided with the morphological and biochemical characteristics of lactic acid bacteria. Moreover, the seven selected strains showed the greatest resistance and growth capacity at pH 4.0 and both bile salt concentrations (0.3 and 1.5 g).

Key words: heifers, *Lactobacillus*, strains, resistance

DEDICATORIA

A mis Padres y hermanos por su amor y comprensión.

A mis hermanas Abelina y Maribel Caballero por su confianza y apoyo incondicional para poder realizar mis estudios profesionales ya que sin ellas no hubiera sido posible.

A todos mis sobrinos y sobrinas sin excepción con todo mi amor ya que son parte fundamental de mi vida.

A mi amigo Gabriel Lira por su amistad, enseñanzas y consejos que desde hace muchos años me ofrece y que han sido muy importantes para mi vida profesional.

En especial a la Dra. Guillermina Bañuelos ya que gracias a su motivación y ayuda me decidí a vivir esta nueva experiencia.

A mi amiga Paty Landa por su amistad y por compartir conmigo sus conocimientos pero sobre todo por trabajar en mi proyecto como si fuera suyo.

Con todo mi afecto a mis amigos de Ganadería: Sara, Haydee, Rox y Julio que siempre estuvieron apoyándome y compartiendo momentos especiales e inolvidables.

A Don Agustín del laboratorio de Microbiología, por su amistad. A Anita (personal administrativo) por su ayuda de siempre, desde el primer día que llegue a Ganadería. Y a mis amigas que encontré en el laboratorio 222 de Fitopatología, por su apoyo.

A todos ustedes muchas gracias por estar en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS simplemente por todo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 442752 otorgada, que hizo posible la realización de mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados y al Programa de Ganadería por darme la oportunidad de formar parte del grupo. A la línea 7 LPI: Inocuidad, Calidad de alimentos y Bioseguridad del Colegio de Postgraduados, por financiar parte de este proyecto,

A la Dra. Blanca E. García Almendárez, Profesor-Investigador de la Universidad Autónoma de Querétaro. Por haber aportado la cepa control *L.casei*.

A mi Consejero el Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca por la confianza que tuvo en mí y por su apoyo en todo el periodo de maestría.

Muy especialmente a mi asesora la *Ph. D.* Ana María Hernández Anguiano, del Posgrado de Fitosanidad, por adoptarme y recibirme en su laboratorio, por sus enseñanzas y su paciencia, por sus consejos y por motivarme siempre a dar lo mejor de mi, ya que gracias a su dedicación y ayuda fue posible presentar mi proyecto en dos Congresos Internacionales.

En especial a mi asesor el *Ph. D.* David Espinosa Victoria por aceptar formar parte de mi Consejo pues su apoyo y colaboración fue fundamental para todo el desarrollo de mi proyecto de investigación.

Al Dr. David Hernández, por su apoyo y asesoría.

Al Dr. José Guadalupe Herrera Haro, por su valiosa ayuda y paciencia.

A todos Gracias.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	3
III. OBJETIVOS	4
IV. HIPÓTESIS	4
V. REVISIÓN DE LITERATURA	5
5.1 Sistema digestivo de becerros lactantes.....	5
5.1.2 Fisiología de la microbiota intestinal.....	8
5.2 Probióticos.....	11
5.2.1 Historia y definición de los probióticos.....	11
5.2.2 Los probióticos y la salud.....	12
5.2.3 Bacterias potencialmente probióticas.....	13
5.2.4 Bacterias ácido lácticas.....	14
5.2.5 Respuesta ácido tolerante de <i>Lactobacillus</i>	19
5.2.6 Actividad probiótica en el animal.....	20
5.2.7 Mecanismo de acción de los probióticos.....	23
5.3 Métodos de identificación para bacterias probióticas.....	24
5.4 Criterios para la evaluación de los probióticos.....	24
5.5 Guía para la evaluación de los probióticos.....	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Aislamiento de bacterias probióticas a partir de muestras de mucosa oral de becerros de leche y calostro de vacas Holstein.....	27
6.2 Selección y evaluación de bacterias con potencial probiótico de acuerdo a características morfológicas de las cepas y pruebas bioquímicas.....	31
6.3 Determinación de la resistencia y supervivencia de las cepas seleccionadas a condiciones de pH ácido y a sales biliares.....	35
6.4 Identificación bioquímica de las cepas mediante el sistema API50CHL y colección de cepas con potencial probiótico.....	38
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1 Aislamiento y selección de colonias con características de bacterias ácido lácticas.....	42
7.2 Selección y evaluación de bacterias con potencial probiótico de acuerdo a características morfológicas y pruebas bioquímicas.....	45

7.3 Resistencia y supervivencia de las cepas seleccionadas a condiciones de pH ácido	49
7.3.1 Resistencia y supervivencia de las cepas ácido lácticas a la exposición a sales biliares.....	53
7.4 Identificación bioquímica de las cepas mediante el sistema API50CHL y colección de cepas con potencial probiótico.....	57
VIII. CONCLUSIÓN	62
IX. LITERATURA CITADA.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Áreas anatómicas más colonizadas por bacterias	6
Cuadro 2. Probióticos estudiados para su uso en la alimentación animal.....	14
Cuadro 3. Total de muestras tomadas de ganado Holstein para el aislamiento de bacterias ácido lácticas.....	29
Cuadro 4. Medio de pre-enriquecimiento y condiciones de incubación de las muestras obtenidas de mucosa oral, leche y calostro.....	30
Cuadro 5. Condiciones de cultivo en placa	31
Cuadro 6. Condiciones de activación de las cepas control.....	32
Cuadro 7. Cepas seleccionadas para la prueba de resistencia y supervivencia pH ácido.....	36
Cuadro 8. Cepas ácido lácticas expuestas a sales biliares (Oxgall).....	38
Cuadro 9. Sustratos contenidos en la galería API50CHL	41
Cuadro 10. Cepas ácido lácticas seleccionadas en base a su morfología colonial	44
Cuadro 11. Resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a cepas procedentes de mucosa oral de becerros Holstein (condiciones aerobias).....	45
Cuadro 12. Pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a cepas procedentes de mucosa oral de becerros Holstein (condiciones anaerobias).....	46
Cuadro 13. Resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a cepas de leche y calostro de ganado Holstein.....	47
Cuadro 14. Recuento de colonias recuperadas en agar MRS, después de la exposición a pH ácido.....	50
Cuadro 15. Promedios de densidad óptica de las cepas ácido lácticas crecidas por 24 h en dos concentraciones de sales biliares.....	53
Cuadro 16. Comparación de medias entre tratamientos y tiempos.....	54

Cuadro 17. Incremento en el crecimiento (DO) de cepas ácido lácticas expuestas a sales biliares (SB) con respecto al inóculo inicial.....	55
Cuadro 18. Identificación bioquímica de las cepas ácido lácticas con el Sistema API (API50CHL).....	58
Cuadro 19. Fermentación de carbohidratos de los géneros identificados, aislados de mucosa oral de becerros, calostro y leche de vacas Holstein.....	60
Cuadro 20. Cepas probióticas conservadas por su mayor resistencia y viabilidad a condiciones de pH ácido y a sales biliares.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de la Glucolisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas.....	16
Figura 2. Ruta del 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa.....	18
Figura 3. Galería API con medio de cultivo 50CH inoculado con una cepa ácido láctica.....	39
Figura 4. Galerías API50CH inoculadas con cepas seleccionadas e incubadas a 37°C por 48 h.....	40
Figura 5. Expresión de resultados. Cambio de color del medio API50CHL Azul: negativo, Amarillo y negro: positivo.	40
Figura 6. Colonias de la cepa B3/2-1 AB (aerobias), a las 48h de crecimiento en agar MRS. Musosa oral.....	43
Figura 7. Colonias de la Cepa B1/1-2MB2 (anaerobias) a las 48h de crecimiento en agar MRS. Musosa oral.....	43
Figura 8. Colonias de la cepa V1/2 R. X. A las 48h de crecimiento en agar MRS. cepas de calostro.....	43
Figura 9. Colonias de cepa V3/2 C1 R. X. A las 48h de crecimiento en agar MRS cepas de calostro.....	43
Figura 10. Morfología celular de colonias ácido lácticas crecidas en agar MRS por 48 h.....	48
Figura 11. Supervivencia de las cepas ácido lácticas a condiciones de pH ácido.....	51
Figura 12. Valores de densidad óptica registrados en caldo MRS adicionado con sales biliares (SB) e inoculado con cepas ácido lácticas.....	64

I. INTRODUCCIÓN

En México la ganadería de bovinos productores de leche se desarrolla en sistemas diversificados, debido al nivel socioeconómico, tecnológico y a la localización geográfica de las unidades de producción. Dicho de otra forma, los hatos no poseen los mismos medios de producción en tecnología aplicada, número de animales y capacidad de producción de forraje en cantidad y calidad. De este modo, se tiene en primer lugar el sistema intensivo, con ganado de las razas especializadas en producción de leche como la Holstein y Suizo, principalmente. En este sistema, su alimentación esta basada en el consumo de alimento balanceado y forraje de corte, lo que hace que mantengan su volumen de producción homogénea durante todo el año. En segundo lugar se encuentra el sistema de producción de doble propósito o de lechería familiar en la que la producción de leche depende de la disponibilidad de forraje y este depende de las lluvias y en años recientes a los precios pagados al productor, por lo que se presentan mayores volúmenes de producción en los meses de julio a octubre (SAGARPA, 2010). Según el INEGI (2007), con datos generados del último censo ganadero, el 63% de la producción de leche nacional proviene de ganado especializado y el 37% restante del ganado de doble propósito o familiar. Esta situación plantea un reto para los pequeños productores, de incorporarse en figuras organizativas como proveedores permanentes de las industrias procesadoras de lácteos existentes.

Otro factor que ha influido en forma negativa el desarrollo de la ganadería lechera en México es la ineficiencia en la práctica de la recría y el mejoramiento genético (Kurt, 1999). Lo cual conlleva a la dependencia de ganado del exterior. Las importaciones se afectaron en el 2003 y principios del 2004 por el cierre de la frontera al ganado canadiense y de EUA, debido a la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), por lo que se tuvieron que buscar alternativas en países europeos para importar vaquillas lecheras. En los últimos años este problema se ha resuelto por la apertura de importaciones de EUA. A este respecto, Muñoz *et al.* (1997), mencionan que en nuestro país se deben crear alternativas de solución accesibles y que permitan la cría

económica de los reemplazos, mejorando la salud de las becerras y así reducir la mortalidad.

La cría de reemplazos en el país es una etapa productiva descuidada, presentándose problemas de salud en las becerras, principalmente por el mal suministro de calostro, alimentación con sustituto de leche de baja calidad, cambios abruptos en la dieta, y situaciones de estrés (Soto *et al.*, 2011). Lo que provoca principalmente diarreas, debido a la colonización oportunista de *Escherichia coli*, que es la principal causa de mortalidad y morbilidad durante las dos primeras semanas de vida (Gaggía *et al.*, 2010). Es precisamente esta etapa donde los probióticos pueden intervenir en forma benéfica como alternativa de control, menos agresiva y estresante que los antibióticos. Además, el uso de dosis inadecuadas de antibióticos ha generado cepas resistentes con mas patogenicidad, afectando gravemente la salud de humanos y animales (Pérez *et al.*, 2006). Motivo por el cual desde el 1 de enero de 2006 la Unión Europea, prohibió su utilización en animales, promoviendo la investigación en probióticos (EC, 2001; 2003a). Según Soto *et al.* (2011) la viabilidad y número de microorganismos que se requiere suministrar a un animal es de 10^6 UFC/mL para producir un efecto benéfico. Sin embargo, no siempre se logran estas concentraciones debido a que frecuentemente los microorganismos probióticos muestran baja viabilidad en productos comerciales. Esto puede deberse a varios factores tales como el pH, temperatura y presencia de otros microorganismos, por citar algunos (Dave y Shah, 1997).

Entre los microorganismos comúnmente presentes en la flora normal de la mayoría de los organismos se encuentran las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), bacterias generalmente benéficas que por sus propiedades antagonistas contra microorganismos patógenos son las mas utilizadas como probióticos (Fuller, 1992). Entendiendo que los probióticos son “microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del hospedero” (FAO y OMS, 2001). Se ha reportado que las BAL son capaces de contrarrestar el crecimiento de patógenos como *Salmonella spp.* (Gill *et al.*, 2001) y *Escherichia coli* (Shu y Gill, 2002), causantes de diarreas en becerras. Siendo de vital importancia la prevención de este problema en las becerras, para evitar retraso del crecimiento en esta etapa y por ende la productividad (Rosmini *et al.*, 2004).

Al mismo tiempo, varios estudios revelan que al administrar cepas probióticas de humanos al ganado, estas desarrollan una inadecuada y transitoria colonización intestinal, debido a las marcadas diferencias metabólicas y alimentarias entre humanos y animales (Ewaschuk *et al.*, 2004; 2006). Lo anterior conlleva a la necesidad del aislamiento de BAL de ambientes específicos, esperando que al ser suministradas a las becerras tengan una mejor viabilidad y por tanto aporten beneficios a la salud de estas.

Por esta razón, se han desarrollado numerosas investigaciones enfocadas en la obtención de bacterias probióticas de diferentes fuentes como intestino delgado, vagina y alimentos. También se han obtenido bacterias probióticas de la leche y calostro de mujeres y animales. Sin embargo es posible obtener BAL de otras fuentes no convencionales como de la cavidad bucal donde los lactobacilos son habitantes normales (Tortora *et al.*, 1989).

II. JUSTIFICACIÓN

Los antibióticos son utilizados frecuentemente para eliminar microorganismos patógenos en animales lactantes (Patterson *et al.*, 2003) con el propósito de disminuir las tasas de mortalidad. Sin embargo, la administración inadecuada de estos medicamentos ha generado diversos problemas como el incremento en la resistencia bacteriana, la pérdida de la microflora intestinal benéfica y el aumento en los niveles de residuos de medicamentos en la carne y en los subproductos de la misma (Wallace, 1992). Como alternativa a estos problemas se ha sugerido el uso de BAL como probiótico para promover el balance de la microbiota intestinal (Abu-Tarboush *et al.*, 1996).

Actualmente los resultados del uso de probióticos en animales son inconsistentes, hay poca o nula respuesta en la administración oral en ganado y becerras (Yoon y Stern 1995; Goncalves *et al.*, 2000). Revisiones sobre el efecto de las BAL indican que el 45% de los ensayos clínicos realizados desde 1973 a 2004, muestran nula eficiencia en las becerras e incluso un incremento en la incidencia y severidad de diarreas (Rodríguez-Palacios *et al.* 2004). Esto puede deberse a que los microorganismos citados en las

etiquetas de productos probióticos, no son los que realmente contienen, encontrándose otras especies o concentraciones bajas de bacterias viables al momento de la administración a los animales (Wannaprasat *et al.*, 2009). Además, en cuanto a su origen pueden provenir de diferentes regiones geográficas como Estados Unidos y Europa, e incluso de otras especies animales, como cerdos, pollos o de alimentos diversos. En este sentido, en México no se cuenta con probióticos aislados de becerras nativas. Los probióticos comercializados son importados, tienen un alto costo y son de dudosa calidad, pues es frecuente que no se obtengan los beneficios esperados. Por lo anterior, es necesario, el aislamiento y caracterización de bacterias probióticas de ganado bovino en México, con la finalidad de seleccionar cepas con potencial probiótico para ser suministradas a becerras lactantes.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar e identificar bacterias de mucosa oral, leche y calostro de ganado Holstein con características probióticas.

Objetivos particulares

- Aislar bacterias ácido lácticas a partir de muestras de mucosa oral de becerros, leche y calostro de vacas en medios selectivos y específicos.
- Seleccionar las cepas bacterianas aisladas de acuerdo a características morfológicas y pruebas bioquímicas.
- Determinar la resistencia y supervivencia de las cepas seleccionadas a condiciones de pH ácido y sales biliares.
- Identificar las cepas seleccionadas mediante el sistema API50CHL e iniciar la creación de una colección de cepas con potencial probiótico.

IV. HIPÓTESIS

Las bacterias aisladas de mucosa oral, leche y calostro de ganado Holstein poseen potencial probiótico.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) se han utilizado de forma empírica desde hace varios siglos en la fermentación de alimentos como leche, vegetales, productos cárnicos y panadería (Chukeatirote, 2003). Estas bacterias no sólo aportan a los alimentos características organolépticas como sabor, olor, textura y calidad nutritiva, sino que generan ambientes poco favorables para el crecimiento de microorganismos patógenos debido a su acentuada capacidad antagónica que estimula su proliferación en detrimento de cualquier otro microorganismo presente en la materia prima.

En este sentido, se ha podido comprobar que la utilización de algunas cepas del grupo de las BAL, entre ellas las del género *Lactobacillus*, confieren beneficios a la salud y previenen enfermedades (Reid, 2008). A estos se les agrupa dentro de los alimentos funcionales ya que estos son capaces de generar un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas en el organismo más allá de los efectos nutricionales habituales (Roberfroid, 2000). Así, Europa y Estados Unidos, han desarrollado la mayor cantidad de alimentos con cultivos probióticos, pero fue Japón el primer país en etiquetar productos de alimentos funcionales (Pardio, 1998).

5.1 Sistema digestivo de beceras lactantes

En la beceras recién nacida, a diferencia de un animal adulto, el rumen es muy pequeño mientras que el abomaso comprende aproximadamente el 80% del total de las cuatro estructuras, siendo el abomaso el verdadero estómago con secreción de jugos gástricos. En las beceras se desarrolla una estructura llamada canaladura esofágica que se inicia en el cardias, se dirige hacia abajo para terminar en el orificio retículo omasal. Los extremos de esta canaladura se extienden por acción refleja y forman un conducto que permite el paso de la leche directamente al abomaso (Ávila, 1984). De este modo, la beceras empieza como un no rumiante con más del 70% de su capacidad estomacal en el abomaso. Con una ración adecuada el rumen se desarrolla rápidamente a su completa capacidad.

Por otra parte, la flora bacteriana del intestino se adquiere en el momento del nacimiento, siendo especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* las predominantes en

terneros alimentados de leche materna. Inicialmente se encuentra en mayor concentración el grupo de bacterias anaerobias, pero poco a poco se va modificando, dependiendo del tipo de dieta, y tras el destete, la microflora tiene una marcada tendencia a estabilizarse. Aunque la mayoría de las investigaciones sostienen que la colonización del tubo digestivo del recién nacido se produce por la microbiota del canal del parto, algunos autores indican que la leche materna podría ser también una fuente de microorganismos (Martín *et al.*, 2004). Estos autores especulan sobre el posible paso de bacterias a través del epitelio intestinal de la madre hacia otros tejidos como la glándula mamaria y de allí al intestino de los lactantes.

El número de bacterias presentes en un organismo no es el mismo en las diferentes áreas anatómicas. El Cuadro 1 muestra las áreas colonizadas con el mayor número de microorganismos.

Cuadro 1. Áreas anatómicas más colonizadas por bacterias.

Ubicación	Sitio anatómico específico
Piel	Áreas húmedas: región inguinal, espacio interdigital de los pies.
Tracto respiratorio	Fosas nasales, faringe
Tracto digestivo	Boca, intestino grueso
Tracto genitourinario	Tercio anterior, uretra, vagina

Las bacterias y en menor cantidad los hongos y protozoos, residen y proliferan activamente en las áreas anatómicas descritas en el Cuadro 1. Otras regiones del tracto respiratorio y del tracto digestivo, la vejiga y el útero, tienen una menor cantidad de microorganismos, sólo están de paso, no obstante, el hallazgo de microorganismos patógenos en estos sitios es altamente sugerente de infección. Así mismo, existen otros tejidos y órganos en que no existen microorganismos, son territorios estériles. Por lo contrario, el tubo digestivo está densamente poblado por bacterias, por lo que puede ser dividido en unidades distintas, pues cada una provee condiciones para el crecimiento de una microflora específica (Sorum y Sunde, 2001).

En primer lugar, la cavidad bucal, es de los hábitats microbiológicos más complejos y heterogéneos. La flora bacteriana presente allí, incluye bacterias anaerobias estrictas

y anaerobias facultativas. Varias sustancias antimicrobianas han sido identificadas en la saliva, de las cuales las más importantes son enzimas como la lisozima y lactoperoxidasa (Madigan *et al.*, 1977). A pesar de la acción de estas sustancias, la presencia de partículas de alimento y desechos epiteliales, hacen de la cavidad oral un hábitat favorable para el crecimiento bacteriano. Los microorganismos en la cavidad oral, incluyen especies como: *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Haemophilus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Treponema spp.*, *Micrococcus spp.*, *Moraxella spp.* y *Neisseria spp.* (Madigan *et al.*, 1977; Linton *et al.*, 1982; Tortora *et al.*, 1989).

El estómago contiene relativamente pocos microorganismos debido a su medio ambiente ácido, generalmente el estómago presenta valores de pH cercanos a 2.0. Este pH funciona como barrera contra la entrada de bacterias externas dentro del tubo digestivo. Si el contenido bacteriano del estómago es bajo, algunas especies ácido tolerantes son capaces de colonizar este órgano, como *Helicobacter pylori* que es capaz de colonizar el estómago de humanos, aunque también ha sido aislada de estómago de cerdos y gatos. Otras especies de *Helicobacter* se han encontrado en el estómago de varios animales (Glupczynski *et al.*, 1998). En seguida, el duodeno con un pH menos ácido crea cambios en la flora bacteriana, resultando en una rica y más compleja microflora, en su mayoría especies Gram positivas. En la última parte del íleon hay aproximadamente 10^5 a 10^7 bacterias por gramo de quimo, esta microflora incluye especies de la familia *Enterobacteriaceae* y *Bacteroides spp.*, en adición con *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*. Por último, el intestino grueso contiene bacterias anaerobias estrictas tales como *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, y *Peptostreptococcus spp.* También presenta un considerable número de anaerobias facultativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, y *Enterococcus spp.*

De acuerdo a lo anterior, se ha demostrado que la microflora normal de becerros de lactantes está constituida por microorganismos que habitan en todos los integrantes de ese hato. En el caso del tubo digestivo de terneros criados en condiciones artificiales, se han aislado en mayores cantidades: *Pediococcus acidilactis*, *Lactobacillus reuteri*,

Enterococcus faecalis, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus casei* (Pascual *et al.*, 1996).

De este modo, la microbiota intestinal de los animales es responsable de una serie de funciones que regulan directamente el buen funcionamiento no sólo del sistema digestivo, sino también del sistema inmunológico e indirectamente tiene una influencia sobre el bienestar general del animal.

5.1.2 Fisiología de la microbiota intestinal

Cada organismo vivo pertenece a un ecosistema natural, al mismo tiempo estos conforman un ecosistema para las bacterias que albergan (Flandrois, 1997). Siendo un claro ejemplo el intestino de humanos y animales, que proporciona un ambiente muy favorable para el crecimiento y desarrollo de la microbiota. Este complejo grupo de microorganismos es característico de cada individuo, así como también el número y especies de bacterias presentes en cada segmento del intestino y está influenciado por varios factores ambientales (Fonty, 2003).

Estos microorganismos tienen su origen en la vagina, ubre, leche y saliva de la madre, bolo alimenticio, estiércol, flora ambiental, otros animales y otras fuentes alimenticias (Church, 1993). De esta manera, la microflora que coloniza el intestino, es una colección muy compleja, compuesta por cerca de 400 diferentes tipos de bacterias (Moore y Holdman, 1974), pero a pesar de esta gran variabilidad, la flora rápidamente forma una población muy estable. En este complejo sistema, hay una estrecha interrelación entre microorganismo y hospedero, ya que la microbiota tiene funciones metabólicas, tróficas y de protección que es capaz de influir positivamente en la barrera intestinal.

Muchas de estas funciones se han determinado haciendo estudios de comparación entre animales axénicos (libres de microorganismos) y animales holoxénicos (presencia de microbiota normal). De esa manera, se observó que en los animales axénicos los carbohidratos son hidrolizados a hexosas y pentosas, pero no se produce ácido láctico ni ácidos grasos volátiles, como sucede en los animales holoxénicos (Midtvedt, 1997).

Así también, se presenta un menor reemplazamiento celular en la mucosa del intestino y un menor desarrollo del sistema inmune (Falk *et al.*, 1998).

De manera normal, la mucosa del intestino actúa como barrera que separa el medio interno del ambiente luminal, mediante una capa de moco que está formada por la interacción de varias secreciones mucosas, como glicoproteínas, mucina, péptidos y fosfolípidos surfactantes (Guarner y Malagelada, 2003). Además también, absorbe los nutrientes por medio de sus vellosidades y microvellosidades. Al mismo tiempo, la presencia de bacterias benéficas es vital para el adecuado funcionamiento del intestino ya que intervienen en la motilidad, secreción, absorción y en la estructura celular. Por su parte, el intestino grueso desempeña funciones de deshidratación del quimo intestinal y la evacuación de los residuos no utilizados por el organismo. En el intestino delgado las reacciones microbianas se caracterizan por ser hidrolíticas por la presencia de oxígeno. Caso contrario es el intestino grueso donde las condiciones son anaerobias y las reacciones bioquímicas son normalmente reductoras (Macfarlane *et al.*, 1992).

En particular, el intestino es considerado el órgano inmune más grande del cuerpo, por la presencia de tejido linfoide asociado a la mucosa (Collins *et al.*, 1998). Es claro que el organismo no es un sistema cerrado, diariamente pueden introducirse microorganismos y antígenos peligrosos en la dieta, pero la barrera intestinal contribuye a la exclusión y eliminación de estos (Brandzaeg, 1995). Se ha relacionado esta exclusión con la habilidad de la mucosa intestinal de producir Inmunoglobulina A (IgA) y moco (Slomiany *et al.*, 1987). Vitiñi *et al.* (2000) reportan que algunas cepas de *Lactobacillus* tienen la capacidad de incrementar el número de células inmunes productoras de IgA del intestino, así como el número de las células de defensa con una respuesta inmune inflamatoria. Por lo tanto, el epitelio intestinal junto con el moco es la primera línea censora de defensa mediante la activación de las bacterias residentes, además de la intervención de tres tipos de células inmunosensoriales que son: enterocitos superficiales, células M y células dendríticas intestinales. La bacteria residente puede ejercer una doble función: la de estimulación de los mecanismos de defensa de la mucosa y el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmune. De esta manera,

es clara la evidencia de una correlación entre la composición de la microbiota y la variación en la inmunidad (O'Hara y Shanahan, 2006). Cuando hay pérdida de la integridad, es decir, una disfunción de la barrera intestinal, conduce a un progresivo incremento de la permeabilidad, induciendo a un cambio patológico de inflamación característico de enfermedades intestinales (Frank *et al.*, 2007; Lambert, 2009). Numerosas evidencias indican que los cambios en la microbiota intestinal con incremento de bacterias patógenas y un decremento de la salud, las bacterias promotoras como bifidobacterias y lactobacilos juegan un papel importante en la recuperación de la inflamación intestinal (Andoh y Fujiyama, 2006).

Según Hooper *et al.* (2001) la microbiota presente interviene en la morfología anatómica y fisiológica del intestino, aumentando la superficie de absorción y promoviendo la regeneración de las vellosidades. Además de esto, incrementan el contenido intraluminal y aceleran el tránsito intestinal. Otras actividades en las que intervienen, es en la síntesis de vitaminas (Hill, 1997) y en el incremento de la biodisponibilidad de la riboflavina, haciendo estos nutrientes más fácilmente utilizables (Ortega *et al.*, 2002) y la absorción de varios minerales como Ca, P, Mg y Fe (Miyazawa *et al.*, 1996). Los probióticos también intervienen en varias funciones metabólicas por su gran potencial enzimático. Entre ellas, la hidrólisis de los componentes de la dieta (glúcidos, proteínas y lípidos), proceso por el cual se obtiene energía y nutrientes, para los propios microorganismos intestinales y para el hospedero.

La fermentación de los carbohidratos provoca disminución del pH y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). La mayor parte de estos son producidos en el colon y absorbidos ahí mismos. Los AGCC más abundantes en el intestino son el acético, el butírico y el propiónico. El epitelio del colon consume casi por completo el butirato producido, constituyendo la principal fuente de energía para los colonocitos. Además de que se ha relacionado también con la destrucción de células neoplásicas, pudiendo prevenir procesos cancerígenos (Gibson *et al.*, 1992; Scheppach *et al.*, 1995). Por su parte, el acetato y el propionato pasan a la circulación portal y se consumen en

el hígado o en los tejidos periféricos. De este modo, tienen una gran importancia en la fisiología y nutrición del tubo digestivo (Cummings, 1997).

5.2 Probióticos

5.2.1 Uso y definición de probióticos

El consumo de probióticos se remonta a varios siglos atrás desde Hipócrates (460 a.C.-377 a.C.), quien decía: "Haz que tus alimentos sean tus medicinas y que tus medicinas sean tus alimentos". Posteriormente, Élie Metchnikoff (1845-1916), quien fue el primero en aislar bacterias ácido lácticas del yogurt, afirmando que eran estos microorganismos los responsables de la existencia de un increíble número de personas centenarias en Bulgaria, por el consumo de grandes cantidades de yogurt (Rodríguez, 2009). Desde ese tiempo a la actualidad, se ha incrementado el interés por este tipo de alimentos que contienen bacterias benéficas para la salud (Felley *et al.*, 2001).

Lilly y Stillwell (1965) introdujeron el término Probiótico para nombrar a "Sustancias que estimulan el crecimiento de otros microorganismos". Sin embargo, esta definición fue modificada y se redefinió a los probióticos como "microorganismos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal". Para 1970 un microorganismo probiótico se definía como "microorganismos que se utilizan como suplemento en la alimentación animal, para aumentar el crecimiento y reducir el estrés". De la misma manera, Fuller (1989) definió a los Probióticos como: "Aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino".

Casi una década después Salminen *et al.* (1998) definieron a los probióticos como "agente microbiano viable que al utilizarse en el hombre o en animales aporta efectos benéficos, mejorando el balance de la microbiota intestinal".

En la actualidad, la definición utilizada es la emitida por la FAO y la OMS "probióticos son microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del hospedero"(FAO y OMS 2001). De esta manera, podemos señalar que la ingestión de bacterias vivas probióticas,

favorecen la composición o actividad de la microbiota autóctona, y por tanto pueden modificar y favorecer el estado de salud del hospedero.

5.2.2 Los probióticos y la salud

El uso de probióticos no es nuevo, ya que se consumen desde la antigüedad, incluso hace más de un siglo científicos como Pasteur y Metchnikoff observaron el potencial benéfico de algunas bacterias por su antagonismo contra agentes infecciosos (Underdown, 1986). Por lo que, el suministro de probióticos ha sido recomendado para el tratamiento o prevención de varias condiciones de estrés y enfermedades de un sinnúmero de especies (Zimmermann *et al.*, 2001). Debido a que se ingieren en las cantidades adecuadas, ocurre la modificación del ecosistema de los billones de microorganismos que habitan en el intestino, dándose una competencia por los nutrientes entre los probióticos y los microorganismos patógenos, así como la competencia por los sitios de adherencia, impidiendo la colonización de estos y reforzando los mecanismos de defensa estimulados por el sistema inmune, generando un equilibrio que se manifiesta por un estado de salud. De este modo, las bacterias probióticas tanto nativas como las que se suplementan en el alimento, pueden controlar la colonización y/o el desarrollo de diversos microorganismos patógenos, como: *Salmonella typhimurium*, *Shigella spp.*, *Clostridium*, *Campilobacter jejuni* y *Escherichia coli* (Hilton *et al.*, 1995).

Varios investigadores han podido comprobar los efectos benéficos de los probióticos (Dunne *et al.*, 2001; Marteau *et al.*, 2002), reportando sus efectos nutricionales, su antagonismo contra patógenos y su acción de inmunomodulación. Esta actividad la desarrollan a través de la interacción de los probióticos con el tejido linfoide, favoreciendo la maduración del sistema inmune (Cebra *et al.*, 1998; y Noverr Huffnagle., 2004). Por su parte, Gill *et al.* (2001), han reportado que algunas cepas tienen la capacidad de incrementar la inmunidad innata, por medio de la estimulación de actividad fagocítica. Asimismo, se ha documentado que pueden producir inmunoglobulinas del tipo A, es decir, estimulan también la inmunidad adquirida o específica (Tejeda Simón *et al.*, 1999). Adicionalmente, se tienen evidencias de que los probióticos pueden inhibir procesos patológicos como reacciones de hipersensibilidad o

reducción de alergias (Majamaa e Isolauri, 1997; Kalliomaki *et al.*, 2001) interviniendo sobre la inmunidad celular y humoral (Borrueal, 2003). Recientemente, se ha investigado sobre la acción de algunas bacterias en la desconjugación de sales biliares, postulándose que estas podrían estimular el catabolismo del colesterol, disminuyendo la colesteronemia (Tahri *et al.*, 1995).

5.2.3 Bacterias potencialmente probióticas

En la actualidad se conocen más de 20 géneros de microorganismos probióticos en el mundo, estos han sido aislados de diversas fuentes como: el tracto intestinal de humanos y animales, carnes, frutas y vegetales fermentados, entre otros (Barboza *et al.*, 2004). De estos, la mayor parte pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas.

Los *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, son los géneros comúnmente empleados para la producción de probióticos (Sandine *et al.*, 1972), caracterizados por producir ácido láctico a partir de carbohidratos, lo que los hace útiles para la fermentación de alimentos. Algunos de ellos se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Probióticos estudiados para su uso en la alimentación animal

<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>B animalis</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. lactis</i> subsp.	<i>L. citreum</i>
subsp. <i>animalis</i>	<i>L. amylovorus</i>	<i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i>
(<i>B. animalis</i>)	<i>L. brevis</i>	(<i>Streptococcus</i>	<i>L.</i>
<i>B. lactis</i> subsp.	<i>L. casei</i> subsp.	<i>cremoris</i>)	<i>mesenteroides</i>
<i>lactis</i> (<i>B. lactis</i>)	<i>casei</i> (<i>L. casei</i>)	<i>L. lactis</i> subsp.	
<i>B. longum</i> subsp.	<i>L. crispatus</i>	<i>lactis</i>	
<i>longum</i> (<i>B.</i>	<i>L. farmicinis</i>		
<i>longum</i>)	<i>L. fermentum</i>		
<i>B. pseudolongum</i>	<i>L. murinus</i>		
subsp.	<i>L. plantarum</i> subsp.		
<i>pseudolongum</i>	<i>plantarum</i> (<i>L.</i>		
(<i>B.</i>	<i>plantarum</i>)		
<i>pseudolongum</i>)	<i>L. reuteri</i>		
<i>B. thermophilum</i>	<i>L. rhamnosus</i>		
	<i>L. salivarius</i>		
	<i>L. amylovorus</i> (<i>L.</i>		
	<i>sobrius</i>)		

Fuente: Suvarna y Boby (2005).

5.2.4 Bacterias ácido lácticas

Las BAL pueden encontrarse en diversos nichos ecológicos, siempre que en ellos haya abundantes fuentes de carbohidratos hidrosolubles, productos de degradación de proteínas, vitaminas y una tensión de oxígeno reducida. Las podemos encontrar en hábitats tan variados como la leche y sus derivados, vegetales, carne y sus derivados, bebidas fermentadas y formando parte de la microbiota gastrointestinal y genitourinaria del hombre y animales (Azadnia *et al.*, 2011).

El grupo de las BAL está conformado por varios géneros con características morfológicas, metabólicas y fisiológicas en común. Son cocos o bacilos Gram positivos, no forman esporas, no presentan movilidad, son negativas a la producción de catalasa y bencidina; y tampoco reducen el nitrato a nitrito (Savadogo *et al.*, 2006). Carecen de actividad respiratoria por la ausencia de la enzima citocromo catalasa, por tanto son anaerobias, microaerofílicas o aerotolerantes pudiendo formar colonias en los medios

de cultivo sólido en presencia de aire (Ekinci y Gurel, 2007). Esto es posible gracias a que contiene un grupo hemina, que les permite poner en marcha la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones.

Por otro lado, la temperatura es un factor que influye de manera importante en el crecimiento de las BAL. Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta que va de los 30-40°C pues depende de las características del microorganismo utilizado, así como también de las condiciones ambientales (Guerra *et al.*, 2001), la mayoría de las especies necesitan aminoácidos y vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y ácido fólico) y varios aminoácidos (Devlieguere *et al.*, 2004). Dependiendo de sus características metabólicas y fenotípicas las BAL pueden seguir dos rutas para la fermentación de carbohidratos, esto por la presencia o ausencia de las enzimas fructuosa 1´6-difosfato aldolasa y fosfocetolasa (Kandler y Weiss, 1992). A continuación se explica cada una de éstas:

1. Glucolisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Es la ruta por la cual las especies denominadas homofermentadoras, con disponibilidad de glucosa, de factores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos y precursores de ácidos nucleicos, y cantidad de oxígeno limitada, metabolizan las hexosas. Convirtiendo una molécula de glucosa en dos moles de ácido láctico y dos moles de ATP (Almanza y Barrera, 1991).Figura 1.

En esta ruta la enzima clave es la fructosa 1´6-difosfato aldolasa. A este grupo pertenecen las cepas: *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. amilovorans* y *L. gallinarum*. También se incluyen en esta categoría las especies *Lactobacillus delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. leichmanii*, *L. salivarius* y *L. jensenii*. Estas especies son incapaces de fermentar las pentosas o el gluconato. También se incluyen los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus pentosaceus*,

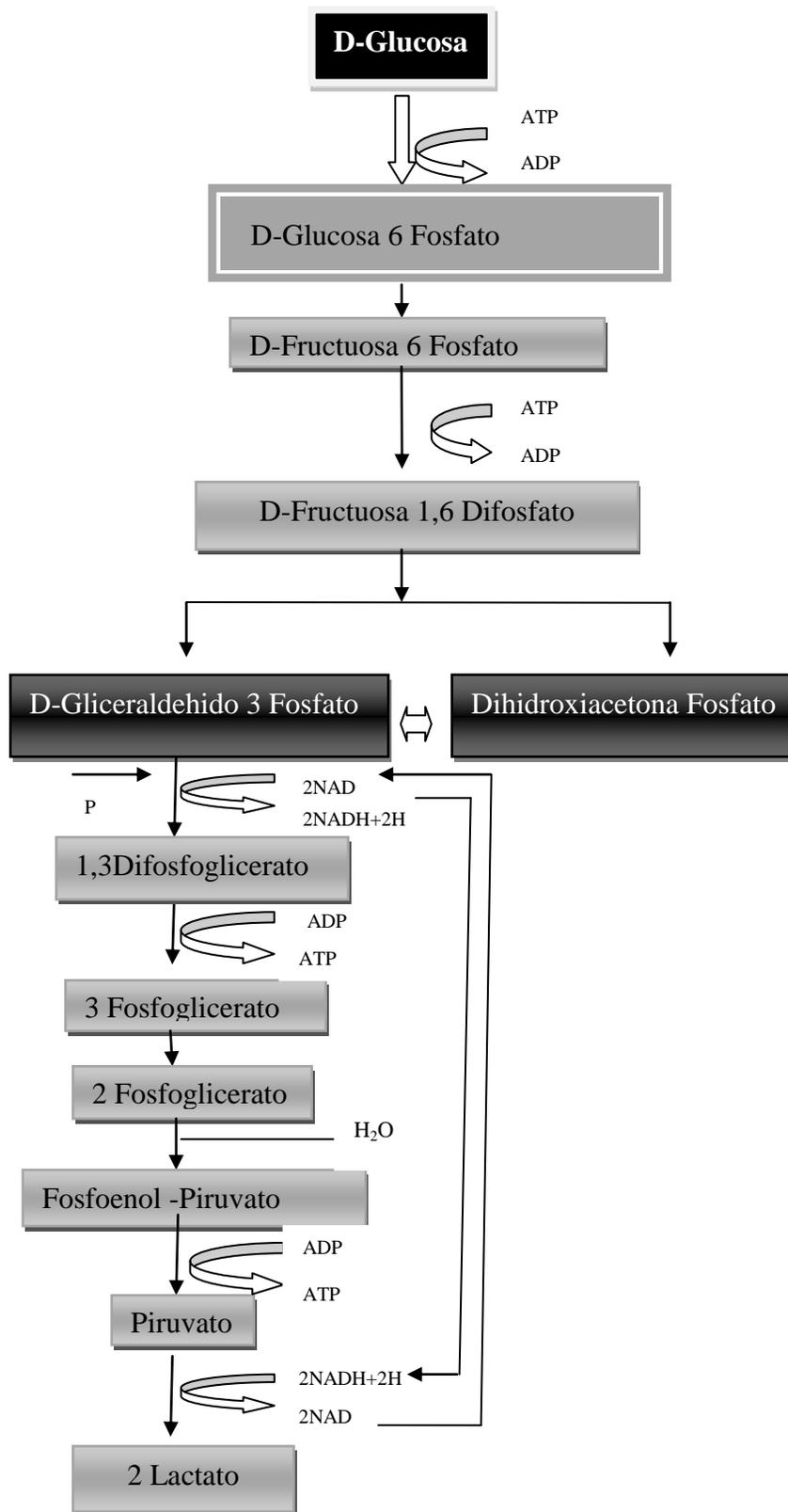


Figura 1. Ruta de la glucolisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas

Fuente: modificado de Parra (2010).

2. Ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK). Se incluyen en este grupo *Lactobacillus reuteri*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, *L. buchneri* y *L. viridescens*. Estas especies utilizan solamente la ruta dependiente fosfocetolasa para metabolizar azúcares, y además de ácido láctico, producen también cantidades significativas de ácido acético y/o etanol con la producción de CO₂ (Almanza y Barrera, 1991). La ruta se muestra en la Figura 2. El rendimiento energético en esta reacción es un mol de ATP y 3 moles de NADH por mol de hexosa fermentada. Para recuperar el equilibrio redox de la reacción y en ausencia de aceptores de electrones alternativos, será necesaria: A) la reducción del piruvato a lactato, reacción en la que se oxida uno de los moles de NADH y B) que el acetil-fosfato se reduzca a etanol. En presencia de aceptores de electrones alternativos, se formará ácido acético en lugar de etanol como producto final.

2.1 Heterofermentadores facultativos. Las principales especies de este grupo son: *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. sakei* y *L. curvatus*, *L. casei subs prhamnosus*, *L. curvatus*.

Producen solo 50% de ácido láctico por la ruta Embden- Meyerhoff-Parnas. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol, 1 mol de CO₂, y 1 mol de ATP (Ly, 2008). Por otro lado, este grupo de bacterias contiene la enzima fosfocetolasa, con la cual fermentan las pentosas hasta ácido láctico y ácido acético (Almanza y Barrera, 1991). De esta manera puede resumirse que la principal diferencia entre las bacterias homo y heterofermentativas son las enzimas ya que las homofermentativas poseen las enzimas fructosa 1´6-difosfato aldolasa y hexosa isomerasa que no tienen las heterofermentativas, mientras que éstas últimas poseen una fosfocetolasa, de la que carecen las primeras.

Por otra parte, una característica fundamental de este género es que tienen un amplio rango de tolerancia al pH ya que algunas cepas son capaces de crecer a pH 3.2 hasta pH 9.6. El pH óptimo de crecimiento oscila entre 5.5 y 6.2. Sin embargo, la mayoría de cepas pueden sobrevivir a pH 4.0 y 4.5, en medios donde otras bacterias no resistirían la actividad producida por los ácidos orgánicos (Carr *et al.*, 2002).

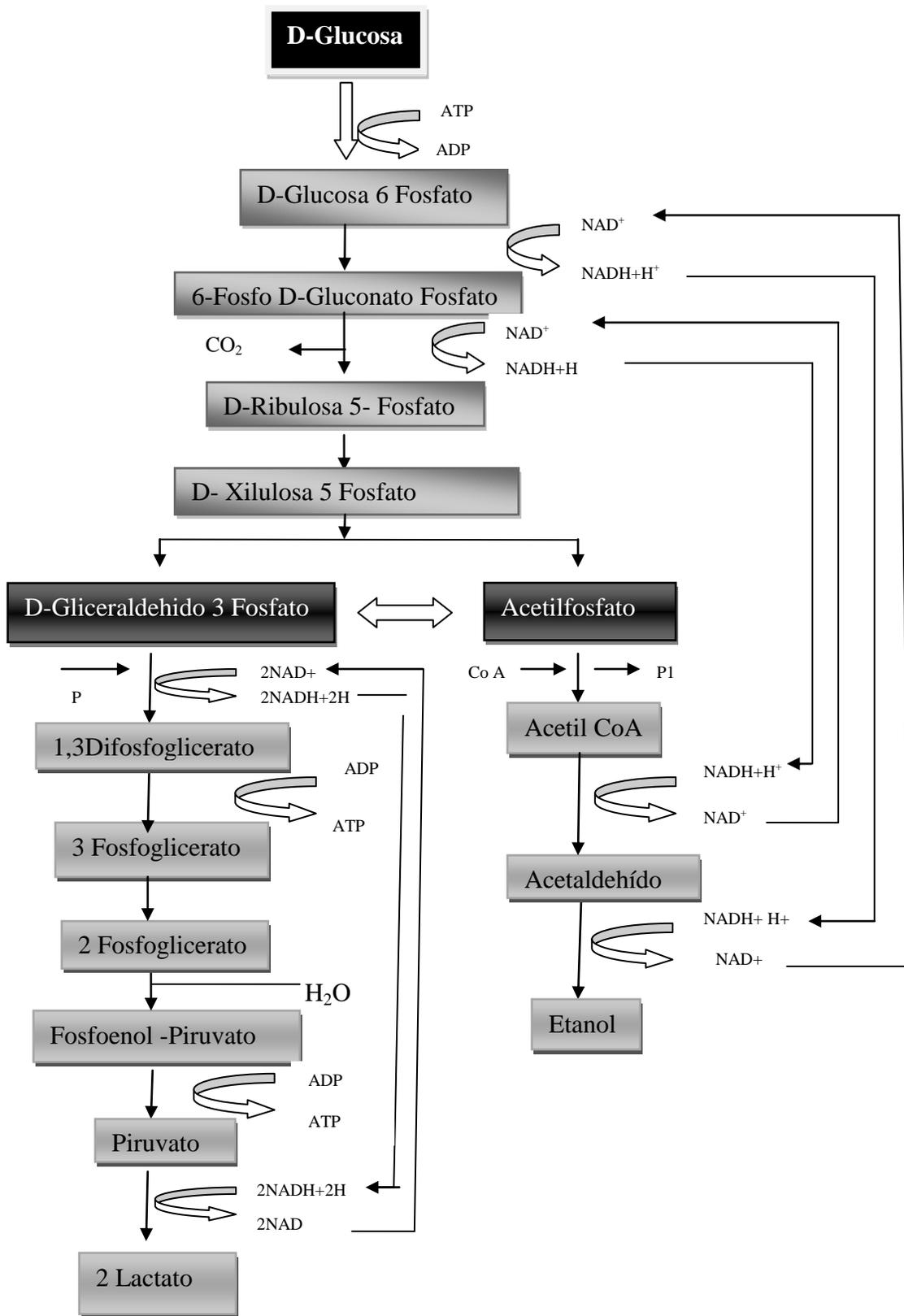


Figura 2. Ruta del 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa
Fuente: modificado de Parra (2010)

5.2.5 Respuesta ácido tolerante de *Lactobacillus*

Durante la fermentación, *Lactobacillus* transporta ácido láctico hacia afuera de la célula como ión lactato, vía protón-lactato electrogénico. Una bacteria metabólicamente activa mantiene un gradiente de concentración (ΔpH) constante, donde el pH intracelular (pH_i) es más alcalino que el pH del medio (pH_m), (Booth, 1985; Kashket, 1987). Al disminuir el pH_m o al incrementarse la concentración de lactato, la concentración de protonato (ácido láctico no disociado) también se incrementa. Esta forma no disociada es soluble en la membrana y puede entrar al citoplasma por simple difusión (Lambert y Stratford, 1999). Así, la difusión del ácido dentro del citoplasma provoca una rápida disociación y liberación de protones y aniones en la célula. Si la tasa de liberación de protones excede la capacidad buffer del citoplasma y el flujo del sistema, el pH_i empieza a bajar y eventualmente alcanza un punto crítico donde el ΔpH no puede mantenerse por mucho tiempo y la función celular se deteriora (Booth, 1985; Hutkins *et al.*, 1993). De este modo, la acumulación intracelular de aniones ácidos tiene gran importancia ya que la liberación de protones inhibe el crecimiento celular (Carpenter *et al.*, 2009; Russell, 1992).

Las diferencias en la tolerancia a la acides entre especies de BAL han sido relacionadas con la actividad de la F1-F0 ATPasa que es una subunidad enzimática múltiple, conteniendo una porción catalítica (F1), incorporando subunidades para la hidrólisis de ATP; y una porción integral de membrana (F0) que incluye subunidades que funcionan como canales de membrana para la translocación de protones (Corcoran *et al.*, 2005), esta enzima juega un papel importante en el pH_i , para la regulación del pH óptimo para las células (Cotter y Hill, 2003; Sturr y Marquis, 1992)

En adición a la actividad de F1-F0 ATPasa, la tolerancia a la acides en las BAL incluye una variedad de mecanismos de protección para el estrés ácido (Lorca *et al.*, 2009; van de Guchte *et al.*, 2002). Varias células muestran una inducible Respuesta Ácido Tolerante (siglas en inglés ATR) o resistencia adquirida, que las protege de la muerte por acides.

El primer reporte sobre la ATR se le atribuye a Goodson y Rowbury (1989), quienes mencionaron que el mecanismo de la ATR es generalmente provocada por una exposición breve a un pH_m sub letal (adaptación ácida), lo cual provoca otras respuestas al estrés. También observaron que en una inducción transitoria, aumentó la supervivencia celular durante la subsecuente exposición a pH_m sub letal, por cambios fisiológicos y proteínas específicas. La ATR ha sido detectada en numerosas bacterias, incluida *L. casei* y otras especies de BAL (Hall *et al.*, 1995; Hamilton y Svensäter, 1998).

La caracterización de la ATR ha facilitado la identificación de enzimas, proteínas y cambios macromoleculares como: alteración del contenido de lípidos de la membrana citoplasmática que permite a la bacteria combatir el efecto negativo de la acidificación citoplasmática (Cotter y Hill, 2003, Lorca *et al.*, 2009). Trabajos muestran que en *L. casei* se han detectado de 9 a 11 proteínas ácido-reguladoras (Hamilton y Svensäter, 1998) y además el contenido de los ácidos grasos de la membrana citoplasmática es alterado al incrementar la proporción de ácido oleico ($C_{18:1}$) y el ácido graso ciclopropano ($C_{19:0}$) en respuesta a la acidificación (Fozo *et al.*, 2004). Sin embargo, la información de los mecanismos usados por *L. casei* para modular la ATR y el contenido de ácidos grasos, así como la identidad y funciones de las proteínas ácido-reguladoras aun es limitada.

5.2.6 Actividad probiótica en el animal

En la Unión Americana se han desarrollado varios estudios de campo para monitorear la salud de becerras y su crecimiento. En un estudio se encontró que las becerras con neumonía en los primeros tres meses de vida tuvieron 2.5 veces más probabilidades de morir después de los noventa días de edad. Si las becerras presentaban diarreas en la etapa lactante, tenían 2.5 veces más probabilidades de ser desechadas que otras becerras y además se observó que las vaquillas tratadas por diarrea tuvieron 2.9 veces más probabilidades de parir después de 30 meses de edad que otras (Kertz, 2006).

En estudios hechos en Nueva York se reportó que becerras con problemas respiratorios tuvieron menor probabilidad de vivir durante los dos primeros años de edad, o les tomó más tiempo entrar al ordeño, tuvieron más problemas al parto y fueron desechadas más

pronto. En contraparte las vaquillas que no presentaron enfermedades cuando eran becerras tuvieron dos veces más probabilidades de llegar al primer parto y parir en promedio seis meses antes que aquellas que tuvieron problemas durante su crianza (Kertz, 2006).

Por lo tanto, las enfermedades entéricas son de mucha importancia en lo que concierne a la industria pecuaria, debido a la pérdida de productividad, incremento de mortalidad y la contaminación de los productos para consumo humano. Ante este hecho, en la actualidad las bacterias probióticas se emplean como aditivos en la alimentación de animales de granja y como promotores del crecimiento (Patterson y Burkholder, 2003).

En cerdos se ha demostrado que el suministro de probióticos disminuye o elimina los agentes patógenos en el intestino, mejorando el índice de conversión y reduciendo las diarreas, además, son capaces de eliminar los residuos de antibióticos y sustancias análogas en productos finales (Figuroa *et al.*, 2006). Riopérez (2005) reportó que la administración oral de cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Enterococcus faecium* en el alimento iniciador a lechones de 4-5 semanas de edad reduce significativamente ($P < 0.01$) la concentración de bacterias coliformes en íleon y ciego y promueve el aumento de lactobacilos en el intestino, previniendo las diarreas colibacilares post-destete y constituye una alternativa válida para sustituir a los antibióticos prohibidos como promotores del crecimiento, al mejorar sensiblemente la relación lactobacilos/*E. coli*.

Otras investigaciones demuestran que las bacteriocinas tienen un efecto positivo frente a las gastroenteritis producidas por cepas de *E. coli* y *Campylobacter spp*, reduciéndolas considerablemente (Gagnon *et al.*, 2004). En consecuencia la administración constante de probióticos genera los siguientes efectos que se describen, según: Domínguez-Bello y Blaser, (2008); Germán *et al.* (2001); Nobaek *et al.* (2000); Salminen, (1998); Fuller, (1992).

1. Previenen diarreas, por la inhibición de microorganismos causantes y la consiguiente disminución de la mortalidad en animales de corta edad.

2. Previenen enfermedades pulmonares, anorexias relacionadas al estado sanitario del animal con tránsito intestinal acelerado o que ha padecido diarreas.
3. Mejora la absorción de los nutrientes de los formulados alimenticios provocando el aumento del índice de conversión alimenticia y de ganancia de peso.
4. Aumentan el control higiénico ambiental de las naves de producción, debido a que las heces provienen de intestinos no contaminados, evitando el reciclado permanente de bacterias nocivas entre animales. Además, al realizarse correctas fermentaciones intestinales, se logra homogeneizar y mejorar la textura y olor de las heces siendo estas aptas como fertilizantes.
5. Mejora de la resistencia inmunológica del animal, al disminuir la utilización indiscriminada de antibióticos, su costo y dificultad de administración.
6. Mejora en el proceso de la digestión, porque contienen enzimas (p.e. lactasa) que ayudan a digerir la comida.
7. Inhiben el crecimiento de organismos patógenos en el tubo digestivo, compiten por los alimentos y el espacio disponible y segregan entonces sustancias como ácido láctico y otros ácidos orgánicos y sustancias que funcionan como antibióticos, que se conocen como bacteriocinas, de esta manera se crea un medio adverso en el que los patógenos no pueden crecer.
8. Reforzamiento de la respuesta inmunológica, tanto la celular como la humoral, debido a que las bacterias probióticas aumentan el número de glóbulos blancos circulantes, estimulan la fagocitosis, aumentan los niveles de anticuerpos y regulan la producción de las citoquinas como gamma-interferon.
9. Producen vitaminas B1, B6, B12, ácido fólico, biotina y diferentes aminoácidos. También la vitamina K puede ser producida en el intestino, además, *Lactobacillus acidophilus* es capaz de frenar algunas otras bacterias que son responsables de la desintegración de la vitamina B1.
10. A través de las madres confieren beneficios a los recién nacidos al mantener libre de patógenos el intestino. Optimizando la capacidad de sobrevivencia en las primeras 72 horas de vida.
11. Reducción de los niveles de colesterol en la sangre del animal y por lo tanto en algunos productos derivados, como el huevo.

5.2.7 Mecanismo de acción de los probióticos

Entre los mecanismos de acción de los probióticos se pueden mencionar los siguientes (Alander *et al.*, 1999; Isolauri *et al.*, 2001; Parvez, 2006; Collado *et al.*, 2007):

- 1) Síntesis de sustancias como el ácido láctico, peróxido de hidrogeno, diacetilo y bacteriocinas. Estos compuestos afectan el metabolismo de bacterias patógenas o la producción de toxinas.
- 2) Producción de sustancias con un potente efecto antimicrobiano como la reuterina producida por *Lactobacillus reuteri* y las llamadas bacteriocinas, las cuales son como pequeñas proteínas que tienen la capacidad de perforar específicamente la membrana celular de ciertas bacterias patógenas. Como ejemplo de estas esta la nisina producida por *Lactococcus lactis*.
- 3) Disminución del pH intestinal favoreciendo el crecimiento de bacterias benéficas.
- 4) Bloqueo de la colonización de patógenos en sitios donde pudieran alojarse como la superficie del epitelio gastrointestinal. No es solo un bloqueo físico para no dejar llegar a los patógenos a la pared intestinal si no que existen sitios específicos en donde las bacterias probióticas forman un enlace con las células epiteliales. Las bacterias patógenas al no tener donde fijarse son eliminadas con las heces antes de que puedan proliferar.
- 5) Competición por nutrientes.
- 6) Estimulación de la respuesta inmune. La estimulación de la inmunidad innata y adquirida protege contra enfermedades intestinales, estimulando la producción de IgA, activando macrófagos e incrementando la concentración de IFN-gamma (interferon gamma)

En resumen, los probióticos ejercen su actividad antimicrobiana a través de exclusión competitiva, antagonismo bacteriano y disminución del pH intestinal produciendo metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta, péptidos antibacterianos, ácido láctico, biosurfactantes y modulación de la respuesta inmune (Fotiadis *et al.*, 2008).

5.3 Métodos de identificación para bacterias probióticas

5.3.1 Métodos directos

El estudio de la microbiota benéfica se ha abordado principalmente a través del aislamiento e identificación fenotípica, mediante características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Para esto ha sido necesario el uso de medios selectivos y diferenciales.

El cultivo de las bacterias intestinales es complejo por ser anaerobias y ser demasiado sensibles al oxígeno, requiriendo de condiciones reductoras estrictas para su cultivo (Delgado, 2005).

5.3.2 Métodos indirectos

Se basan en el estudio del metabolismo bacteriano, es decir, la cuantificación y análisis de sus metabolitos o actividad enzimática. Entre los más estudiados están los ácidos grasos volátiles y la actividad de las glicosidasas o las reductasas. Este tipo de análisis presenta también inconvenientes, ya que las enzimas que son detectadas no son específicas de una cepa o un grupo bacteriano, además de que puede darse en ocasiones una gran variabilidad metabólica en las especies (Delgado, 2005).

5.4 Criterios para la evaluación de los probióticos

En la actualidad se reconocen principios básicos que deben respetarse cuando se busca aislar cepas bacterianas probióticas con el fin de ser administradas a los animales para revertir las deficiencias causadas por la crianza intensiva (Rosmini *et al.*, 2004).

Los requisitos que deben cumplirse para considerar a un microorganismo como probiótico son:

- 1) Identificación taxonómica exacta.
- 2) Ser habitante normal de la especie objetivo.
- 3) La supervivencia, la colonización y ser metabólicamente activo en el sitio apuntado, implica:

- a. Resistencia a los jugos gástricos y bilis
 - b. La persistencia en el tracto gastrointestinal
 - c. La adhesión al epitelio o mucosa
 - d. La competencia con la microbiota residente
 - e. La producción de sustancias antimicrobianas
 - f. El antagonismo frente a las bacterias patógenas
 - g. La modulación de la respuesta inmune
 - h. Efectos benéficos en la salud
- 4) Estabilidad genética
 - 5) Concentración de microorganismos viables (10^6 UFC/ml).
 - 6) Mejorar los índices de producción (efecto zotécnico).
 - 7) Estabilidad de las características probióticas durante el procesamiento y distribución.
 - 8) Propiedades organolépticas y tecnológicas deseables cuando se incluye en los procesos industriales EFSA. (2005a); FAO/WHO. (2002).

5.5 Guía para la evaluación de los probióticos

Aunque la mayoría de las cepas que se emplean como probióticos, son comensales del tubo digestivo y se han utilizado históricamente en la conservación de alimentos y por ello se consideran Generalmente Como Seguras (por sus siglas en ingles GRAS), la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que sean sometidas a pruebas para que su aplicación no tenga efectos colaterales, que afecten negativamente la salud del hospedero (Kirjavainen *et al.*, 1999). Se han desarrollado una serie de requisitos que deben cumplirse y evaluarse de forma individual en cada cepa para la selección de bacterias probióticas los cuales incluyen aspectos de seguridad, criterios funcionales y tecnológicos que se describen a continuación.

5.5.1 Seguridad de uso

La seguridad debe ser verificada de forma individual, asegurándose de que cada cepa probiótica esté libre de factores de virulencia y determinantes de patogenicidad, mediante la prueba de “actividad hemolítica” (Salminen *et al.*, 1998b; Ishibashi y Yamazaki, 2001).

5.5.2 Criterios Funcionales

Estos criterios se enfocan a las características biológicas y a la capacidad probiótica de las cepas e incluyen aspectos de resistencia al tránsito gastrointestinal (resistencia a condiciones ácidas y a sales biliares) y supervivencia en el lugar de acción (Marteau *et al.*, 1997).

5.5.3 Criterios Tecnológicos

El probiótico debe de ser fácilmente cultivable y mantener elevados niveles de viabilidad y estabilidad de sus propiedades en el producto. La resistencia de las cepas a la congelación y a la liofilización son también características importantes para el desarrollo de los cultivos industriales (Sanders y Huis in 't Veld, 1999).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Aislamiento de bacterias probióticas a partir de muestras de mucosa oral de becerros, de leche y calostro de vacas Holstein

6.1.1 Animales

Se seleccionaron cinco becerros lactantes de 30 a 60 días de vida y cinco vacas en lactación de la raza Holstein Friesian de la granja del Colegio de Postgraduados, localizado en la carretera México - Texcoco, km 36.5, Montecillo, Estado de México. El Colegio de Postgraduados se encuentra ubicado a una altitud de 2240 metros, con temperatura promedio anual de 15.2°C y clima templado subhúmedo con lluvias en verano, época seca en invierno y 650 mm de precipitación promedio anual. Igualmente, se tomaron muestras de calostro de cinco vacas recién paridas del Rancho Xalapango ubicado en Texcoco Estado de México, sobre la carretera Texcoco-Tlaxcala. Todos los animales seleccionados se percibieron sin signos aparentes de enfermedad.

6.1.2 Toma de muestras de mucosa oral

Se tomaron dos muestras de la mucosa oral de cada becerro lactante previa a la ingesta de alimento matutino, con un hisopo 3M™ Swab-Sampler. Para esto se hizo frotar un hisopo por 3 s en la mucosa oral. Inmediatamente después, cada hisopo se colocó dentro de su respectivo dispositivo con 10 mL de agua peptonada buferada (RS96010BPW). Cada muestra tomada se identificó con el siguiente protocolo:

- A) Fecha
- B) Lugar
- C) Hora de muestreo
- D) Número de animal
- E) Número de muestra.

Las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio en un termo con hielo contenido en bolsas de plástico y se mantuvieron en frío hasta el momento de realizar las pruebas. Estas se procesaron 1 h después de su colecta (PROY NOM-109-SSA1-1994).

6.1.3 Muestras de leche de vaca: Fueron tomadas después de realizar la limpieza, desinfección y despunte de pezones, la leche se colectó en frascos estériles de 100 mL. Con guantes estériles se exprimió el pezón para colectar 10 mL de leche de cada vaca, los frascos con las muestras se colocaron en un termo con hielo para ser transportados al laboratorio. Estas se procesaron 1 h después de su colecta.

Las vacas de las que se obtuvieron las muestras tenían entre uno y tres partos con tres y seis meses de lactancia, excepto la vaca número uno, con 4 días de lactancia.

6.1.4 Muestras de calostro congelado: Estas fueron de cinco vacas del Rancho Xalapango. El calostro se encontraba en recipientes y bolsas en un congelador a -5°C. Las muestras de calostro se transportaron en un termo con hielo al laboratorio. Las vacas de las que se obtuvo el calostro se encontraban entre la primera y tercera lactancia, siendo vacas jóvenes y sanas. El calostro tenía menos de 30 días de conservación. Ninguna de las vacas fue medicada con antibiótico después de diagnosticarse como gestante, ni al momento del parto. El calostro obtenido en la primera ordeña presentó características de buena calidad por lo que se congeló para su posterior uso en la alimentación de becerros recién nacidos. La dieta que consumieron estas vacas durante la gestación fue; ensilado de maíz, alfalfa deshidratada, un poco de alfalfa verde, maíz molido, canola, y sorgo molido. El total de muestras obtenidas se resume en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Muestras tomadas de ganado Holstein para el aislamiento de bacterias ácido lácticas

Numero de animales y muestras	Mucosa oral	Leche	Calostro
1	B1OM1	V1/C.P	V1/R.X
	B1OM2		
2	B2OM1	V2/C.P	V2/R.X
	B2OM2		
3	B3OM1	V3/C.P	V3/R.X
	B3OM2		
4	B4OM1	V4/C.P	V4/R.X
	B4OM2		
5	B5OM1	V5/C.P	V5/R.X
	B5OM2		
Total de muestras	10	5	5

B: Becerro, **1-5:** número de animal, **O:** Oral, **M 1, 2:** número de muestra, **V:** Vaca, **C.P:** leche de vacas de la granja del Colegio de Postgraduados, **X.P:** calostro de vacas del rancho Xalapango.

6.1.5 Pre- enriquecimiento de las muestras

6.1.5.1 De mucosa oral: A partir de las 10 muestras obtenidas de la mucosa oral de becerros lactantes se llevó a cabo un pre-enriquecimiento a modo de activación en medio líquido, de acuerdo a la bacteria ácido láctica a aislar (Curk *et al.*, 1996).

De cada una de las muestras contenidas en tubos con 10 mL de suspensión bacteriana, se tomaron 2 mL para inocular tubos con 5 mL de caldo Mann Rogosa Sharp (MRS); 1 mL por tubo, teniendo un lote de 20 tubos inoculados; de estos, 10 se mantuvieron en condiciones aerobias y 10 en anaerobias. Para generar esta última condición, los tubos se colocaron en un desecador con una vela encendida; esto, para consumir el oxígeno de la atmósfera (Cuadro 4).

6.1.5.2 De leche de vaca: Las cinco muestras de leche también se sometieron a un pre enriquecimiento en caldo MRS, inoculando cada tubo con 200 µL de leche (un tubo por muestra), estos tubos se incubaron solamente en condiciones anaerobias. Colocando los tubos en un desecador con una vela encendida.

6.1.5.3 De calostro congelado: Con una espátula estéril se tomaron tres porciones de calostro de cada recipiente y se depositó en vasos de precipitado, previamente identificados, para descongelarlos en baño maría. Posteriormente se tomaron 200 µL por muestra para inocular tubos con 5 mL de caldo MRS (cinco tubos).

Cuadro 4. Medio de pre-enriquecimiento y condiciones de incubación de las muestras obtenidas de mucosa oral, leche y calostro

Muestras	Medio líquido	Temperatura (°C)	Respiración	Tiempo de incubación (h)
Mucosa oral	MRS	37	Aerobiosis y Anaerobiosis	18
Leche de vaca	MRS	37	Anaerobiosis	18
Calostro de vaca	MRS	37	Anaerobiosis	18

MRS: Man Rogosa Sharp.

6.1.6 Enriquecimiento de las muestras

Después de 18 h de incubación, se extrajeron 20 tubos, 10 de aerobiosis y 10 de anaerobiosis, para tomar de cada uno, con un asa bacteriológica estéril una muestra de suspensión. Las muestras se sembraron por separado en cajas Petri con medio sólido MRS. Previo a la toma de muestra cada tubo se agitó en un vórtex por 5 s para homogeneizar la muestra. Se sembraron cuatro cajas por muestra. Las condiciones de incubación se presentan en el Cuadro 5. De igual manera los tubos inoculados con muestras de leche y calostro después de la incubación se sembraron en agar MRS, sembrándose tres cajas por muestra (total 15 repeticiones).

Cuadro 5. Condiciones de cultivo en placa

Muestras	Medio sólido	Temperatura (°C)	Respiración	Tiempo de incubación (h)
Mucosa oral	MRS	37	Anae Ae	48
Leche y calostro	MRS	37	Anae	48

MRS: Man Rogosa Sharp, **Ae:** Aerobiosis. **Anae:** Anaerobiosis

La siembra en cajas Petri con agar MRS se hizo de acuerdo a lo descrito por Pérez *et al.* (1987); esto es en triple estría, flameando y enfriando el asa entre cada estría.

6.1.7 Cepa control positiva y negativa

La cepa *Lactobacillus casei* ATCC se utilizó como control positivo. Esta fue donada por la Dra. Blanca E. García Almendarez, Profesor-Investigador del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, DIPA. PROPAC. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Esta cepa fue conservada originalmente en glicerol y leche descremada al 10% impregnada en chaquiras de cristal perforada de 4 mm (Fisher) y mantenidas en ultra congelación a -70°C. La cepa se trasladó de la Facultad de Química en Querétaro al Colegio de Postgraduados, en un termo con hielo, para mantener la cadena fría, colocándola nuevamente en ultra congelación a -80°C para su posterior activación.

6.1.7.1 Cepa control negativa

Como referencia negativa se utilizó la cepa *E. coli* 042, facilitada por la Ph. D. Ana María Hernández Anguiano. Profesora Investigadora Titular del Colegio de Postgraduados.

6.1.7.2 Activación de las cepas control positiva y negativa

Para la activación de la cepa *Lactobacillus casei*, se tomó una chaquiras del tubo Eppendorf y se introdujo dentro de un tubo con 5 mL de caldo MRS. En el caso de la

E. coli, se tomó muestra de la cepa congelada a -20°C con un asa bacteriológica estéril, y se sembró directamente en placas con agar soya tripticasa, TSA (Cuadro 6).

Cuadro 6. Condiciones de activación de las cepas control

Bacterias	Medio líquido	Temperatura (°C)	Respiración	Tiempo de incubación (h)
<i>Lactobacillus casei</i>	MRS	37	Anaerobia	18
<i>E. coli</i>	TSA	37	Aerobia	24

MRS: Man Rogosa Sharp, **TSA:** Agar soya tripticasa

Después de la activación de *Lactobacillus casei* se sembró en agar MRS y se incubaron las dos cepas de referencia por 48 h a 37°C

6.1.8 Criterios de Selección de cepas aisladas

A partir de las colonias crecidas en agar MRS se procedió a seleccionar aquellas que cumplieron con las características de la cepa *L. casei* (control positiva) y de estas, obtener cultivos puros. La selección se realizó mediante la observación macroscópica directa de las colonias considerando: tamaño, forma, superficie, elevación, borde y color.

6.2 Selección de bacterias ácido lácticas de acuerdo a características morfológicas y bioquímicas

6.2.1 Tinción de Gram

Esta prueba se realizó para clasificar las bacterias según su pared celular en Gram positivas o negativas y observar la morfología celular de los diferentes géneros: La tinción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Pérez *et al.* (1987).

Las especies del género *Lactobacillus* son Gram positivas.

6.2.2 Tinción de esporas

El objetivo de esta tinción fue determinar la formación de endoesporas de las cepas Gram positivas seleccionadas con el método de Schaeffer y Fulton. Las bacterias de *Bacillus* y *Clostridium* se caracterizan por formar endoesporas. Por el contrario, las cepas de *Lactobacillus*, no forman endoesporas. Esta tinción se aplicó a las cepas Gram positivas seleccionadas.

Se extendió una porción de una colonia bacteriana sobre una gota de agua en un portaobjetos y se fijó a la llama, posteriormente se aplicó verde malaquita y se dejó actuar el colorante por 10 min. Se lavó con agua corriente de la llave. Enseguida se añadió safranina durante 15 s. Las esporas se tiñen color verde. Las células bacterianas se tiñen color rosa.

6.2.3 Conservación de las cepas

Después de obtener las colonias puras y realizar las pruebas morfológicas, las cepas se conservaron. Estas se hicieron crecer por 18 h en 5 mL de caldo MRS. De cada suspensión bacteriana se tomaron 800 μ L y se depositaron en un tubo Eppendorf con 800 μ L de glicerol al 50% (estéril) como crioprotector. Cada tubo con suspensión bacteriana se conservó por duplicado a -80°C y a -20°C (se clasificaron en lote A y B respectivamente). Del lote B, se tomaron las cepas para realizar las distintas pruebas de identificación.

6.2.4 Prueba de la catalasa

Esta prueba identifica las bacterias que sintetizan la enzima catalasa, con la que son capaz de destruir los derivados tóxicos del oxígeno generados por algunas bacterias (Naidu *et al.*, 1999). Las especies del género *Lactobacillus*, son catalasa negativo ya que son anaerobias y carecen de esta enzima.

Se tomó una colonia con el asa bacteriológica y se colocó sobre un portaobjetos (sin añadir agua). Posteriormente se añadió a la colonia unas gotas de agua oxigenada. La reacción positiva de la catalasa implica desprendimiento de oxígeno. La formación de burbujas indicó la presencia de la enzima catalasa.

6.2.5 Producción de Indol

Se trata de detectar la producción de indol a partir del triptófano del medio, por medio de la triptofanasa de la bacteria, que hidroliza dicho ácido. Para detectar la liberación del anillo indólico del triptófano, que es el único aminoácido que lo contiene, se utiliza el medio de cultivo SIM, el cual sirve para realizar además la prueba de motilidad.

Con el asa bacteriológica previamente flameada se tomó una muestra de la colonia seleccionada y se sembró en el medio SIM por picadura, hasta que las 2/3 partes del medio quedaron inoculadas. Los tubos se incubaron en condiciones anaerobias y aerobias a 37°C por 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó en cada tubo cinco gotas del reactivo de Kovacs (Álvarez y Barajas, 1981). La reacción se produce de manera inmediata al formarse el anillo indólico (el reactivo se torna rojo) o bien, el reactivo permanece amarillo.

6.2.6 Motilidad

La motilidad de las bacterias está dada por flagelos, misma que puede apreciarse cuando es sembrada por una sola picadura con el asa recta en el medio SIM (Álvarez y Barajas, 1981). La motilidad de las bacterias se observó en el medio como una zona nebulosa mas halla de la zona de inoculación. En contraste las bacterias sin motilidad solo crecieron en la línea de inoculación.

6.2.7 Reducción de nitratos

El caldo nitrato tiene como ingrediente principal el nitrato de potasio. Es un líquido transparente. Los tubos con caldo nitrato fueron inoculados tomando una colonia con la asa bacteriológica y esta se agitó dentro del caldo. Se colocaron los tubos en condiciones anaerobias y aerobias y se mantuvieron en incubación a 37°C por 48h. Después de la incubación se agregaron al medio, cinco gotas del reactivo nitritos "A" y nitritos "B" (Álvarez y Barajas, 1981). El principio fue identificar si la bacteria puede producir enzimas que reduzcan los nitratos del medio a nitritos. En la reacción positiva el medio adquiere un color rojo intenso, lo que indica la presencia de nitritos. La reacción negativa no muestra cambio de color en el medio.

6.2.8 Hidrolisis de la gelatina

Esta prueba se basa en detectar si la bacteria produce la enzima extracelular llamada gelatinasa. La gelatina es una proteína que forma un gel cuando es disuelta en agua. Esta proteína puede ser degradada por algunos microorganismos dando como resultado la pérdida de su capacidad para formar gel (método modificado de Álvarez y Barajas, 1981).

Se tomó una muestra de la colonia seleccionada con el asa bacteriológica y se sembró por picadura en el medio gelatina nutritiva, cada tubo se mantuvo a temperatura ambiente en condiciones anaerobias en un desecador por 48 h.

Si la Gelatina nutritiva no permanece sólida después del periodo de incubación, aun manteniendo el tubo en refrigeración a 4°C, la reacción es positiva. Cuando el medio permanece sólido, la reacción es negativa.

Nota: la incubación se realizó a temperatura ambiente porque se comprobó con anterioridad que al someter la gelatina a 37°C se hidrolizaba aun sin estar inoculada.

6.3 Determinación de la resistencia y supervivencia de las cepas seleccionadas a condiciones de pH ácido y a sales biliares

6.3.1 Preparación del inóculo

Dieciséis cepas ácido lácticas aisladas de mucosa oral (8), de calostro (6) y de leche (2) mantenidas a -20°C (Cuadro 7), se reactivaron en tubos con 5 mL de caldo MRS. Después de incubarse a 37°C en condiciones anaerobias por 24 h, se depositó 1 mL de la suspensión bacteriana en tubos con 9 mL de caldo MRS y se incubaron por 18 h en las mismas condiciones. La cantidad de inóculo utilizado fue de 10^6 UFC/mL.

El procedimiento utilizado para someter a las cepas a un estrés ácido fue una modificación al protocolo descrito por Fernández de Palencia *et al* (2008). Las modificaciones consistieron en el uso de leche líquida y la RCF (g) con las que se centrifugo la suspensión bacteriana para la sedimentación de las células.

Cuadro 7. Cepas seleccionadas para la prueba de resistencia y supervivencia a pH ácido.

Número de cepa	Mucosa oral	Calostro	Leche
1	B1/2-2 AB	V2/1 R. X	V1/ CP
2	B3/1-1 AB	V2/2 R.X	V1/C2 CP
3	B4/1-1 AB	V3/1 R.X	
4	B1/1-2 MB2	V3/2 C1 R.X	
5	B2/2-2 MB	V3/3 C1 R.X	
6	B3/1-2 MB	V5/3 C2 R.X	
7	B3/2-1 MB		
8	B5/1-2 MB		
Cepa control	<i>L. casei</i>		

B1-5: Numero de becerro, **O:** Oral, **1-1:** repeticion 1, **1-2:** repeticion 2, **2-1:** repeticion 3, **2-2:** repeticion 4
A: aerobiosis, **M:** microaerofilia, **B:** lote de cepas, **V1-5:** número de Vaca, **/1-3:** numero de repetición, **C1-2:** diferente cepa. **R.X.:** calostro de vacas del rancho Xalapango. **C.P:** leche de vacas de la granja de Colegio de Postgraduados. La selección de las cepas se realizó mediante un muestreo aleatorio sistemático (mucosa oral) y por muestreo aleatorio simple (calostro y leche juntos).

Nota: pruebas preliminares de resistencia a pH ácido (2.5, 3.0 y 3.5), realizadas a la cepa testigo y a la cepa B1/1-2MB2 demostraron la sensibilidad intrínseca de las cepas a estos pHs, ya que no fue posible recuperar colonias en agar MRS, inmediatamente después de la exposición ácida. Por ello, las cepas seleccionadas se sometieron sólo a pH 4.5 y 4.0, siendo el pH presente en el intestino delgado.

6.3.1. 2 Resistencia y Supervivencia a pH ácido.

La suspensión bacteriana obtenida se centrifugó a 2056 x g por 10 min y el paquete celular sedimentado se resuspendió en 10 mL de leche semidescremada (Alpura® 2000®) para la prueba de resistencia y supervivencia a pH 4.5 y pH 4.0. Previamente la leche se esterilizó a 110°C por 15 min y se determinó el pH de esta. En este caso la leche registro un pH entre 6.3 y 6.5.

Para la prueba se incluyó la cepa *Lactobacillus casei* como control positivo y se probaron las 16 cepas ácido lácticas, indicadas arriba (Cuadro 7). La resistencia y supervivencia de las cepas ácido lácticas a condiciones de pH ácido, se probó

modificando progresivamente el pH de la suspensión bacteriana en leche del valor inicial de 6.5 a 5.5, 4.5 y 4.0 con la adición de HCl al 1N. Una vez alcanzado el pH de 4.5 y 4.0, la suspensión se incubó a 37°C por 10 min. Transcurrido este tiempo, se tomó 1 mL de cada una de las suspensiones para hacer diluciones seriadas y recuperar las células viables en agar MRS. Lo anterior se hizo por duplicado para cada una de las cepas.

Las diluciones de las suspensiones de las cepas ácido lácticas y cepa control que se sembraron en agar MRS fueron las siguientes. A pH de 4.5 las diluciones fueron desde 10^{-3} hasta 10^{-6} y para el pH de 4.0 desde 10^{-1} hasta 10^{-3} . Como referencia de las cepas se incluyó la suspensión en leche sin ajuste de pH (6.3-6.5 original) y se sembró en agar MRS las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} .

6.3.2 Resistencia y supervivencia a la exposición a sales biliares

Fueron expuestas a sales biliares de bovino (Oxgall DifcoTM) 17 cepas de mucosa oral, 8 de calostro y dos de leche, siendo seleccionadas las cepas por su morfología de cocobacilos y bacilos (Cuadro 8).

6.3.2.1 Preparación del reactivo

Las cepas de mucosa oral, calostro y leche se expusieron a dos concentraciones de sales biliares: 0.3 g y 1.5 g/100 mL de caldo MRS. Para preparar las soluciones se usaron sales biliares de origen bovino (Oxgall DifcoTM) disueltas en caldo MRS en matraces de 250 mL.

6.3.2.2 Inoculación de las placas de microtitulación

Se utilizaron placas de microtitulación de 24 pozos BD PrimariaTM con capacidad de 3.5 mL. Se utilizó una placa para cada concentración. Para cada cepa bacteriana se usaron 6 pozos, 2 para testigos negativos (solución MRS con sales biliares sin inocular), 3 para la concentración de 0,3 y 1.5 g de SB respectivamente y 1 como control (caldo MRS inoculado sin sales biliares). En cada pozo de la placa se depositaron 2 mL de solución (caldo MRS con sales biliares) este a su vez fue inoculado con 20 μ L (1:10 v/v) de la suspensión bacteriana crecida por 18 h, realizándose por triplicado. Todas las

cepas fueron expuestas a estas concentraciones y se evaluó su supervivencia y capacidad de crecimiento midiendo el cambio de turbidez (del caldo MRS inoculado), en un Espectrofotómetro (GENESYS 10 UV/ Thermo Spectronic) por densidad óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) en los dos tratamientos. Las mediciones se realizaron a la hora cero (0 h), a la que se denominó tiempo 1 después de inocular el caldo (se determinó como inóculo inicial), el proceso duró de 5 a 8 min. La segunda lectura se realizó después de 24 h de incubación (24 h), denominado tiempo 2, para evaluar su capacidad de crecimiento. Para esto las placas fueron incubadas por 24 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis.

Cuadro 8. Cepas ácido lácticas expuestas a sales biliares (Oxgall)

Mucosa oral Aerobiosis	Mucosa oral Anaerobiosis	Calostro Anaerobiosis	Leche Anaerobiosis
B1O/1-1A B1	B1O/2-2MB1	V2/1 R. X	V1/ C.P
B1O/2-2A B1	B2O/1-2MB1	V2/2 R.X	V1/C2C.P
B2O/1-1A B1	B2O/2-2MB1	V2/3 R.X	
B3O/1-1A B1	B2O/2-2MB2	V3/1 R.X	
B3O/2-1A B2	B3O/1-2MB1	V3/2 C1 R.X	
B4O/1-1A B1	B3O/1-2MB2	V3/3 C1 R.X	
B1O/1-2MB2	B3O/2-1MB1	V5/1 R.X	
	B3O/2-2MB1	V5/3 C2 R.X	
	B4O/1-1MB1		
	B5O/1-2MB1		

B1-5: Numero de becerro, **O:** Oral, **1-1:** repeticion 1, **1-2:** repeticion 2, **2-1:** repeticion 3, **2-2:** repeticion 4
A: aerobiosis, **M:** microaerofilia, **B:** lote de cepas, **V1-5:** número de Vaca, **/1-3:** numero de repetición, **C1-2:** diferente cepa. **R.X.:**calostro de vacas del rancho Xalapango. **C.P:** leche de vacas de la granja del Colegio de Postgraduados

Se evaluó el incremento o decremento en crecimiento (en porcentaje) de las cepas ácido lácticas expuestas a las sales biliares, utilizando los valores de densidad óptica ($D.O_{600\text{nm}}$) obtenidos a la hora cero (inóculo inicial) y a las 24 h. La fórmula utilizada se presenta enseguida:

$$\text{Incremento o decremento \%} = \frac{\Delta D.O_{24\text{ h}} - \Delta D.O_{0\text{ h}}}{\Delta D.O_{0\text{ h}}} \times 100$$

6.4 Identificación bioquímica de las cepas mediante el sistema API50CHL y colección de cepas con potencial probiótico.

6.4.1 Identificación

La identificación se basa en determinar el patrón de fermentación de carbohidratos y sus derivados por parte de los microorganismos (heterosidos, polialcoholes y ácidos urónicos (Kandler y Weiss, 1992) por el sistema API 50 CHL, el cual consiste en un dispositivo de plástico con 50 microtubos que contienen diferentes sustratos y es específico para cepas del género *Lactobacillus*.

6.4.2 Preparación de cultivos

Se activaron las 27 cepas seleccionadas (Diecisiete de mucosa oral, ocho de calostro y dos de leche), conservadas a -20°C, inoculando tubos con 5 mL de caldo MRS, los tubos se incubaron por 18 h en condiciones anaerobias a 37° C. Posteriormente se sembraron cada una de las cepas en agar MRS y se incubaron por 48 h.

6.4.2.1 Inoculación y llenado de la galería API 50CHL

Con un asa bacteriológica se tomó la muestra de las colonias y se realizó la suspensión en el medio diluyente 50CHL (suministrado con la galería API50CH) frotando el asa contra la pared del tubo hasta la disolución completa de las colonias. Después, se distribuyó el contenido del medio 50CHL en todos los microtubos de la galería utilizando una micropipeta. Por último se llenó la cúpula de cada tubo con aceite mineral estéril para garantizar la anaerobiosis. Las galerías se incubaron a 37° C durante 48 h. La interpretación de resultados se realizó con la identificación de cambio de color en el medio API50CHL de cada microtubo; el azul indicó un valor negativo y el amarillo y negro indicaron valores positivos (hoja de seguridad placas). Los datos fueron analizados con el sistema computarizado Apiweb®.



Figura 3. Galería API con medio de cultivo 50CHL inoculado con una cepa ácido láctica



Figura 4. Galerías API50CH inoculadas con cepas seleccionadas e incubadas a 37°C por 48 h.

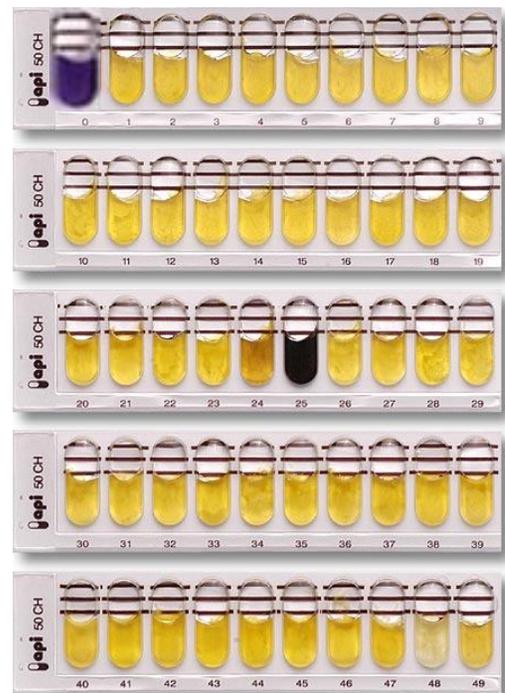


Figura 5. Expresión de resultados por cambio de color del medio API50CHL. Donde: azul: negativo, amarillo y negro: positivo.

Las cepas que cumplieron con los requisitos preestablecidos fueron guardadas por duplicado en cajas de conservación a -20°C, como parte de la colección de cepas con potencial probiótico. En el cuadro 9. Se detalla el nombre y orden en el que se encuentran los sustratos en las galerías API50CHL.

Cuadro 9. Sustratos contenidos en la galería API50CHL

Tubo	Ensayo	Sustrato	Tubo	Ensayo	Sustrato
					Esculina y citrato
0		Control negativo	25	ESC	férrico
1	GLY	Glicerol	26	SAL	Salicina
3	ERY	Eritriol	27	CEL	D-Celobiosa
4	DARA	D-Arabinosa	28	MAL	D-Maltosa
5	LARA	L-Arabinosa	29	LAC	D-Lactosa
6	RIB	R-Ribosa	30	MEL	D-Melibiosa
7	DXYL	D-Xilosa	31	SAC	D-Sacarosa
			32	TRE	D-Treolasa
8	ADO	D-Adonitol	33	INU	Inulina
		Metil-BD-			
9	MSX	Xilpiranosido	34	MLZ	D-Melecitosa
10	GAL	D-Galactosa	35	RAF	D-Rafinosa
11	GLU	D-Glucosa	36	AMD	Almidon
12	FRU	D-Fructuosa	37	GLYG	Glicogeno
13	MNE	D-Manosa	38	XLT	Xilitol
14	SBE	L-Sorbosa	39	GEN	Gentiobiosa
15	RHA	L-Ramnosa	40	TUR	D-Turanosa
16	DUL	Dulcitol	41	LYX	D-Lixosa
17	INO	Inositol	42	TAG	D-Tagatosa
18	MAN	D-Manitol	43	DFUC	D-Fucosa
19	SOR	D-Sorbitol	44	LFUC	L-Fucosa
		Metil- α D-			
20	MDM	Manopiranosido	45	DARL	D-Arabitol
		Metil- α D-			
21	MDG	Glucopiranosido	46	LARL	L-Arabitol
		N-			
22	NAG	Acetilglucosamida	47	GNT	Gluconatopotásico
23	AMY	Amigdalina	48	2KG	2-Cetogluconato
					potásico
24	ARB	Arbutina	49	5KG	5-Cetogluconato
					potásico

6.4.3 Análisis estadístico

Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar, con arreglo factorial (Factor cepas/ factor pH y factor sales biliares) mediante el programa GLM y MIXED. Las UFC de la prueba de pH fueron transformadas a Log_{10} . La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey a un nivel mínimo de significancia de 0.05, utilizando el paquete estadístico SAS (2002-2010). Los datos obtenidos en porcentajes fueron discutidos cuantitativamente.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento y selección de colonias con características de bacterias ácido lácticas

7.1.1 Crecimiento en caldo MRS

Transcurridas las 18 h de incubación de las muestras de mucosa oral, calostro y leche se observó una marcada turbidez en el caldo MRS y sedimento de células bacterianas en el fondo de los tubos, indicando el crecimiento de las bacterias en condiciones aerobias y anaerobias, excepto en cuatro tubos con muestras de leche en los que no se percibió turbidez.

7.1.2 Crecimiento de colonias en agar MRS de muestras de mucosa oral

Se observó un crecimiento óptimo de colonias a las 48 h de incubación en las 40 placas sembradas. Las colonias crecidas en condiciones anaerobias se detectaron ligeramente más desarrolladas que las crecidas en condiciones aerobias. Sin embargo, en ambas condiciones se presentó el mismo patrón de crecimiento, hubo presencia de colonias pequeñas, medianas y grandes, de 2 a 4 mm de diámetro en promedio. Todas las colonias aisladas presentaron las mismas características morfológicas, es decir, formaciones circulares, elevación convexa, borde entero, superficie lisa y color blanco sin pigmentos, lo que coincide con lo descrito por Kandler y Weiss (1992). Estos autores señalaron que los lactobacilos tienen la capacidad de transferirse de la vida anaerobia a la aerobia y de transformar la glucosa y hexosas en ácido láctico por homofermentación, o bien en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico por heterofermentación. Las imágenes de las colonias de las cepas aisladas en este estudio se presentan en las Figuras 6 y 7.



Figura 6. Colonias de la cepa B3/2-1 AB, obtenidas de la mucosa oral, a las 48 h de crecimiento en agar MRS en condiciones aerobias

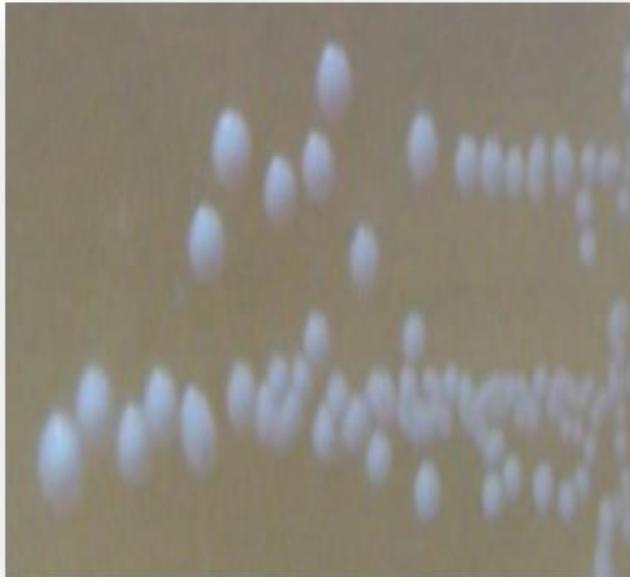


Figura 7. Colonias de la Cepa B1/1-2MB2, obtenidas de la mucosa oral, a las 48 h de crecimiento en agar MRS en condiciones anaerobias

7.1.3 Crecimiento de colonias en agar MRS de muestras de calostro y leche

Las colonias aisladas de calostro difirieron de las de mucosa oral por el color siendo estas de un color beige y con tamaño más variable entre repeticiones de 1 a 5 mm de diámetro (Figuras 8 y 9). De los muestras de leche, solamente el 20% tuvo crecimiento de colonias, estas tuvieron un tamaño promedio de 2.5 mm y la misma morfología y color de las cepas de mucosa oral. Isolauri, (2001) y Coeuret *et al.* (2003), mencionan la posibilidad de encontrar lactobacilos en leche cruda, calostro y productos lácteos como el queso y leches fermentadas.



Figura 8. Colonias de la cepa V1/2 R. X., obtenidas de calostro, a las 48 h de crecimiento en agar MRS.



Figura 9. Colonias de la cepa V3/2C1R.X., obtenidas de calostro, a las 48 h de crecimiento en agar MRS.

En base a la morfología colonial fueron seleccionadas en total 56 cepas (35 de la mucosa oral, 19 cepas de calostro y 2 de leche). En el Cuadro 10 se muestran las cepas seleccionadas.

Cuadro 10. Cepas seleccionadas con base en su morfología colonial

Mucosa Oral Aerobiosis	Mucosa Oral Anaerobiosis	Calostro	Leche
B1O/1-1 A B1	B1O/1-2M B2	V1/1 R.X	V1/ CP
B1O/2-2 A B1	B1O/2-2M B1	V1/2 R.X	V1/C2 CP
B2O/1-1 A B1	B2O/1-1M B1	V1/3 R.X	
B2O/1-1 A B2	B2O/1-2M B1	V2/1 R.X	
B3O/1-1 A B1	B2O/2-2M B1	V2/2 R.X	
B3O/2-1 A B1	B2O/2-2M B2	V2/3R.X	
B3O/2-1 A B2	B3O/1-1M B1	V3/1 R.X	
B4O/1-1 A B1	B3O/1-2M B1	V3/2 C1 R.X	
B4O/1-1 A B2	B3O/1-2M B2	V3/2 C2 R.X	
B4O/2-1 A B1	B3O/2-1M B1	V3/3 C1 RX	
B4O/2-1 A B2	B3O/2-2M B1	V3/3C2 R.X	
B4O/2-2 A B1	B4O/1-1M B1	V3/3 R.X	
B4O/2-2 A B2	B4O/2-1M B1	V4/1 RX	
B5O/1-1 A B1	B4O/2-1M B2	V4/2 RX	
B5O/2-1 A B1	B4O/2-2M B1	V4/3 RX	
	B5O/1-1M B1	V5/1 RX	
	B5O/1-2M B1	V5/2 RX	
	B5O/2-1M B1	V5/3 C1 RX	
	B5O/2-1M B2	V5/3C2 RX	
	B5O/2-2M B1		

B1-5: Número de becerro, **O:** Oral, **1-1:** repetición 1, **1-2:** repetición 2, **2-1:** repetición 3, **2-2:** repetición 4
A: aerobiosis, **M:** microaerofilia, **B:** lote de cepas, **V1-5:** número de Vaca, **/1-3:** número de repetición, **C1-2:** diferente cepa. **R.X.:** calostro de vacas del rancho Xalapango. **C.P:** leche de vacas de la granja de Colegio de Postgraduados

7.2 Selección de bacterias ácido lácticas de acuerdo a características morfológicas y pruebas bioquímicas

En los Cuadro 11 y 12 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de identificación y bioquímicas a las que se sometieron las 35 cepas aisladas en condición aerobias (15 cepas) y anaerobias (20 cepas) de la mucosa oral de becerros.

Cuadro 11. Pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a cepas procedentes de mucosa oral de becerros Holstein, obtenidas en condiciones aerobias

Cepas (Código)	Tinción Gram	Morfología	Tinción de esporas	Catalasa	Motilidad	Indol	Gelatinasa	Reducción de nitratos
B1O/1-1 A B1	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
B1O/2-2 A B1	+	Cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B2O/1-1 A B1	+	Cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B2O/1-1 A B2	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
B3O/1-1 A B1	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
B3O/2-1 A B1	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
B3O/2-1 A B2	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B4O/1-1 A B1	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
B4O/1-1 A B2	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B4O/2-1 A B1	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
B4O/2-1 A B2	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
B4O/2-2 A B1	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
B4O/2-2 A B2	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
B5O/1-1 A B1	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
B5O/2-1 A B1	+	Cocos	-	-	-	-	-	-

Nota: **B1-5:** Número de becerro, **O:** oral, **1-1:** repetición 1, **1-2:** repetición 2, **2-1:** repetición 3, **2-2:** repetición 4, **A:** Aerobiosis, **B:** lote de cepas **(+):** reacción positiva, **(-):** reacción negativa,

Cuadro 12. Pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a cepas procedentes de mucosa oral de becerros Holstein, obtenidas en condiciones anaerobias

Cepas (Código)	Tinción Gram	Morfología	Tinción de esporas	Catalasa	Motilidad	Indol	Gelatinasa	Reducción de nitratos
B1O/1-2M B2	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
B1O/2-2M B1	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
B2O/1-1M B1	+	cocos	-	-	-	-	-	-
B2O/1-2M B1	+	cocobacilos	-	-	+	-	-	-
B2O/2-2M B1	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B2O/2-2M B2	+	cocobacilos	-	-	+	-	-	-
B3O/1-1M B1	+	cocos	-	-	-	-	-	-
B3O/1-2M B1	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B3O/1-2M B2	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B3O/2-1M B1	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B3O/2-2M B1	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B4O/1-1M B1	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B4O/2-1M B1	+	cocos	-	-	-	-	-	-
B4O/2-1M B2	+	cocos	-	-	-	-	-	-
B4O/2-2M B1	+	cocos	-	-	-	-	-	-
B5O/1-1M B1	+	cocos	-	-	-	-	-	-
B5O/1-2M B1	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B5O/2-1M B1	+	cocobacilos	-	-	-	-	-	-
B5O/2-1M B2	+	cocos	-	-	-	-	-	-
B5O/2-2M B1	+	cocos	-	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	Bacilos	-	+	+	+	-	+

B1-5: Número de becerro, **O:** oral, **1-1:** repetición 1, **1-2:** repetición 2, **2-1:** repetición 3, **2-2:** repetición 4, **M:** microaerofilia, **B:** lote de cepas **(+):** reacción positiva, **(-):** reacción negativa.

Con la morfología celular se determinó que el 40% de las cepas de mucosa oral fueron cocobacilos y solo el 10.4 % bacilos, el 49.6% restante fueron cocos. La morfología celular se observa en las Figuras 10 y 11.

Las dos cepas aisladas de leche resultaron bacilos Gram +; de calostro, 3 cepas presentaron morfología celular de bacilos, 5 de cocobacilos y 9 forma de cocos. Estas se muestran en las Figuras 12 y 13. Durante la purificación de cultivos se perdieron dos cepas de calostro. Evaluando solo 17 cepas. Los resultados de las pruebas bioquímicas se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Pruebas morfológicas y bioquímicas aplicadas a cepas procedentes de leche y calostro de ganado Holstein, obtenidas en condiciones anerobias

CEPAS (Código)	Tinción Gram	Morfología	Tinción de esporas	Catalasa	Motilidad	Indol	Gelatinasa	Reducción de nitratos
V1CP	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
V1/ C2 CP	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
V1/1R.X	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
V1/2 R.X	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
V1/3 R.X	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
V2/1R.X	+	Cocobacilos	-	-	-	-	-	-
V2/2R.X	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
V2/3 R.X	+	Cocobacilos	-	-	-	-	-	-
V3/1 R.X	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
V3/2 C1 R.X	+	Cocobacilos	-	-	-	-	-	-
V3/2 C2 R.X	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
V3/3 C1 R.X	+	Cocobacilos	-	-	-	-	-	-
V4/1R.X	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
V4/2 R.X	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
V4/3 R.X	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
V5/1 R.X	+	Cocobacilos	-	-	-	-	-	-
V5/2 R.X	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
V5/3 C1 R.X	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
V5/3 C2 R.X	+	Cocos	-	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	+	Bacilos	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	Bacilos	-	+	+	+	-	+

V: vaca, **1-5:** número de vaca, **/1-3:** repeticiones, **C.P:** leche de vacas de la granja de Colegio de Postgraduados, **R.X.:** calostro de vacas del rancho Xalapango, **C1-2:** diferente colonia de la repeticion. **(+):** reaccion positiva, **(-):** reaccion negativa.

El estudio de la morfológica celular y las pruebas bioquímicas son reportadas como basicas para la selección de cepas probióticas (Rodriguez-Palacios, 2008; Rodriguez, 2009; Jaramillo *et al.*, 2010). Sin embargo, es necesario la complementacion molecular (Marroki *et al.*, 2011).

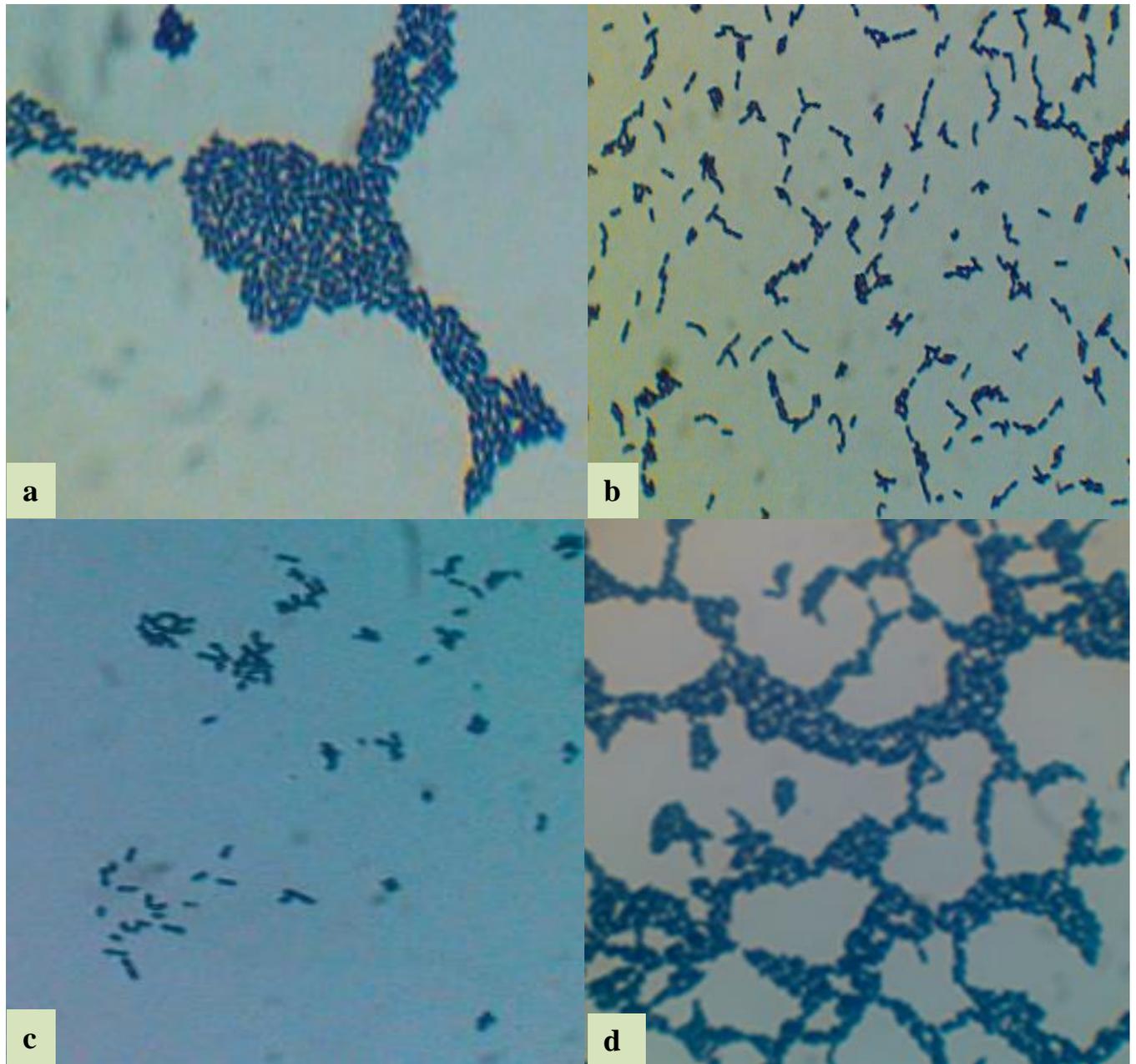


Figura 10. Células de colonias ácido lácticas teñidas para la prueba de Gram, mostrando la morfología característica de bacilos Gram+, al microscopio compuesto (100X). Las células se obtuvieron de colonias crecidas en agar MRS por 48 h. Dónde: Cepas de mucosa oral, a) B3O/2-1AB2 y b) B3O/1-1AB; cepa de leche, c) V1/CP; y cepa de calostro d) V5/3 C2 R.X

Se aislaron un total de 35 cepas de la mucosa oral (15 en aerobiosis y 20 en anaerobiosis), 17 de calostro y 2 de leche. Solo fueron seleccionadas el 50% de estas cepas en base a su morfología celular de cocobacilos y bacilos. Las cepas con morfología de cocos fueron descartadas para las pruebas posteriores, ya que este estudio se enfocó únicamente en obtener bacterias probióticas con la morfología citada.

7.3 Resistencia y supervivencia de las cepas ácido lácticas a condiciones de pH ácido

Las bacterias probióticas para poder llegar a su sitio de acción y mantenerse viables deben ser capaces de resistir el pH ácido y la presencia de sales biliares en el duodeno (Salminen *et al.*, 1998b). Bajo estas condiciones, se realizaron las pruebas de capacidad probiótica. Las cepas seleccionadas de mucosa oral, leche y calostro se sometieron a pH ácido por 10 min siguiendo la metodología de Fernández de Palencia *et al.* (2008), obteniéndose los siguientes resultados:

Hubo diferencias estadísticas significativas ($p < 0.0001$) con pH de 4.0. En este pH el crecimiento de colonias disminuyó de 3 a 5 $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ con respecto al pH control (pH 6.5). Las cepas que mostraron mayor resistencia fueron: V1/CP, V1/C2 C. P, V2/1R.X, V3/1 R.X, V3/3 R.X, V5/3 C2 R.X; y B1O/1-2 MB2, B3O/1-1AB, presentando un crecimiento promedio de 5.09 $\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$ (2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 16, estos son los números correspondientes a cada cepa). El resto de las cepas fueron severamente afectadas a pH 4.0, disminuyendo su crecimiento en más del 50% o incluso el 100%. Por otro lado, las cepas que mostraron mayor resistencia a pH 4.5 fueron: V2/1R.X, B1O/1-2MB2, B3O/1-1AB, y B4O/1-1AB (4, 10, 16, 17), mientras que las cepas restantes presentaron un nivel intermedio de crecimiento. No se presentaron diferencias estadísticas de crecimiento entre los grupos con pH de 6.5 y 4.5 ($P > 0.05$). El Cuadro 14, muestra los resultados descritos.

Cuadro 14. Recuento de colonias recuperadas en agar MRS, después de la exposición a pH ácido

	T1 pH 6.5	T2 pH 4.5	T3 pH 4.0
Número de cepa	Log ₁₀ CFU/ml		
1	9.40	9.21	5.74
2	8.77	8.40	5.08
3	9.46	8.43	5.49
4	9.02	9.36	5.09
5	9.06	7.23	4.83
6	8.28	7.67	5.06
7	8.78	8.47	4.01
8	8.71	8.49	6.43
9	9.36	8.39	6.47
10	9.39	9.11	5.44
11	9.37	8.68	N.C
12	9.36	8.84	N.C
13	8.82	8.48	3.33
14	9.02	8.14	N.G
15	9.15	8.31	N.G
16	9.32	9.14	5.34
17	9.32	8.95	4.52
Media	9.07	8.50	5.09

*= corresponde a la cepa testigo *L. casei*.

Los datos son los valores de las medias de tres repeticiones y corresponden a las UFC/mL expresadas en LOG₁₀. **GLM:** Se encontraron diferencias significativas (P< 0.0001) en el tratamiento 3. **N.C:** No crecimiento.

La respuesta de estas cepas al pH ácido contrasta con la Respuesta Acido Tolerante (ATR), o resistencia adquirida documentada por Broadbent *et al.* (2010) quienes reportaron que al comparar células crecidas a pH 6.0 (control) con células adaptadas a pH 4.5 por 10 min y células adaptadas a pH 4.5 por 20 min y posteriormente a pH 2.0 por 10 o 20 min, mostraron diferencias en la expresión de numerosos genes. Presentando en el primer caso una gran disminución de viabilidad hasta de 4.0 Log₁₀, y de 0.7 a 2.4 Log₁₀ UFC/mL y 0.7 a 3.4 Log₁₀ UFC/mL en 10 y 20 min de adaptación

respectivamente. Estos autores, mencionan que la adaptación de las células al ácido provoca cambios en la composición de lípidos de la membrana, mostrando un dramático incremento de ácidos grasos saturados e insaturados de ácido ciclopropano. La predicción funcional de estos genes indicaron que la adaptación ácida induce a una fuerte respuesta que va acompañada con otras funciones, particularmente una fermentación maloláctica y acumulación intracelular de histidina, la cual fue importante para la resistencia a la acides. En ese experimento para que *L. casei* sobreviviera a pH 2.5 se tuvo que adicionar 30 mM de malato o 30 mM His al medio.

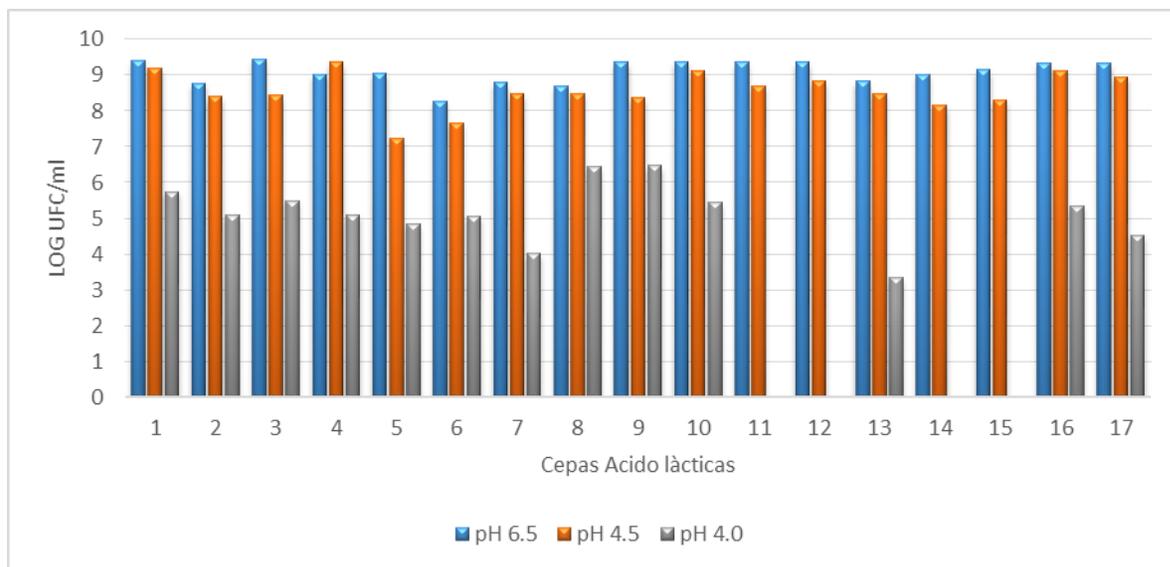


Figura 11. Supervivencia de las cepas ácido lácticas a condiciones de pH ácido

Las medias expresan los resultados en Log₁₀ UFC/mL de cada cepa. Hubo diferencias significativas (P<0.0001) con pH 4.0. Las cepas 11, 12, 14, 15 no resistieron el pH 4.0.

La cepa *L. casei* tuvo una buena respuesta a las condiciones de pH ácido con respecto a las cepas seleccionadas. Por encima de esta, se colocó la cepa V2/1 R.X (4), V3/3 R.X (8) y V5 /3 C2 R.X (9).

Vinderola y Reinheimer (2003) encontraron que las bacterias productoras de ácido láctico (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Lactococcus lactis*) mostraron menor resistencia a condiciones de pH 2.0 y 3.0 que las bacterias probióticas; disminuyendo como mínimo 6.0 log en el pH 2.0. La mayor

pérdida de viabilidad celular a pH 3.0 la presentó *S. thermophilus* y una mejor resistencia *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* sólo a pH 3.0. De las bacterias probióticas evaluadas (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium*) la cepa con mayores valores de resistencia a jugos gástricos y bilis fue *L. acidophilus* la cual tuvo la menor pérdida de viabilidad con rangos de 3.4 a 5.0 Log y de 0.7 a 3.3 Log en pH 2.0 y 3.0, respectivamente, mientras que *L. casei* y *L. rhamnosus* presentaron una pérdida de viabilidad de 5.0 Log a pH 2.0 y de 2.7 a 5.9 Log en pH 3.0.

Según Charteris *et al.* (1998), Chung *et al.* (1999) y Xanthopoulos *et al.* (2000), señalan importantes diferencias en la resistencia a pH ácido entre las mismas cepas de lactobacilos y de bifidobacterias. Por otro lado, Jin *et al.* (1998) reportaron que los lactobacilos son resistentes a la acidez, presentando un crecimiento moderado a pH 3.0 y un mejor desarrollo a pH 4.0.

Por otra parte, las bacterias productoras de ácido láctico no formaban parte de la alimentación, debido a su pobre capacidad para sobrevivir a través del paso del tubo digestivo aun siendo probióticas (IDF, 1999). Sin embargo, investigadores como Lee *et al.* (1999) y Naidu *et al.* (1999), señalaron que bajo ciertos criterios se incluyeron *S. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* como miembros del grupo de microorganismos probióticos, ya que son capaces de liberar enzimas como *B-galactosidasa* que mejoran la digestión de nutrientes en el intestino y modulan la respuesta inmune. Asimismo, evaluaron la resistencia a sales biliares con 0.3, 0.5 y 1% de bilis, encontrando también una mayor inhibición de las bacterias productoras de ácido láctico. *S. thermophilus* resultó la cepa más sensible a la concentración del 0.5%, mientras que *Lactococcus lactis* probó ser bastante resistente al someterla al 1% de sales biliares. En general, todas las cepas probióticas fueron relativamente resistentes a esa misma concentración.

7.3.1 Resistencia y supervivencia de las cepas ácido lácticas a la exposición a sales biliares

Las sales biliares representan una importante barrera antibacteriana, siendo posible que afecten el establecimiento de bacterias probióticas, por lo que se considera como requisito para la selección de bacterias probióticas, que resistan y tengan capacidad de crecimiento en contacto con sales biliares. Para el estudio de esta característica se han desarrollado varias investigaciones, utilizando varias concentraciones de bilis, que van desde el 0.1 al 4.0% (Gómez-Zavaglia *et al.*, 1998; Kociubinski *et al.*, 1999).

Los resultados mostraron que la densidad Óptica incrementó 3.1 veces ($P < 0.05$) a las 24 h con una concentración de 0.3 g SB, pero cuando se aumentó la concentración de sales biliares a 1.5 g SB incrementó 2.76 veces la DO a las 24 h. Los componentes principales muestran disminución de 0.097 unidades de DO con la mayor concentración de sales biliares y un incremento de la DO de 3.6 unidades de DO a las 24 h. Este último efecto es debido al crecimiento de las bacterias durante el tiempo, como se muestra en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Promedios de densidad óptica (DO) de las cepas ácido lácticas crecidas bajo dos concentraciones de sales biliares a las 0 h y 24 h.

Item	Tratamientos					Efectos principales					
	0.3g SB		1.5g SB		EEM	0.3g SB	1.5g SB	EEM	0 h	24 h	EEM
	0 h	24 h	0 h	24 h							
DO	0.33	1.02	0.31	0.84	0.03	0.68	0.57	0.02	0.32	0.93	0.02
P>F	0.008		0.008			0.023			0.0001		

SB: Sales biliares, **EEM=** Error estándar de la media

En la prueba de comparación de medias de Tukey, se observó diferencia significativa ($P < 0.0001$), en la supervivencia de las cepas en el T1, las cuales mostraron aumento en el crecimiento después de 24 h de exposición a sales biliares. En el T2 también se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.0001$) con respecto al inoculo inicial. Cuadro 16.

Cuadro 16. Comparación de medias entre tratamientos y tiempos.

Tratamiento	Tiempo	Medias
1	2	1.02 ^a
2	2	0.845 ^b
1	1	0.333 ^c
2	1	0.306 ^c

Tratamiento 1= 0.3 g de sales biliars, **2=** 1.5 g de sales biliars, **Tiempo 1=** 0 h, **2=** 24 h, medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Los resultados presentados en la Figura 12 indican que en la hora cero (inoculo inicial) no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P>0.005$); sin embargo, que a las 24 h hubo incremento significativo ($P<0.005$), de los valores de DO, lo que sugiere que las bacterias ácido lácticas probadas tienen resistencia a condiciones gastrointestinales. Dicha resistencia se encontró dependiente de la concentración de sales en el medio, siendo menor con 1.5 g de sales biliars.

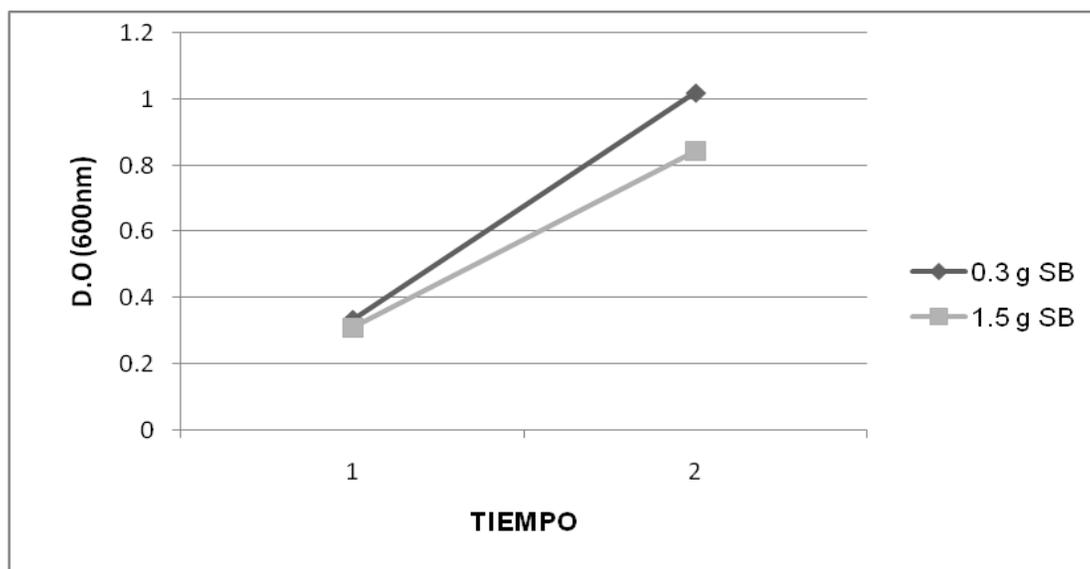


Figura 12. Valores de densidad óptica registrados en caldo MRS adicionado con sales biliars (SB) e inoculado con cepas ácido lácticas. Las lecturas se tomaron al tiempo 0 (1) y a las 24 h (2) de incubación a 37°C.

En el cuadro 17 se muestra el incremento en el crecimiento de cada cepa ácido láctica en presencia de sales biliars (SB). Con excepción de las cepas 13, 17, 18, 19, 21, 26 y

28 todas las cepas mostraron incremento en su crecimientos superior al 100% a 0.3 y 1.5 g de SB. El crecimiento de las cepas 19, 26 y 13, 17, 18, 28 presentaron incremento inferior al 100% a 0.3 y 1.5 g, respectivamente; mientras que, la cepa 21 lo presentó en ambas concentraciones. En general los incrementos en crecimiento más altos se dieron con 0.3 g de sales biliares.

Cuadro 17. Incremento en el crecimiento (DO) de cepas ácido lácticas expuestas a sales biliares (SB) con respecto al inoculo inicial.

Número de cepa	Código de cepa	0 .3g SB (0 -24 h)	1.5g SB (0 -24 h)	Número de cepa	Código de cepa	0 .3g SB (0 -24 h)	1.5g SB (0 -24 h)
		<u>Incremento %</u>				<u>Incremento %</u>	
1	V1/CP	340.3	349.3	15	B3/2-1AB2	308	263
2	V1/ C2 CP	376.9	265.1	16	B4/1-1AB	240	175.6
3	V2/1 R.X	344.9	319.2	17	B1/1-2MB	137.5	40.4
4	V2/2 R.X	260.3	174.3	18	B1/2-2MB	119.4	25.8
5	V2/3 R.X	284.8	191.3	19	B2/1-2MB	61.5	502.0
6	V3/1 R.X	285.2	188.9	20	B2/2-2MB	126.7	175.2
7	V3/2C1R.X	337.1	292.9	21	B2/2-2MB2	83.0	65
8	V3/3 C1 R.X	299.8	262.3	22	B3/1-2MB	166.4	116.3
9	V5/1 R.X	222.4	258.1	23	B3/1-2MB2	163.9	172.8
10	V5/3 C1 R.X	219	159.1	24	B3/2-1MB	170.4	376
11	B1/1-1AB	191	189	25	B3/2-2MB	283.5	288.6
12	B1/2-2AB	253	182	26	B4/1-1MB	77	366.3
13	B2/1-1AB	228.7	48.9	27	B5/1-2MB	165	125
14	B3/1-1AB	146.4	106	28	<i>L. casei</i>	270.8	90.5

Estos resultados permiten inferir que las cepas fueron capaces de resistir las dos concentraciones de sales biliares. Sin embargo, no es posible seleccionar las cepas en base solo a este criterio, si no también por su resistencia al pH presente en el intestino delgado.

En el estudio realizado por Jin *et al.* (1998) se aislaron 12 cepas de lactobacilos de intestino de pollos las cuales fueron resistentes a 0.3% de sales biliares. En la evaluación de resistencia a pH ácido, estos autores reportaron que la supervivencia de cepas de íleon (*L. brevis* I211, *L. fermentum* I24, *L. acidophilus* I16) fue muy baja a pH 2.0 (< 1.0 Log₁₀ UFC/mL) y moderada a pH 3.0. Mientras que las cepas de ciego (*L.*

brevis C1, *L. fermentum* C16) tuvieron un crecimiento moderado a pH 2.0 y bueno a pH 3.0

Por otro lado, Rodríguez (2009) aisló bacterias probióticas de heces de bebés y seleccionó las cepas que fueron capaces de crecer en un pH de 2.0 o 4.0 y que mostraron resistencia y crecimiento en 0.3% de sales biliares, considerándolas como potencialmente probióticas.

Así mismo, Delgado (2005) reportó que los aislamientos de *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. casei*, tuvieron una buena supervivencia con 2% de sales biliares. Este autor menciona que el 30% de los aislamientos crecieron en concentraciones de 1 y 2%, mientras que el resto no mostró crecimiento en 0.25% de sales biliares. La cepa más sensible fue *L. delbrueckii*, ya que sólo una de los ocho aislados creció por encima de un 0.25%.

Rodríguez-Palacios *et al.* (2008) encontraron que el 13.2% (14 /106) y el 39.6% (42 /106) de cepas de *L. plantarum* y *Lactococcus acidilactici* respectivamente crecieron en más del 80% en pH 4.0 y 0.3% de sales biliares. Las BAL mostraron mejor tolerancia a la exposición a sales biliares que a pH 4.0. Lo que coincide con este experimento. Mientras que Guillilan *et al.* (1984) mencionaron que la resistencia a la exposición a sales biliares puede variar entre miembros del género *Lactobacillus*, posiblemente por la habilidad de las cepas a colonizar el intestino de becerras. Estos investigadores, aislaron dos cepas de *L. acidophilus* de becerras, estas exhibieron diferentes grados de resistencia a sales biliares cuando se evaluaron *in vitro*. Al ser suministradas estas cepas a becerras, se detectó que ambas fueron capaces de incrementar el conteo total de lactobacilos en el yeyuno de los animales tratados.

Por otra parte, Charteris *et al.* (1998), Jacobson *et al.* (1999), y Fernández *et al.* (2003), documentaron que algunas cepas pueden sobrevivir bien en una solución de pancreatina a pH 8.0 o en presencia de 0.3% de sales biliares, simulando el ambiente neutro del intestino delgado. Esto fue respaldado por nuevos estudios que demostraron

que la mayoría de las cepas presentan una recuperación potencial de los niveles iniciales durante su paso por el intestino delgado. Así mismo, Chou y Weimer (1999) y Haller *et al.* (2001), señalaron que la resistencia a la exposición prolongada a pH ácido y a altas concentraciones de sales biliares les confiere a las cepas ácido lácticas la capacidad de sobrevivir y colonizar mejor durante el tránsito intestinal, ventajas *In vivo*, que se han observado en algunas BAL. Es importante tomar en cuenta que las características fisiológicas normales del tubo digestivo podrían proveer mejores condiciones a las cepas probióticas, ya que los componentes no ácidos del jugo gástrico y de los alimentos pueden generar un efecto protector sobre las bacterias durante su paso por el estómago (Conway *et al.*, 1987).

7.4 Identificación bioquímica de las cepas mediante el sistema API50CHL y colección de cepas con potencial probiótico

El sistema API[®] es un método que permite la identificación de microorganismos a través del establecimiento de pruebas bioquímicas. Existen en el mercado una variedad de galerías que difieren en el número de sustratos y tipo de pruebas, por lo que su selección está directamente relacionada con la actividad metabólica del género al que pertenece el microorganismo a identificar. Para la identificación de bacterias ácido lácticas se utilizó el sistema API50CHL que consiste en una galería de 50 microtubos con carbohidratos que pueden ser fermentados. Este sistema se usó según las indicaciones del fabricante y se incubaron en condiciones anaerobias durante 48 h. Se identificaron 19 cepas. El Cuadro 16 muestra los resultados a nivel especie.

Cuadro 18. Identificación bioquímica de las cepas ácido lácticas con el Sistema API (API50CHL).

Cepa de mucosa oral	Identificación	Cepa de leche/ calostro	Identificación
B1O/1-1 AB	<i>Leuc. mesenterodes</i>	VI/CP	<i>Lactobacillus</i>
B1O/2-2 AB	<i>Leuc. mesenterodes</i>	V1/C2 CP	<i>L. brevis</i>
B2O/1-1 AB	<i>P. pentosaceus</i>	V2/1 R.X	<i>Lac. lactis</i>
B3O/1-1 AB	<i>L. plantarum</i>	V2/2 R.X	ND
B3O/2-1 AB2	<i>L. plantarum</i>	V2/3R.X	ND
B4O/1-1 AB	ND	V3/1R.X	<i>Leuc. mesenteroides</i>
B1O/1-2MB2	<i>L. salivarius</i>	V3/2 R.X	ND
B1O/2-2MB	ND	V3/3 R.X	ND
B2O/1-2 MB	<i>L. plantarum</i>	V5/1 RX	ND
B2O/2-2MB	<i>Leuc. mesenterodes</i>	V5/3 C2R.X	<i>L. brevis</i>
B2O/2-2MB2	<i>L. crispatus</i>		
B3O/1-2MB	<i>Leuc. mesenterodes</i>		
B3O/1-2MB2	<i>L. brevis</i>		
B3O/2-1MB	<i>L. plantarum</i>		
B3O/2-2 MB	<i>L. brevis</i>		
B4O/1-1 MB	ND		
B5O/1-2MB	<i>Leuc. mesenteroides</i>		

L. = *Lactobacillus*, *Leuc.* = *Leuconostoc*, *P.* = *Pediococcus*, *Lac.* = *Lactococcus*, **ND**= No determinado

Según los resultados obtenidos, se identificaron 8, 2 y 1 especies del género *Lactobacillus* de la mucosa oral, leche y calostro respectivamente. Las otras cepas se identificaron como: *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lactococcus lactis*, las cuales pertenecen al grupo de las BAL, compartiendo características morfológicas y bioquímicas en común con los lactobacilos.

Por un lado, *Leuconostoc* suele tener forma cocoide, presentándose en pares o formando cadenas. Sin embargo, la morfología celular puede variar en función de las condiciones de crecimiento. De este modo, cuando este microorganismo es cultivado en caldo, las células suelen tener forma bacilar y formar largas cadenas pudiéndose confundir con lactobacilos. Las colonias normalmente son pequeñas, con un diámetro inferior a 1 mm, liso, redondo y de un color blanco grisáceo (Sneath *et al.*, 1986).

Las subespecies de *Leuconostoc mesenteroides* más utilizadas como probióticos son *cremoris* y *dextranum* (Collins *et al.*, 1998), comúnmente aisladas de leche y otros productos como el yogurt. Matheiu *et al.* (1993) reportaron que cepas de *Leuc mesenteroides ssp. mesenteroides* FR 52 aisladas de leche produjeron una bacteriocina llamada Mesenterocin 52, la cual fue capaz de inhibir otras cepas de *Leuconostoc* y varias cepas de *Enterococcus* y *Listeria spp.* Es posible que estas cepas pudieran aislarse de la mucosa oral de becerros por su tipo de dieta a base de leche de vaca y esta bacteria pudo colonizar la cavidad bucal de los becerros.

Por otra parte, los miembros el género *Pediococcus pentosaceus* son ácido tolerantes (Haller *et al.*, 2001) e industrialmente importantes debido a su habilidad como cultivo iniciador de ácido láctico, en diversos productos como carnes y queso. Además, se ha incrementado el interés para estudiarse por su característica de producir agentes antimicrobianos (Yongjin *et al.*, 2006). Según Makarova *et al.* (2006) *Pediococcus* es afín a *L. brevis* y *L. plantarum* al comparar sus proteínas ribosomales.

Otra cepa identificada fue *Lactococcus lactis* de la cual se utilizan comúnmente dos subespecies: *lactis* y *cremoris*. *Lactococcus* difiere de otras bacterias ácido lácticas por su tolerancia a pH y temperaturas de crecimiento (Madigan, 2005).

Los carbohidratos fermentados por cada género se presentan en el Cuadro 19.

Cuadro 19. Fermentación de carbohidratos de los géneros identificados, aislados de mucosa oral de becerros, calostro y leche de vacas Holstein.

Carbohidrato	<i>L. crispatus</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
Arabinosa	-	-	d*	+	+	+	-
Celobiosa	+	-	+	-		+	+
Fructuosa	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	≠	+	+	+
Glucosa	+	-	-	+	+	+	+
Gluconato	-	-	+	+		ND	
Lactosa	+	+	+	≠	+	-	-
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	+	+	≠	ND	-	+
Manosa	+	+	+	-	+	+	+
Melibiosa	+	+	+	+	+	-	-
Rafinosa	+	+	+	≠	+	-	-
Ramnosa	-	*	-	-	ND	-	-
Ribosa	-	-	+	+	+	+	+
Salicina	+	*	+	-	ND	+	+
Sorbitol	+	+	+	-	ND	-	-
Sucrosa	+	+	+	d	ND	-	ND
Trealosa	-	+	+	-	+	+	+
Xilosa	-	-	d*	d	ND	+	-
Esculina	+	*	+	d	+	+	+
Amigdalina	+	-	-	+	-	+	+
Arbutina	+	-	-	-	-	+	+
Gentiobiosa	+	-	-	-	-	+	+
Turanosa	-	-	-	+	+	+	ND
Tagatosa	-	-	+	-	-	+	+
Arabitol	-	-	+	+	+	+	ND
Acetil glucasamida	+	+	+	+	+	+	+

+ = reacción positiva por el 90% las cepas o más; d = unas cepas +, otras - (cerca del 89-11% positivas);

(-) = reacción negativa por el 90% las cepas o mas; ≠ = débil, bajo o negativo;

d* = algunas cepas fermentan arabinosa y otras fermentan arabinosa y xilosa * = algunas cepas fermentan esa azúcar otras no. ND= no determinado.

7.4.1 Colección de cepas ácido lácticas

Con base a los resultados obtenidos en la resistencia a pH ácido y a sales biliares se seleccionaron únicamente las cepas con mayor crecimiento, para formar parte de la colección de cepas con potencial probiótico estas se presentan en el Cuadro 20.

Cuadro 20. Cepas probióticas conservadas por su mayor resistencia y viabilidad a condiciones de pH ácido y a sales biliares

Número	Cepa	Género y especie
1	V1/C.P	<i>Lactobacillus</i>
2	V1/C2 C.P	<i>L. brevis</i>
3	V2/1 R.X	<i>Lactococcus lactis</i>
4	V3/1R.X	<i>Leuc. mesenteroides</i>
5	V5/3C2 R.X	<i>L. brevis</i>
6	B1O/1-2MB2	<i>L. salivarius</i>
7	B3O/1-1AB	<i>L. plantarum</i>

L: *Lactobacillus*, *Leuc:* *Leuconostoc*

Como se observa en el Cuadro 20, solo siete cepas cumplieron con el prerrequisito de ser resistentes a condiciones gastrointestinales de las veintisiete probadas. La colección esta formada por: dos cepas de leche (1 y 2), tres de calostro de vacas (3, 4 y 5) y dos cepas (6 y 7) de mucosa oral de becerros lactantes raza Holstein.

VIII. CONCLUSIÓN

En este estudio fue posible el aislamiento e identificación de siete cepas ácido lácticas con potencial probiótico de ganado Holstein, dos de leche (*Lactobacillus* / V1/CP y *Lactobacillus brevis* / V1/C2 CP), tres de calostro (*Lactococcus lactis* / V2/1 R.X, *Leuconostoc mesenteroides* / V3/1R.X, *L. brevis* / V5/3C2 R.X) y dos de mucosa oral (*Lactobacillus salivarius* / B1O/1-2MB2, *Lactobacillus plantarum* / B3O/1-1AB). Todas las cepas aisladas coincidieron positivamente con las características morfológicas y bioquímicas de las bacterias ácido lácticas. Las siete cepas seleccionadas mostraron la mayor resistencia y capacidad de crecimiento a pH 4.0 y a las dos concentraciones de sales biliares (0.3 y 1.5 g). En base a estos resultados se asume que las cepas tienen potencial probiótico, sin embargo, se sugiere: 1) continuar con estudios complementarios, como, actividad antibacteriana y pruebas de adhesión a la mucosa que confirmen su capacidad probiótica; 2) proteger (encapsular) las células para garantizar su viabilidad por el paso en el estómago; y 3) confirmar su identificación mediante pruebas moleculares, como requisito para formar parte de una lista de bacterias probióticas.

IX. LITERATURA CITADA

- Abu-Tarboush, H.M., Al-Saiady, M.Y., Keir El-Din, A.H.1996. Evaluation of diet containing Lactobacilli on performance, fecal coliform, and Lactobacilli of young milk calves. *Anim. Feed Sci.* 57, 39–49.
- Alander, M., Satokari, R., Saxelin, M., Vilpponen- Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., Wrigh, A.V. 1999. Persistence of Colonization of Human Colonic mucosa by a probiotic Strain, *Lactobacillus rhamnosus GG*, after Oral Consumption. *Appl and Environ Microbiol.* 65 (1): 351-354.
- Almanza F y Barrera E.1991. Tecnología de leche y derivados. Bogotá Unisur. 61-66.
- Álvarez L, J., Barajas R, J.A. 1981. Manual de laboratorio para bacteriología y micología veterinaria pp 129 Fac. de Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ávila T, S. 1984. Cría y desarrollo de becerras. p. 279-295. In (ed) Salvador. Producción intensiva de ganado lechero. 1a. ed., México D.F.
- Andoh, A., Fujiyama, Y., 2006. Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease. *World J of Gastroent* 12, 4452–4460.
- Azadnia, P., Zamani, M.H., Shah Ahmad, G., Khalegh Babaki, A., Karimi Jashni, M. and Taarof, N. 2011. Isolation and identification of thermophilic *Lactobacillic* from traditional yoghurts of tribes of Kaserum. *J Anim and Vet Adv.* 10, (6): 774-776.
- Barbosa J, E., Vázquez H., Salcedo R., Bautista M. 2004. Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria.* 14, 3: 32-38.
- Borrueal N. 2003. Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: inmunomodulación. *Gastroenterology Hepatology.* 26, 13-22.
- Booth, I. R.1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.*49, 359–378
- Broadbent, J. R. Larsen, R. L., Deibel, V., Steele, J. L. 2010. Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. *J Bacteriol.* 192, 2445-2458.
- Carr, F. J., Chill, D. and Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev in Microbiol.* 28, 4: 281- 370.
- Carpenter, C. E. and J. R. Broadbent. 2009. External concentration of organic acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods. *J. Food Sci.*74, R12–R15.
- Cebra, J. J., Periwal, S. B., Lee, G., Lee, F., Shroff, K. F.1998. Development and maintenance of the gut- associated lymphoid tissue: the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol.* 6, 13-18.

- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. 1998. Development of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J of Appl Microbiol.* 84, 759–768.
- Chukeatirote, E. 2003. Potential use of probiotics. *Songklanakarinn J. Sc Techn.* 25, 2: 275-282.
- Chou, L. S. and Weimer, B. 1999. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 82, 23–31.
- Chung, H. S., Kim, Y. B., Chun, S. L., & Ji, G. E. 1999. Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *Inter J of Food Microbiol.* 47, 25–32.
- Church, C. D. 1993. *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Ducar, M. P (tr). Edit. Acribia, S.A.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J.P. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait.*, 83, 269-306.
- Collado M. C., Meriluoto J., y Salminen S. 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Appl Microbiol.* 45,454-460.
- Collins, J.K., Thornton, G., Sullivan, G.O. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.*, Amsterdam. 8, 487-490.
- Conway, P.L, Gorbach, S.L, Goldin, B.R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 70, 1-12.
- Corcoran, B.M; Stanton, C; Fitzgerald, G.F; Ross, R.P. 2005. Survival of Probiotic Lactobacilli in Acid Environments is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Appl and Environ Microbiol*, 71, (6): 3060-3067
- Cotter, P. D., and C. Hill. 2003. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*67, 429–453.
- Cummings, J. H. 1997. *The large Intestine in Nutrition and Disease*. Danone Chair Monograph, Instituto Danone, Bruselas.
- Curk, M. C, Hubert, J.C, y Bringel, F.1996. *Lactobacillus paraplantarum* sp. Nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. *Inter. J. of Sist Bacteriol.* 46,595-598.
- Dave, R.I. and Shah, N.P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* 7 (1): 31-41
- Devlieguere, F., Vermeiren, L., y Debevere, J. J. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Rev Int Dairy J.* 14, 273-285

- Delgado P, S. 2005. Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. DS Thesis. Universidad de Oviedo.
- Domínguez-Bello M.G., Blaser M.J. 2008. Do you have a probiotic in your future?. *Microbes Infect.* 10 (9): 1072–1076
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. y Collins, J. K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *American J of Clin Nutr.* 73: 386-392S.
- EC, 2001. Commission of the European Communities, Commission Recommendation, 2001/459/EC. *Official J of European Union L* 161, 42–44.
- EC, 2003a. Commission of the European Communities, Commission Regulation (EC) No. 1831/2003. *Off J of European Union L* 268, 29–43
- EFSA. 2005a. European Food Safety Authority. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA J* 226, 1–12
- Ekinci F and Gurel M. 2007. Effect of using Propionic Acid Bacteria as an Adjunct Culture in yogurt production. *J Dairy Sc.* 91, 892-899.
- Ewaschuk J.B., Naylor J.M., Chirino-Trejo M and Zello G.A. 2004. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Canadian Journal of Veterinary Research* 68: 249–253.
- Ewaschuk J.B., Zello G.A and Naylor J.M. 2006. *Lactobacillus* GG does not affect D-lactic acidosis in diarrheic calves, in a clinical setting. *Journal Veterinary International Medicine* 20: 614–619.
- Falk, P.G. Hooper, L.V., Midtvedt, T., Gordon, J.I. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1157-1170.
- FAO y OMS. 2001. Propiedades saludables y nutricionales de leche en polvo con bacterias vivas ácido lácticas. Consulta de Expertos FAO_OMS <http://www.fao.org/ESN/Probio/probio.htm>.
- FAO and WHO. 2002. Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Report. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
- Felley, C. P., Corthesy-Theulaz, I., Rivero, J.L., Sipponene, P., Kaufmann, B.P., Wiesel, P.H., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, A. L. y Michetti, P. 2001. Favourable effect of acidified milk LC-1 on *Helicobacter gastritis* in man. *European J Gastroenterology and Hepatology.* 13, 1: 25-29.

- Fernández, M. F., Boris, S., & Barbes, C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J of Appl Microbiol.* 94, 449–455.
- Fernández de Palencia P., López P., Corbí A, L., Peláez C., Requena T. 2008. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, *in vitro* adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *Eur Food Res Technol* 227:1475–1484
- Figuroa J., Chi E., Cervantes M., Domínguez A. 2006. Alimentos funcionales para cerdos al destete. *Vet. Méx.* 37, 117-136.
- Flandrois, J.P. 1997. Relation entre bactereries ethotes. *Bacteriologie medicale*, collection Azay-Press Universitaires de Lyon. 45-64.
- Fozo, E. M., Kajfasz J. K., and Quivey R. G. Jr. 2004. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 238,291–295.
- Fonty, G. 2003. Digestive microbial ecology: estructure, diversity and functions of microbial communities and factors affecting their balance and activities. Annual Scientific Exchange 2003-Institute Rosell-Lallemend Nutrition Group.
- Fotiadis, C. I., Stoidis, C.N., Spyropoulos, B.G., Zografos, E.D. 2008. Role of probiotics, prebiotics and symbiotic in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterology* 14 (42): 6453-6457.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R. A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel disease. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13780- 13785.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl Bacteriol* 66,365-378.
- Fuller, R. 1992. Problems and Prospects. In- *Probiotics: the scientific basis*, ed. Fuller, R. Chapman& Hall, London. pp. 377-386.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production .*Intern J of Food Microbiol.* 141, S15–S28.
- Gagnon, M., Kheadr. E. E., Gwenaëlle, L. B y Fliss, I. 2004. *In vitro* inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int J of Food Microbiol.* 92, 69-78.
- Germán, A.J.,Hall, E.J., Day, M. 2001. “Immune cell population with in the duodenal mucosa of dogs with enteropathies”*J of Vet Inter Med* 15, 14-25.
- Gibson, G. R., Moeller, I., Kagelari, O., Folino, M., Young, G. P. 1992. Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells *in vitro*. *J Gastroenterology Hepatology.* 7,165-172.

- Gill, H. S., Rutherford, K. J., Cross, M. L., Gopal, P.K. 2001. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am. J. Clin. Nutr* 74: 833-839.
- Gilliland, S.E, Staley, T.E., and Bush, L.J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67,3045-3051
- Gómez-Zavaglia A., Kociubinski G., Pérez P., De Antoni G. 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. *J Food Prot* 61,865-873.
- Goncalves, G.D., Dos Santos, G.T., Rigolon, L.P., Damasceno, J.C., Ribas, N.P., da Veiga, D.R., Martins, E.N. 2000. The influence of probiotics addition in the diet on the sanitary state and the performance of calves Holstein. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37: 74–78 [in Portuguese].
- Goodson, M., and R. J. Rowbury. 1989. Habituation to normal lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH. *Lett. Appl. Microbiol.* 8, 77–79
- Glupczynski, Y. 1998. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. p. 581-591. Vol. 3, 9th Ed. Arnold, Hodder Headline Group, London, UK.
- Guarner F., Malagelada J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512-519.
- Guerra N., Rua M y Pastrana L. 2001. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *Int J Food Microbiol.* 70, 267-28.
- Hall, H. K., K. L. Karen, and J. W. Foster. 1995. Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Adv. Microb. Physiol.* 37, 229–272.
- Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M.G., Scherenbacher, P., Bode, C. and Hammes, W.P. 2001. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst Appl Microbiol* 24, 218–226.
- Hamilton, I. R., Svensäter, G. 1998. Acid-regulated proteins induced by *Streptococcus mutans* and other oral bacteria during acid shock. *Oral Microbiol. Immunol.* 13, 292–300.
- Hilton, E., Rindos, P. y Isenberg, H.D. 1995. *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *J of Clin Microb.* 33, 1433.
- Hill, M. J. 1997. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev* 6: S43-S45.
- Hooper, L. V., Gordon, J. I. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Sci* 292, 1115-1118.
- Hutkins, R. W. and N. L. Nannen. 1993. pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 76, 2354–236.

- IDF (International Dairy Federation). 1999. Cultured and culture containing dairy products in health. Commission F- Dairy Science Nutrition and Education. Annual Sessions in Athens (Greece), 15–18 September 1999.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2007. Producción Nacional de Leche. (En línea). Disponible en www.infoasercas.gob.mx/claridades/revistas/207/ca207-34. Consultado el 14 de enero 2014.
- Isolauri E., Arvola T., Sutas Y., Moilanen E., Salminen S. 2001. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical & Experimental Allergy* 30, 1604-1610.
- Ishibashi, N., Yamazaki, S. 2001. Probiotic and safety. *Am J Clin Nutr* 73, 465-470.
- Jacobsen, C. N., Roesfeldt Nielsen, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., & Jacobsen, M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* sp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl and Environ Microbiol* 65, 4949–4956.
- Jaramillo G., D., A.P. Meléndez., O.F. Sánchez M. 2010. Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1 (2): 193-209.
- Jin, L. Z., Ho, Y.W., Abdullah, N., Jalaludin, S. 1998. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Appl Microbiol*. 27, 183-185.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 357, 1076-1079.
- Kandler, O y Weiss, N. 1992. Regular, nonsporulating Gram-positive rods. En P. H. A. Sneath, M.S. Mair, M.E. Sharp y J.G. Holt (Editor). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 10th edition, vol. 2. The Williams and Wilkins Co; Baltimore.
- Kashket, E. R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 233–244.
- Kertz, A. F. 2006. El calostro prepara a las beceras para la vida. *Hoard's Dairyman* 276-278.
- Kirjavainen, PV, Gibson, GR. 1999. Healthygut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Ann Med* 31, 288-292.
- Kociubinski G, Pérez P, De Antoni G. 1999. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Food Pro* 62, 905-912.

- Kurt S, S. 1999. Alimentación de los bovinos, 5. UNAM-FMVZ. División del sistema de Universidad Abierta y Educación a Distancia. México D.F. 32-37.
- Lambert, R.J and Stratford M.1999. Weak-acid preservatives: modeling microbial inhibition and response. J. Appl. Microbiol.86, 157–164.
- Lambert, G.P. 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. J of Anim Sci. 87, E101–E108.
- Lee, Y.-K., Nomoto, K., Salminen, S. and Gorbach, S. 1999. Handbook of Probiotics. Ed. Lee, Y.K. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Lilly, D. M., Stillwell, R.H. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147, 747-748.
- Linton, A. H. Microbes, Man and animals.1982. The natural History of Microbial Interaction. John Wiley and Sons, UK.
- Lorca, G. L. and Font de Valdez G. 2009. *Lactobacillus* stress responses, p.115–137. In A. Ljungh, and T. Wadstroöm (ed.), *Lactobacillus* molecular biology: from genomics to probiotics. Calister Academic Press, Norfolk, United Kingdom
- Ly, M. 2008. Retention of aroma compounds by acid lactic bacteria in models food media. Food hydrocolloids. 22, 211-217.
- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R, Cummings, J.H. 1992. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. J Appl Bacteriol 72, 57-64.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1977. Brock Biology of Microorganisms, Prentice-Hall International Limited, London, UK.
- Madigan, M. 2005. Brock Biology of Microorganisms. Martinko J .11th edition.
- Majamaa, H., Isolauri, E. 1997. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. Allergy Clin Immunol. 99,179-185.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goldstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.-H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B. and Mills, D. 2006. "Comparative genomics of the lactic acid bacteria". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (42), 15611-15616.
- Marroki A, Zúñiga M, Kihal M, Pérez- Martínez G. 2011. Characterization of *Lactobacillus* from algerian goat's milk based on phenotypic, 16sr DNA

- sequencing and their technological properties. *Brazilian J of Microbiol* 42,158-171.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huisin't Veld, JH.1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 80, 1031-1037.
- Marteau, P., Seksik, P., Jian, R. 2002. Probiotics and health: new facts and ideas. *Curr Opin Biotechnol* 13: 486-489.
- Martin R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín ML., Olivares M., Bouza J., Fernández L., Xaus J., Rodríguez JM. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Tech* 15, 121-127.
- Mathieu, F., Sudirman S, I., Rekhif, N., Milliere, J, B and Lefebvre G. 1993. Mesenterosin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Mesenteroides FR 52*. *Journal of Applied Microbiology* 74, 372-379.
- Midtvedt T. 1997. Germ- free and conventional animal models for intestinal carbohydrate disposition. *Scand J Gastr Suppl* 222, 25-27.
- Miyazawa, E., Iwabuchi, A., Yoshida, T. 1996. Phytate breakdown and apparent absorption of phosphorous, calcium and magnesium in germ free and conventional rats. *Nutr Res* 16: 603-613.
- Moore, W, E. C., Holdman, L. V. 1974. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese Hawaiians. *Appl Microbiol* 27, 961-979.
- Muñoz R, M, J Altamirano R y Juárez, C.1997. ¿TLC y lácteos: función o experimento? Centro de investigaciones económicas, sociales y tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura mundial (CIESTAAM). Universidad Autónoma de Chapingo. México. 34-38.
- Naidu, A. S., Biblack, W. R., y Clemens, R. A. 1999.Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Crit Rev in Food Sc and Nutr.* 38 (1): 13-126.
- Nobaek, S., Molin, G., Johansson, M.L., Ahrné, S., Jeppsson, B. 2000. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 95, 1231 - 1238.
- Noverr, M. C., Huffnagle, G. B. 2004. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut?.*Trends Microbiol* 12, 562-568.
- O'Hara, A.M., Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgot organ. *EMBO Reports* 7,688–693.
- Ortega R, M., Requejo A, M., López A, M., Navia B. 2002. Repercusión del consumo de probióticos en el estado nutricional. En: Ortega RM, Marcos A, Aranceta J, Mateos JA, Requejo AM, Serra L (eds). *Alimentos Funcionales. Probióticos*. Editorial Médica Panamericana, Madrid. p 77-87.

- Pardio, V. 1998. Los probióticos y su futuro, Archivos Latinoamericanos de nutrición, Vol. 46.
- Parra H, R.A. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 8 (1) 93-105
- Parvez, S., Malik, K., Kang, S., & Kim, H. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J App Microbiol. 100, 1171-1185.
- Pascual M., Garriga M y Morfort J, M. 1996. Los probióticos en la alimentación animal. Eurocarne, 44, 46-53.
- Patterson, J., Burkholder K. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poult Sci. 82: 627-631.
- Pérez M, J. A, Vázquez M, J.R, Rodríguez S, M. C, Miranda M, R. E, Romo G, A.L, Nader G, E. 1987. Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología veterinarias. UNAM. 8:26pp
- Pérez N., Fajardo P., Mendez J., Cachaldora P., Pastrana CL. 2006. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. Anim Feed Sci Technol. 134: 89-107.
- PROY NOM-109-SSA1-1994. Proyecto de Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario oficial de la Federación (revisada el 15 de febrero de 2013).
- Reid, G. 2008. How science will help shape future clinical applications of probiotics. Clin Inf Dis. 46, 62S-66S.
- Riopérez J. 2005. Nutrición y patología digestiva del lechón y del cerdo en crecimiento-cebo. Disponible en <http://www.cuencarural.com>. [Consultado 3 de septiembre de, 2009].
- Roberfroid, M. 2000. Prebiotics And Probiotics: Are They Functional Foods. J.Clin.Nut.71 (6):1682-1687.
- Rodríguez -Palacios, A., Weese, J.S., Duffield, T. and Staempfli H. R. 2004. Effect of oral probiotics on calf diarrhea: clinical trials published between 1973-2003. J Vet Inter Med 18, 395-396.
- Rodríguez-Palacios A., Staempfli, H.R., Duffield T., y Weese J.S. 2008. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. J of Appl Microbiol 106: 393-401.
- Rodríguez G, M. 2009. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. DS Thesis. Universidad Autónoma de Barcelona.

- Rosmini M., Sequeira G., Guerrero I., Martí L., Dalla R., Frizzo L., Bonazza J. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: Importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev Mex Ing Quím.* 3: 181-191.
- Russell, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH; anion accumulation verses uncoupling. *J. Appl. Microbiol.* 73, 363–370
- Salminen, S. 1998. The potencial of *Propionibacterium* ssp. *Int Food Microbiol.* 24, (44):93-106.
- Salminen S., VonWright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos WM., Fondén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S.E., Sandholm T.M. 1998b. Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int J Food Microbiol* 44: 93-106.
- Salminen S., Bouley, C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J.H., Franck A., Gibson, G.R., Isolauri E., Moreau M.C, Roberfroid M., Rowland I. 1998c. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80 (Suppl 1): S147-S171.
- Sanders, M.E., Huisin't Veld, J. 1999. Bringing a probiotic- containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 293-315.
- Sandine, W.E., Muralidhara, K.S. Elliker, P.R. y England, D.C. 1972. Lactic acid bacteria in food and health: a review with special reference to enteropathogenic *Escherichia coli* as well as certain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. *J. Milk Food Technol.* 35, 691-702.
- SAGARPA. 2010. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2010. *Claridades agropecuarias.* 207:34-43
- Savadogo, A. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview. *African J of Biotech.* 5, 678-683.
- Scheppach, W., Bartram, H.P., Richter, F. 1995. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 31A, 1077-1080.
- Slomiany, B.L., Sarosiek, Y., y Slomiany, A. 1987. Gastric mucus the mucosal barrier. *Digestive Disease and Science* 5, 125-145.
- Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. y Holt, J. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Sturr, M. G., and R. E. Marquis. 1992. Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2287–2291.
- Shu, Q., Gill, H.S. 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20TM) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 34, 59–64.

- Sorum, H., Sunde, M. 2001. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet. Res.* 32, 227–241.
- Soto, L.P., Frizzo, L.S., Avataneo, E., Zbrun, M.V., Bertozzi, E., Sequeira, G., Signorini, M.L., Rosmini, M.R. 2011. Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165,176- 183
- Suvarna V.C., Boby V.U. 2005. Probiotics in human health: a current assessment. *Current Science.* 88, (11): 1744-1748.
- Tahri, K., Crociani, J., Ballongue, J., Schneider, F. 1995. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Lett Appl Microbiol* 21, 149-151.
- Tejeda-Simón, M. V., Lee, J. H., Ustunol, Z., Pestka, J. J. 1999. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J Dairy Sci* 82, 649-660.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. 1989. *Microbiology: An introduction*, Benjamin/Cummings. Pub-lishing Company Inc. Redwood City, CA, USA.
- Underdown, B. 1986. Inmunoglobulin A. *Ann Rev Inmunol.* 4,389-417.
- van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. D. Ehrlich, and E. Maguin. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82,187–216
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36, 895–904.
- Vitiñi E., Álvarez S., Medina M., Medici M., de Budeguer M. y Perdigón G. 2000. Gut mucosal immuno stimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 24, 223-232.
- Wallace, R. 1992. Rumen microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: the application of research findings to a complex microbial ecosystem. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 529.
- Wannaprasat, W., Koowatananukul, C., Ekkapobytin, C., Chuanchuen, R., 2009. Quality analysis of commercial probiotic products for food animals. *Southeast Asian J. of Tropical Med. and Pub. Health* 40, 1103–1112.
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiol.* 17,205–215.
- Yoon, I.K. y Stern, M.D. 1995. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants: a review. *Asian–Austral J Anim Sci* 8,533–555.

- Yongjin, H., Wenshui, X., and Changrong G. 2006. "Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages". *World J Microbiol Biotechnol.* p. 1-11.
- Zimmermann, B., Bauer, E., Mosenthin, R. 2001. Pro and prebiotics in pig nutrition potential modulators of gut health? *J Anim Feed Sci* 10, 47–56.