


Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico para becerros del altiplano mexicano



Patricia Landa-Salgado^a

Yesenia Caballero-Cervantes^a

Efrén Ramírez-Bribiesca^{a*}

Ana María Hernández-Anguiano^a

Luz Mariana Ramírez-Hernández^b

David Espinosa-Victoria^a

David Hernández-Sánchez^a

^a Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México Texcoco. Montecillo Estado de México. CP 56230.

^b Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Medicina.

*Autor de correspondencia: efrenrb@colpos.mx

Resumen:

Los becerros neonatos son expuestos continuamente a un amplio rango de microorganismos habitantes del ambiente, y a patógenos causantes de diarrea. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias ácido lácticas (BAL) de la mucosa oral de becerros, calostro y leche de vacas Holstein. El aislamiento de BAL se realizó en caldo y placas con medio ManRogosa Sharp (MRS). Una vez purificadas las colonias bacterianas, se realizaron pruebas morfológicas y bioquímicas para la caracterización de BAL. Se aislaron 16 colonias bacterianas, de las cuales se clasificaron en 12 de la mucosa oral, 2 en leche y 2 en calostro.

Estas colonias se evaluaron a pH ácido (4.0 y 4.5) y sales biliares (SB: 0.3 y 1.5 g). Posteriormente se identificaron con el Sistema API50CHL. Las especies aisladas con resistencia a pH de 4 y 1.5 de SB fueron: *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactococcus lactis*. Estas colonias cuentan con un potencial probiótico para ser usadas en becerros.

Palabras clave: Becerras, Probióticos, Aislamiento, Resistencia.

Recibido: 01/06/2017

Aceptado: 27/02/2018

Introducción

La cría de becerras para reemplazo presenta algunos problemas, como el mal suministro de calostro, alimentación con sustitutos de leche de baja calidad y cambios repentinos en la ración⁽¹⁾. Estas malas prácticas provocan diarreas ocasionadas principalmente por enteropatógenos, provocando tasa de mortalidad en más de 10 %, durante las primeras semanas de vida⁽²⁾. Para reducir la mortalidad se recurre al uso de antibióticos, pero la resistencia a las cepas patógenas afecta negativamente la salud de los animales^(3,4). En consecuencia, diferentes laboratorios veterinarios promueven el uso de probióticos hechos de bacterias ácido lácticas (BAL), prometiendo beneficios en la prevención y disminución de diarreas, con mejora en la ganancia de peso. Sin embargo, los productos deben de cumplir con requisitos idóneos para ser probióticos eficientes. Por ejemplo, el número mínimo de microorganismos que se requiere en el intestino del becerro para generar una adecuada salud, es de 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC) /ml⁽¹⁾.

Los ensayos clínicos realizados en la década pasada, demostraron que el 45 % de probióticos comercializados, tienen nula eficiencia de las BAL en la prevención de diarreas en becerras, e incluso parece que estos en lugar de favorecer, incrementaron la incidencia y severidad de diarreas^(4,5), y no hay respuesta para mejorar la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia^(6,7). En la actualidad estos mismos parámetros son similares por los laboratorios que comercializan probióticos en las unidades de producción ganadera lechera. Las cepas usadas tienen baja viabilidad de microorganismos probióticos presentes en los productos comerciales; además se han encontrado especies de bacterias diferentes a las citadas en las etiquetas⁽⁸⁾. En cuanto a su origen, las bacterias probióticas provienen de diferentes regiones

geográficas e incluso de otras especies animales, lo que ocasiona baja viabilidad y actividad probiótica⁽⁴⁾. El objetivo del estudio se enfocó en el aislamiento y la identificación de bacterias con potencial probiótico (resistencia a pH ácido y sales biliares (SB)) en ganado Holstein de la región del altiplano de México.

Material y métodos

Aislamiento de bacterias de mucosa oral y de calostro

Se utilizaron cinco becerros lactantes de 30 días de edad y cinco vacas adultas de segundo parto en lactancia, raza Holstein Friesian del rancho del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. También se tomaron muestras de calostro de cinco vacas Holstein recién paridas del Rancho privado Xalapango. Ambos sitios están ubicados en el valle de Texcoco, Estado de México, entre los paralelos 18° 21' y 20° 17' N y 98° 36' y 100° 36' O⁽⁹⁾.

Toma de muestras

Mucosa oral: se tomaron muestras duplicadas de exudado de la mucosa oral por becerro lactante, frotando por 3 seg el hisopo (3MTMSwab-Sampler), previo a la ingesta de alimento matutino. Cada hisopo se colocó dentro de un tubo estéril con 10 ml de agua peptonada buferada (RS96010BPW).

Calostro y leche: antes del muestreo se realizó la limpieza, desinfección y despunte de los pezones y se colectaron 5 ml de calostro y 10 ml de leche por grupo de vacas asignadas. Las muestras se depositaron en frascos estériles manteniéndose a 4 °C y trasladándose inmediatamente al laboratorio para su análisis, según lo descrito por la Norma Mexicana⁽¹⁰⁾.

Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron pre-enriquecidas (para favorecer el crecimiento de las BAL) en medio de cultivo líquido⁽¹¹⁾. Se tomó por duplicado 1 ml de la suspensión bacteriana de mucosa oral y se depositó en tubos con 5 ml de caldo mann rogosa sharp (MRS). Los tubos inoculados se dividieron en dos grupos aleatorios. El primero se mantuvo en condiciones aerobias y el segundo en condiciones anaerobias, ambos a 37 °C por 18 h. En el caso de las muestras de calostro y leche, se tomaron 200 µl por duplicado y también se depositaron en tubos con 5 ml de caldo MRS. Los tubos inoculados se mantuvieron en un desecador con ambiente anaerobio (inducido con una vela encendida) por 18 h a 37 °C. Al final del tiempo, a cada tubo se le extrajo una muestra con la asa bacteriológica y se sembraron en cajas Petri con medio sólido MRS⁽¹²⁾, incubando a 37 °C por 48 h, en condiciones anaerobias y aerobias. Como grupos testigo positivos y negativos, se incluyeron una cepa de *Lactobacillus casei* ATCC y una de *E.coli* O42, donadas por la Universidad Autónoma de Querétaro.

Selección de las bacterias

Los cultivos fueron seriados en el proceso de sembrado, por las duplicaciones en el medio solido MRS, se acumularon 54 colonias con características de BAL, de acuerdo al tamaño, forma, superficie, elevación, borde y color⁽¹³⁾. La caracterización de las cepas se realizó con las pruebas de tinción de Gram, morfología celular, tinción de esporas y la prueba de catalasa⁽¹²⁾. Adicionalmente, se efectuaron las pruebas de producción de indol y de motilidad, en medio de cultivo SIM (sulfhídrico, indol, motilidad), hidrólisis de la gelatina y reducción de nitratos⁽¹⁴⁾. Se realizó una segunda selección de las colonias aisladas, considerando los mejores puntajes y la morfología idónea de cocobacilos y bacilos. Entre éstas, se identificaron 27 colonias, las cuales se reprodujeron en 5 ml de caldo MRS por 18 h, para su evaluación como bacterias probióticas. De cada suspensión bacteriana obtenida se tomaron 800 µl por duplicado y se transfirieron a tubos Eppendorf con 800 µl de glicerol estéril al 50% como crioprotector, conservándose a -20 °C por 3 h y posteriormente a -80 °C por tiempo indefinido.

Determinación de la resistencia y supervivencia de las cepas seleccionadas a condiciones gastrointestinales

Resistencia a pH ácido

Preparación de inóculo: de las 27 colonias obtenidas, se hizo nueva selección. Se escogieron 16 de ellas por seguir manteniendo una morfología bien definida de cocobacilos y bacilos. El cepario final quedó integrado con 12 aislamientos de la mucosa oral, 2 de leche y 2 de calostro. Todas las colonias seleccionadas se reactivaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y temperatura ambiente; luego se transfirió cada muestra en tubos con 5 ml de caldo MRS. Posteriormente se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones anaerobias por 24 h y nuevamente 1 ml de cada suspensión bacteriana ($10^6\text{ Log}_{10}\text{ UFC/ml}$) se adicionó en tubos con 9 ml de caldo MRS, incubándose por 18 h. La suspensión bacteriana obtenida se centrifugó a $2,056\text{ xg}$ por 10 min; el paquete celular se resuspendió en 10 ml de leche semidescremada (Alpura® 2000®) esterilizada ($110\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min) para realizar la prueba de resistencia a pH 4.5 y 4.0. La leche se utilizó como medio protector y como vehículo de los microorganismos probióticos⁽¹⁵⁾, siguiendo el protocolo descrito por Fernández de Palencia *et al*⁽¹⁶⁾. La resistencia a condiciones de pH ácido se evaluó con la disminución con las células bacterianas. La reducción de pH se hizo con alícuotas controladas de HCl al IN. Cuando el pH se estabilizó a 4.5 y 4.0, las muestras se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Posteriormente se tomó 1 ml de cada suspensión para hacer diluciones seriadas, y de cada dilución se tomaron 100 μl , sembrándose en agar MRS, para estimar la viabilidad de las células bacterianas. Las colonias evaluadas a pH de 4.5 y 4.0, se sembraron a diluciones 10^{-6} y 10^{-7} en una suspensión de leche.

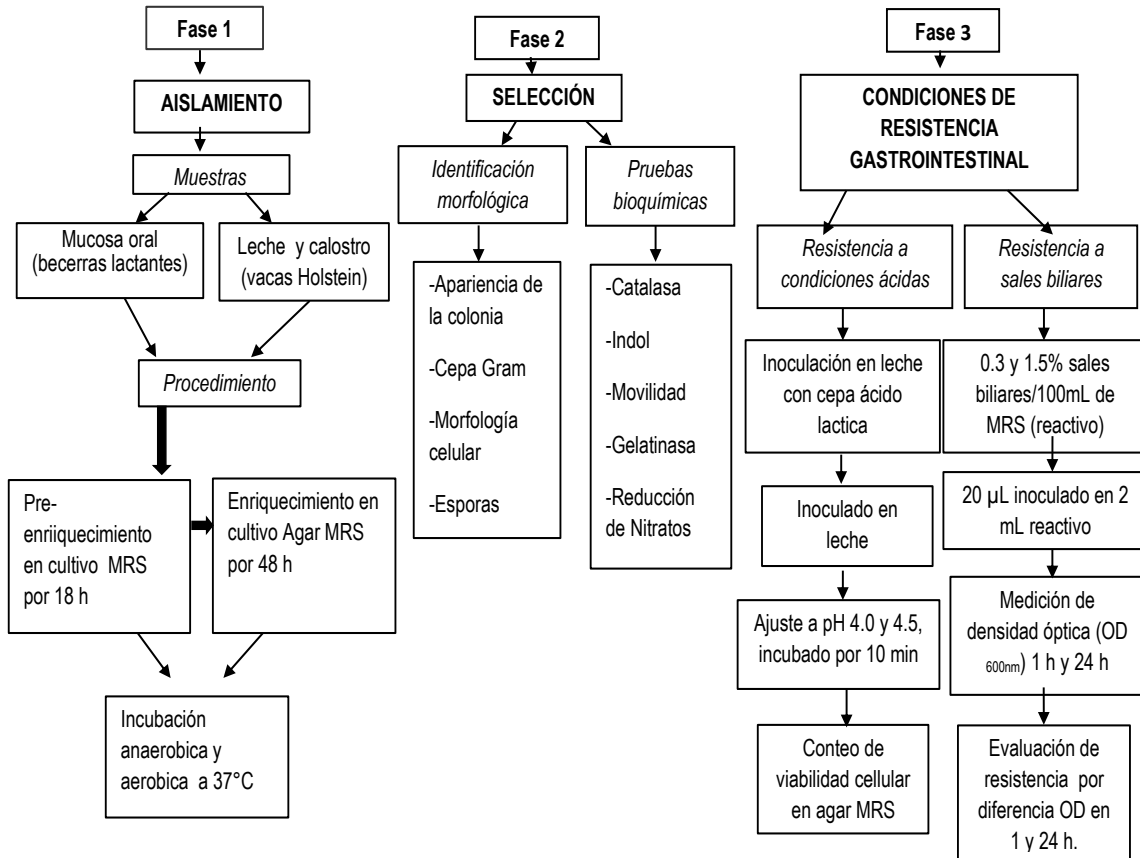
Resistencia a la exposición de sales biliares en placas de microtitulación

Las colonias seleccionadas se expusieron a SB en placas de microtitulación (BD Primaria™) con capacidad de 3.5 ml por pozo. Se utilizó una placa por cada concentración y previo al establecimiento de la prueba, se prepararon dos matraces con 100 ml caldo MRS; uno con

0.3 g y otro con 1.5 g de SB de bovino (Oxgall Difco™)^(17,18). En la prueba se incluyeron dos testigos negativos: solución MRS-con SB sin bacteria y un MRS-sin SB con bacteria. La prueba se estableció por triplicado y cada colonia ocupó seis pozos de la placa. Adicionalmente, se depositaron 2 ml de solución (MRS-con SB sin bacteria) y 20 µl (1:10 v/v) de suspensión bacteriana por 18 h de crecimiento. Después de 1 h de inoculación y previo a la incubación de las placas, se midió la densidad óptica (DO) de cada suspensión a 600 nm con un espectrofotómetro (GENESYS 10 UV/ Thermo Spectronic). Posteriormente, las placas con los tratamientos se incubaron a 37 °C en condiciones anaerobias, a las 24 h se registró nuevamente la lectura de la DO.

Identificación bioquímica y colección de cepas con potencial probiótico

Las colonias con características de BAL se identificaron con el sistema APICHL (System; BioMerieux SA, France). En el procedimiento, se reactivaron las colonias en 5 ml de caldo MRS en condiciones anaerobias a 37 °C por 18 h, adicionando el diluyente 50CH (suministrado con la galería: API50CH), de acuerdo a las indicaciones del producto. La suspensión preparada se usó para llenar 50 microtubos de la galería; las cúpulas de estos microtubos se llenaron con aceite mineral estéril, para generar condiciones anaerobias. Las galerías inoculadas (una por colonia) se mantuvieron a 37 °C por 48 h para establecer el perfil bioquímico de cada colonia. La interpretación de los resultados se hizo 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 registrados se analizaron con el sistema computarizado Apiweb®. La Figura 1, resume en tres fases las secuencias metodológicas que se realizaron para identificar y asilar las BAL con potencial probiótico.

Figura 1: Diagrama de aislamiento y selección de bacterias probióticas

Análisis estadístico

Los datos que fueron analizados con pruebas estadísticas inicialmente, presentaron una distribución normal (Prueba de Kolmogorov–Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Posteriormente se realizó el análisis de varianza y la prueba de Tukey para la comparación de medias. Se utilizó un nivel mínimo de significancia de 0.5%, utilizando el paquete estadístico SPSS Ver. 15⁽¹⁹⁾.

Resultados y discusión

Aislamiento y crecimiento de colonias

Las colonias seleccionadas en el medio anaerobio tuvieron mejor crecimiento que las cultivadas en condiciones aerobias. Las colonias por la morfología seleccionada fueron cocobacilos y bacilos, gram positivas, sin presencia de esporas, catalasa negativa, sin motilidad, sin producción de indol, gelatinasa y negativas a la reducción de nitratos.

Las muestras de la mucosa oral tuvieron un tamaño promedio de 2 a 4 mm de diámetro con características morfológicas homogéneas de forma circular, elevación convexa, borde entero, superficie lisa y color blanco sin pigmentos. Del total de las muestras de leche, solo el 20 % tuvo crecimiento de colonias bacterianas, el tamaño promedio fue de 2.5 mm de diámetro. Mientras las colonias aisladas de calostro presentaron un color beige y tamaño variable de entre 1 y 5 mm de diámetro. Generalmente, las bacterias probióticas se han aislado de las mucosas oral, vaginal e intestinal de becerros sanos y en muestras de leche^(11,20). En este estudio, las colonias de la mucosa oral y de leche, tuvieron la capacidad de los lactobacilos para adaptarse y sobrevivir⁽¹³⁾, debido a la presencia del grupo hemina, que les permite activar la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones⁽²¹⁾. Los diferentes géneros de las BAL comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas como la forma, elevación, margen, color y reacciones bioquímicas⁽¹³⁾. Sus características morfológicas celulares y pruebas bioquímicas han sido reportadas como básicas, para la selección de cepas probióticas^(5,22), y se recomienda complementarlo con estudios moleculares⁽²³⁾.

Viabilidad de las cepas seleccionadas con base en su resistencia a pH ácido

El Cuadro 1 muestra las poblaciones de las colonias evaluadas a diferentes pH. El crecimiento con el pH testigo de 6.5, promedió 9.07 Log₁₀ UFC/ml. Mientras que a pH 4.0, el crecimiento disminuyó ($P < 0.001$) a 5.09 Log₁₀ UFC/ml. Las colonias que no crecieron con un pH de 4 fueron eliminadas y no se incluyeron en el cepario final; éstas fueron las dos colonias de leche. Específicamente las bacterias probióticas para poder llegar al sitio de acción y mantenerse viables, deben ser capaces de resistir el pH ácido y la presencia de SB en el duodeno⁽²⁴⁾. Varios autores^(7,25) han desarrollado metodologías para evaluar la resistencia de cepas probióticas en condiciones gástricas. Por ejemplo, *L. plantarum* y *L. acidophilus*, crecieron y fueron viables a pH 5.0, mientras que a pH 4.0 y 3.0 se detuvieron estas actividades⁽¹⁶⁾; lo que coincide con la información obtenida en este estudio a un pH de 4.0. Esta sensibilidad de las cepas, puede estar relacionado con la respuesta ácido tolerante o resistencia adquirida. Broadbent *et al*⁽²⁶⁾ compararon células de *L. casei* crecidas a pH 6.0 (testigo) contra grupos de células adaptadas pH 4.5 por 10 min y células adaptadas a pH 4.5 por 20 min, presentando disminución de viabilidad de hasta 4.0 Log₁₀ y de 0.7 a 2.4 Log₁₀ UFC/ml en 10 y 20 min de adaptación, respectivamente. Los autores mencionan que la adaptación de las células al ácido provocó cambios en la composición de lípidos de la membrana, mostrando un dramático incremento de ácidos grasos saturados e insaturados, así como la fermentación maloláctica y acumulación intracelular de histidina. Por otro lado, otros autores^(27,28,29) reportan habilidades de las bacterias probióticas para sobrevivir a la digestión acida del estómago; ésta es variable y depende de cada cepa, lo que explica las diferencias en resistencia, como ocurrió en el estudio a pH 4.0. Comúnmente, los lactobacilos tienen mejor crecimiento a pH 4.0 vs pH 3.0⁽³⁰⁾. Pocas colonias llegan a resistir el pH 3, comúnmente 4 de 200 cepas BAL sobreviven⁽³¹⁾.

Cuadro 1: Conteo de colonias recobradas en agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS) inmediatamente después de la exposición a pH ácido y su identificación bioquímica

Número de cepas	T1 pH 6.5	T2 pH 4.5	T3 pH 4.0	Identificación bioquímica de cepas ácido lácticas con sistema API (API 50CHL)
~	9.40	9.21	5.74	
Mucosa				
1	8.77	8.40	5.08	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
2	9.46	8.43	5.49	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
3	9.02	9.36	5.09	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
4	9.06	7.23	4.83	<i>Lactobacillus plantarum</i>
5	8.28	7.67	5.06	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6	8.78	8.47	4.01	<i>Lactobacillus salivarius</i>
7	8.71	8.49	6.43	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
8	9.36	8.39	6.47	<i>Lactobacillus crispatus</i>
9	9.39	9.11	5.44	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
10	9.37	8.68	NG	<i>Lactobacillus brevis</i>
11	9.36	8.84	NG	<i>Lactobacillus brevis</i>
12	8.82	8.48	3.33	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Leche				
13	9.02	8.14	NG	<i>Lactobacillus brevis</i>
14	9.15	8.31	NG	<i>Lactobacillus brevis</i>
Calostro				
15	9.32	9.14	5.34	<i>Lactococcus lactis</i>
16	9.32	8.95	4.52	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Media	9.07±0.33 ^a	8.50±0.54 ^b	5.09±0.89 ^c	

Treatment, ~ correspond to positive control strain *L. casei*. Data are mean values of three replicates and correspond to Log₁₀ CFU/mL NG: No growth.

a,b Different letters in the mean value ± Std. deviation, indicate significant differences $P < 0.03$.

Por otro lado, la resistencia y crecimiento a la exposición de SB se ha realizado con concentraciones desde 0.1 hasta 4.0 %^(32,33). En el presente estudio, las BAL continuaron creciendo a altas concentraciones de SB (1.5 g), siendo un parámetro importante para los microorganismos que componen los productos comerciales^(34,35), sin embargo no es comúnmente considerado. En un estudio similar⁽³⁶⁾ se evaluó la resistencia de *L. plantarum* a la exposición de varias concentraciones de SB de origen porcino (0.01, 0.05, 0.10 y 0.15 g); el crecimiento de la cepa fue monitoreado por 24 h con mediciones de DO, y la mayor

tasa de crecimiento se dio con la menor concentración de SB. De este modo, la densidad final alcanzada por esta cepa con 0.10 g SB fue tres veces más baja con respecto al testigo. Mientras que, en este estudio, las colonias tuvieron una DO final de 2.5 veces más baja, con una concentración de 0.3 g, a diferencia del grupo testigo. La resistencia a SB de bacterias productoras de ácido láctico (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* y *Lactococcus lactis*) y bacterias probióticas (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium*) se ha reportado con dosis mayores de 0.3 a 1% de SB^(37,38). *S. thermophilus* fue la cepa más sensible a la concentración de 0.5 g SB y *Lactococcus lactis* fue resistente con 1 g de SB. Todas las cepas probióticas mostraron resistencia a 1.5 g SB, aunque la resistencia a la exposición de SB puede diferir entre los miembros del género *Lactobacillus*, debido a la habilidad de algunas cepas para colonizar y estabilizarse rápidamente en el intestino de las becerras⁽⁷⁾. Estudios *in vivo*, administrando *L. acidophilus* a becerras, fueron capaces de incrementar el número total de lactobacilos en el yeyuno de los animales de 13 a 39 % y por otro lado, cepas de *L. plantarum* y *Lactococcus acidilactici* presentaron mejor crecimiento con condiciones de pH 4.0 y 0.3g de SB⁽⁵⁾. En este estudio, las BAL mostraron mejor tolerancia a la exposición de SB que a pH 4.0; principalmente la resistencia a la exposición prolongada al pH ácido y a altas concentraciones de SB de las BAL seleccionadas, pueden ser buenos parámetros en capacidad de sobrevivencia y colonización durante el tránsito intestinal^(28,39).

Identificación bioquímica de las cepas con el sistema API50CHL y viabilidad a la exposición con sales biliares

El Cuadro 1 también muestra los resultados obtenidos en la identificación de las colonias con base al perfil de fermentación de carbohidratos (API50CHL-BioMerieux). Los resultados tuvieron un intervalo de 96 y 99 % de efectividad. De las colonias aisladas de la mucosa oral, 6 se identificaron como *Lactobacillus*, 5 como *Leuconostoc* y 1 como *Pediococcus*. Las muestras de calostro fueron *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.

El promedio de la DO obtenida en cada una de las cepas evaluadas, incrementó 3.1 veces ($P<0.05$), después de 24 h de incubación, con la concentración de 0.3 g SB, respecto a la primera lectura. Por otra parte, cuando se aumentó la concentración de SB a 1.5 g, la DO incrementó 2.7 veces a las 24 h. Los efectos principales muestran disminución ($P<0.023$) de OD con el mayor valor de SB e incrementó ($P<0.0001$) la OD desde 1 a 24 h (Cuadro 2). Algunos estudios que han evaluado el beneficio de las bacterias probióticas en becerras

reportan datos contradictorios, tal vez por la falta de diversidad en los probióticos por regiones geográficas y por comercializar cepas poco viables. Por tal motivo, es difícil encontrar secuencias de experimentos con una misma cepa⁽⁴⁰⁾. En América Latina la comercialización de productos probióticos para becerras es limitada y dudosa; la mayoría de las empresas solo cuentan con cepas de *L. acidophilus* cepa KA1-A 8 con 3,000 billones de UFC/dosis y con *L. casei* con 3,000 millones de UFC/dosis, sin especificación para su uso en becerras. Otras empresas promueven productos con *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* con 1×10^{11} UFC por unidad dosis o con 50 unidades para la aplicación directa en 1,000 L de leche; pero en el producto no se especifica el origen de las cepas, quizás son obtenidas de otras especies animales o alimentos, por lo que no se consideran buenas opciones. Por ejemplo, cuando se administra cepas probióticas de humanos al ganado, estos microorganismos no tienen una colonización duradera en el intestino, debido a las diferencias fisiológicas y alimentarias entre las especies^(41,42); razón por la cual en este estudio se realizó el aislamiento de colonias con potencial probiótico de una región ganadera de bovinos Holstein. Actualmente, para el ganado los géneros de bacterias probióticas más utilizadas, son *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*⁽⁴³⁾, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. salivarius* y *Lactococcus lactis*^(5,44,45), *L. fermentum* VC3B-08, *W. hellinica* V1V-30 and *L. farciminis* B4F-06⁽²⁰⁾.

Tabla 2: Promedios de densidad óptica (DO) en el crecimiento de cepas ácido lácticas con dos concentraciones de sales biliares (SB,%) por 1 y 24 horas

I	Tratamiento					Efectos principales					
	0.3% SB		1.5% SB		EEM	0.3% SB	1.5% SB	EEM	1h	24h	EEM
	1h	24h	1h	24h							
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		

EEM= Error estándar de la media.

Conclusiones e implicaciones

Se seleccionaron 16 colonias BAL de ganado Holstein. *Lactobacillus brevis* aislado en muestras de la mucosa oral y leche, no creció en pH ácido (4.0). Las colonias seleccionadas

fueron *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactococcus lactis*. Por las características evaluadas, se asume que las colonias identificadas, cuentan ampliamente con un potencial probiótico para ser evaluadas directamente en el tracto gastrointestinal de becerros.

Literatura citada:

1. Soto LP, Frizzo LS, Avataneo E, Zbrun MV, Bertozzi E, Sequeira G, Signorini ML, Rosmini MR. Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Anim Feed Sci Technol* 2011;(165):176-183.
2. Shu Q, Gill HS. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20TM) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;(34):59–64.
3. Frizzo LS, Zbrun MV, Soto LP, Signorini ML. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Anim Feed Sci Technol* 2011;(169):147–156.
4. Rosmini MR, Sequeira GJ, Guerrero I, Marti LE, Dalla R, Frizzo L, Bonazza JC. Producción de prebióticos para animales de abasto: Importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev Mex Ing Quim* 2004;(3):181-191.
5. Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. *J Appl Microbiol* 2008;(106):393-401.
6. Seifzadeh S, Aghjehgheshlagh FM, Abdibenemar H, Seifdavati J, Navidshad B. The effects of a medical plant mix and probiotic on performance and health status of suckling Holstein calves. *Italian J Anim Sci* 2017;(16):44-51.
7. He ZX, Ferlisi B, Eckert E, Brown HE, Aguilar A, Steele MA. Supplementing a yeast probiotic to pre-weaning Holstein calves: feed intake, growth and fecal biomarkers of gut health. *Anim Feed Sci Technol* 2017;(226):81-87.
8. Wannaprasat W, Koowatananukul C, Ekkapobyotin C, Chuanchuen R. Quality analysis of commercial probiotic products for food animals. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2009;(40):1103–1112.
9. Municipio de Texcoco. https://es.wikipedia.org/wiki/Municipio_de_Texcoco.

10. 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. 1994. Diario Oficial de la Federación. 1994.
11. Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vemoux JP. Isolation, characterisation and identification of *Lactobacilli* focusing mainly on cheeses and other dairy products. Dairy Sci Technol Le Lait 2003;(83):269-306.
12. Pérez MJ, Vázquez JR, Rodríguez MC, Miranda RE, Romo AL, Nader GE. Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología veterinarias. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF. 1987.
13. Kandler O, Weiss N. nonsporing Gram positive rods. Bergey's Manual of systematic bacteriology. 10th ed (ed. Sneath, Mair, Sharp and Holt), Baltimore, USA: The Williams and Wilkins Co; 1992.
14. Haro M, Ruiz V, Guerra F. Manual para la identificación de microorganismos de interés veterinario. México: Trillas; 2012.
15. Bove P, Gallone A, Russo P, Capozzi V, Albenzio M, Spano G, Fiocco D. Probiotic features of *Lactobacillus plantarum* mutant strains. Appl Microbiol Biotechnol 2012;(96):431-441.
16. Fernández de Palencia P, López P, Corbí AL, Peláez C, Requena T. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, *in vitro* adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. Eur Food Res Technol 2008;(227):1475–1484.
17. Pereira DI, McCartney AL, Gibson GR. An *in vitro* study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of Its cholesterol-lowering properties. Appl Environ Microbiol 2003;(8):4743-4752.
18. Tinrat D, Saraya S, Chomnawang MT. Isolation and characterization of *Lactobacillus salivarius* MTC 1026 as a potential probiotic. J Gen Appl Microbiol 2011;(57):365-378.
19. SPSS® Version 15 software (SPSS Inc., Chicago, IL). Copyright © 2006 de SPSS Inc.
20. Sandes S, Alvim L, Silva B, Acurcio L, Santos C, Campos M, Santos C, Nicoli J, Neumann E, Nunes A. Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: Looking for immunobiotics through *in vitro* and *in vivo* approaches for immunoprophylaxis applications. Microbiol Res 2017;(200):1-13.
21. Ekinçi F, Gurel M. Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. J Dairy Sci 2007;(91):892-899.

22. Jaramillo GD, Meléndez AP, Sánchez MO. Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de *Lactobacillus* y Bifidobacterias. Rev Venez Cienc Tecnol Aliment 2010;(1):193-209.
23. Marroki A, Zúñiga M, Kihal M, Pérez- Martínez G. Characterization of lactobacillus from algerian goat's milk based on phenotypic, 16sr DNA sequencing and their technological properties. Brazilian J Microbiol 2011;(42):158-171.
24. Salminen S, Von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, *et al.* Demonstration of safety of probiotics-a review. Int J Food Microbiol 1998;(44):93-106.
25. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am J Clin Nutr 2001;(73):386-392S.
26. Broadbent JR, Larsen RL, Deibel V, Steele JL. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. J Bacteriol 2010;(192):2445-2458.
27. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Development and application of an *in vivo* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol 1998;(84):759-76.
28. Chou LS, Weimer B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. J Dairy Sci 1999;(82):23-31.
29. Xanthopoulos V, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. Food Microbiol 2000;(17):205-215.
30. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. Lett Appl Microbiol 1998;(27):183-185.
31. Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. Int Dairy J 1998;(8):993-1002.
32. Gómez-Zavaglia A, Kociubinski G, Perez P, De Antoni G. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. J Food Prot 1998;(61):865-873.
33. Kociubinski G, Pérez P., De Antoni G. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. J Food Pro 1999;(62):905-912.
34. Carr F, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. Crit Rev Microbiol 2002;(28):281-370.

35. Foditsch C, Pereira RVV, Ganda EK, Gómez MS, Marques EC, Santin T, Bicalho RC. Oral Administration of *Faecalibacterium prausnitzii* decreased the incidence of severe diarrhea and related mortality rate and increased weight gain in preweaned dairy heifers. PLOS ONE 2015;(10):e0145485.
36. Bron PA, Grangette C, Mercenier A, de Vos WM, Kleerebesem M. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. J Bacteriol 2014;(186):5721-5729.
37. Naidu AS, Biblack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. Critical Rev Food Sci Nutrition 1999;(38):13-126.
38. Lee YK, Nomoto K, Salminen S, Gorbach S. Handbook of probiotics. Lee YK editor. New York, USA: John Wiley & Sons. Inc; 1999.
39. Haller D, Colbus H, Ganzle MG, Scherenbacher P, Bode C, Hammes WP. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. Syst Appl Microbiol 2001;(24):218–226.
40. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int Dairy J 2006;(16):189–199.
41. Ewaschuk JB, Naylor JM, Chirino-Trejo M, Zello GA. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. Can J Vet Res 2004;(68):249–253.
42. Ewaschuk JB, Zello GA, Naylor JM. *Lactobacillus* GG does not affect D-lactic acidosis in diarrheic calves, in a clinical setting. J Vet Int Med 2006;(20):614–619.
43. Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int J Food Microbiol 2010;(141):S15–S28.
44. Cebeci A, Gürakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiol 2003;(20):511–518.
45. Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Res Int 2003;(36):895–904.