



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad de Ciencias de la salud
Programa de Maestría en Microbiología
(Modalidad profundización)

Potencial probiótico de bacterias intestinales aisladas de bovinos de raza Holstein de Simijaca, Cundinamarca, Colombia.

Andrea Catalina Villamil Ballesteros

Bogotá D.C., Colombia

Diciembre de 2025

Potencial probiótico de bacterias intestinales aisladas de bovinos de raza Holstein de Simijaca, Cundinamarca, Colombia.

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de

Magíster en Microbiología
(Modalidad de Profundización)

Andrea Catalina Villamil Ballesteros
Médica Veterinaria

Director
Juan Camilo Ovalle Másmele
Bacteriólogo y laboratorista clínico
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Codirectora
Paola Andrea Santos Ruiz, MSc, PhD
Bacterióloga y laboratorista clínico
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Línea de Investigación:
Salud y Bienestar
Grupo de Investigación REMA

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la salud
Programa de Maestría en Microbiología
Bogotá D.C., Colombia
Diciembre de 2025

Dedicatoria

A Dios por las infinitas bendiciones recibidas.

A mi familia por su apoyo incondicional, ayuda y esfuerzo.

Agradecimientos

Extiendo mi más sincera gratitud a mi codirector y directora de tesis, el Dr. Juan Camilo Ovalle y la Dra. Paola Santos. Su dedicación y su guía han sido pilares fundamentales para la orientación y enriquecimiento de esta investigación.

Al Dr. Gustavo Chávez y Biovef por su apoyo y contribución.

Al laboratorio REMA por abrir sus puertas para el desarrollo de esta tesis.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por su apoyo y orientación.

A cada uno de ustedes, mi más profundo agradecimiento por su invaluable contribución a este trabajo.

Resumen

La salud y nutrición de los bovinos son una de las principales preocupaciones del sector ganadero. Constantemente se están buscando nuevas alternativas frente al uso de antibióticos y la generación de planes alimenticios, que contribuyan a la salud animal. Hay un interés creciente en virtud de la selección y caracterización de microorganismos con potencial probiótico. Se ha documentado que las cepas probióticas potenciales deben originarse preferiblemente de la especie objetivo para garantizar especificidad de ubicación y colonización. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar bacterias intestinales nativas de bovinos de raza Holstein con potencial probiótico en sistemas productivos lecheros en Simijaca - Cundinamarca. En función de lo anterior se realizó la toma de muestras y se procedió con el aislamiento, identificación y evaluaciones biológicas de los microorganismos con potencial probiótico. Las cepas con propiedades probióticas se estudiaron en virtud de su actividad hemolítica, actividad antimicrobiana, tolerancia a condiciones ácidas, tolerancia a sales biliares y sensibilidad a los antimicrobianos. En este estudio se aislaron y caracterizaron bacterias ácido-lácticas (LAB) a partir de materia fecal de bovinos Holstein en el trópico alto. De las 20 cepas obtenidas, seis fueron seleccionadas por sus características morfológicas y bioquímicas, y una de ellas fue identificada como *Lactiseibacillus* mediante secuenciación 16S rRNA. Las cepas mostraron tolerancia a condiciones gastrointestinales simuladas, destacándose AC009 y AC010 por su resistencia a pH ácido (3.0) y sales biliares (1%). Ninguna fue hemolítica y presentaron actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* K99 y *Salmonella spp.*, confirmando su seguridad y capacidad de exclusión competitiva. En cuanto al perfil de sensibilidad a antibióticos, las cepas resultaron sensibles a todos los antimicrobianos probados, lo que las convierte en las candidatas más seguras para su uso probiótico. En conclusión, las cepas aisladas poseen propiedades probióticas, siendo AC009 y AC010 las más prometedoras para el desarrollo de biopreparados destinados a mejorar la salud intestinal y el rendimiento productivo de bovinos.

Palabras clave: Aislamiento, potencial probiótico, cepas nativas, microbiota intestinal.

Abstract

Cattle health and nutrition are major concerns in the livestock sector. New alternatives to the use of antibiotics and the development of feeding plans that contribute to animal health are constantly being sought. There is growing interest in the selection and characterization of microorganisms with probiotic potential. It has been documented that potential probiotic strains should preferably originate from the target species to ensure location and colonization specificity. Therefore, the objective of this study was to characterize native intestinal bacteria with probiotic potential in Holstein cattle in dairy production systems in Simijaca, Cundinamarca. Based on the above, samples were collected and microorganisms with probiotic potential were isolated, identified, and biologically evaluated. Strains with probiotic properties were studied based on their hemolytic activity, antimicrobial activity, acid tolerance, bile salt tolerance, and antimicrobial sensitivity. In this study, lactic acid bacteria (LAB) were isolated and characterized from the feces of Holstein cattle in the highland tropics. Of the 20 strains obtained, six were selected for their morphological and biochemical characteristics, and one was identified as *Lactocaseibacillus* by 16S rRNA sequencing. The strains showed tolerance to simulated gastrointestinal conditions, with AC009 and AC010 standing out for their resistance to acidic pH (3.0) and bile salts (1%). None were hemolytic, and they exhibited antimicrobial activity against *Escherichia coli* K99 and *Salmonella* spp., confirming their safety and competitive exclusion capacity. Regarding the antibiotic susceptibility profile, the strains were sensitive to all the antimicrobials tested, making them the safest candidates for probiotic use. In conclusion, the isolated strains possess probiotic properties, with AC009 and AC010 being the most promising for the development of biopreparations aimed at improving intestinal health and productive performance in cattle.

Keywords: Isolation, probiotic potential, native strains, intestinal microbiota.

Contenido

Resumen.....	5
Abstract.....	6
Lista de figuras.....	10
Lista de tablas.....	11
Lista de símbolos y abreviaturas.....	12
Abreviaturas.....	12
1. Introducción.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	4
Pregunta de investigación.....	5
1.2. Justificación.....	6
2. Objetivos.....	8
2.1. Objetivo general.....	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. Marco conceptual y generalidades.....	9
3.1. Probióticos y características generales.....	9
3.1.1. Selección de microorganismos con propiedades probióticas y métodos de caracterización.....	12
3.1.2. Especificidad de los probióticos.....	14
3.1.3. Propiedades y beneficios de la administración de probióticos.....	14
3.1.4. Bacterias ácido-lácticas y su papel probiótico.....	17
3.1.5. Papel de los Probióticos en la regulación metabólica.....	19
3.2. Microbiota intestinal en rumiantes.....	21
4. Metodología (Materiales y Métodos).....	25
4.1. Tipo de estudio.....	25

4.2.	Selección de animales para muestreo	26
4.3.	Criterios de inclusión y exclusión	26
4.4.	Muestreo	26
4.5.	Aislamiento e identificación bacteriana	27
4.5.1	Identificación bioquímica de los aislamientos bacterianos.....	28
4.5.2	identificación molecular de los aislamientos bacterianos.....	28
4.6.	Caracterización de microorganismos con potencial probiótico	29
4.6.1.	Propiedades de tolerancia al ácido	29
4.6.2.	Propiedades de tolerancia a la bilis.....	30
4.6.3.	Prueba de actividad hemolítica	30
4.6.4.	Ensayo actividad antimicrobiana	31
4.6.5.	Prueba de sensibilidad a antibióticos	31
4.7.	Análisis estadístico	32
4.8.	Consideraciones éticas	32
5.	Resultados y discusión	34
5.6.	Aislamiento e identificación de bacteriana	34
5.7.	Evaluación de las propiedades probióticas.....	42
5.7.1.	Propiedades de tolerancia al ácido	42
5.7.2.	Propiedades de tolerancia a la bilis.....	45
5.7.3.	Prueba de actividad hemolítica	47
5.7.4.	Ensayo actividad antimicrobiana	48
5.7.5.	Prueba de sensibilidad a antibióticos	50
6.	Conclusiones	53
7.	Recomendaciones	55
8.	Apropiación Social del Conocimiento y/o publicaciones	56

Bibliografía	57
Anexos	67

Lista de figuras

Figura 1. Metodología para la caracterización in vitro de bacterias intestinales con potencial probiótico aisladas de bovinos de raza Holstein de Simijaca, Cundinamarca, Colombia. Fuente: Figura propia.	25
Figura 2. Procedimiento de aislamiento de bacterias a partir de materia fecal bovina de bovinos Holstein. Fuente: Figura propia.	27
Figura 3. Morfología macroscópica (a) y microscópica (b) típica de bacterias ácido-lácticas aisladas de materia fecal bovina. Fuente: Figura propia.	34
Figura 4. Prueba de catalasa positiva (a) y (b) negativa. Prueba de oxidasa (c) positiva y (d) negativa. Fuente: Figura propia.	35
Figura 5. Árbol de distancias filogenéticas (IeBIBI).	40
Figura 6. Comportamiento de las cepas aisladas expuestas a pH diferentes por 48 horas.	42
Figura 7. Comportamiento de las cepas aisladas expuestas a diferentes concentraciones de sales biliares por 48 horas.	46
Figura 8. Colonias aisladas sembradas en agar sangre. Los aislados mostraron una naturaleza no hemolítica. Fuente: Figura propia.	48
Figura 9. Actividad inhibitoria de los aislados bacterianos obtenidos frente a microorganismos patógenos. Fuente: Figura propia.	50

Lista de tablas

Tabla 1. Categorías microbianas de alimentación directa.	10
Tabla 2. Caracterización preliminar de las bacterias ácido-lácticas aisladas de materia fecal bovina.	36
Tabla 3. Componentes del agar MRS y su categoría funcional (62).....	37
Tabla 4. Uso de otros medios de cultivo en el aislamiento de Lactobacilos de bovinos	38
Tabla 5. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (td) de las cepas aisladas sometidas a pH de 3.0, 4.0 y 5.0.	43
Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (td) de las cepas aisladas evaluadas en sales biliares al 1%, 0.5% y 0.25%.....	46
Tabla 7. Actividad inhibitoria de los aislados.	49
Tabla 8. Perfil de sensibilidad a antibióticos (zona de inhibición en mm) de los aislamientos seleccionados.....	51

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
TGI	Tracto gastrointestinal
LAB	Bacterias ácido-lácticas
FEDEGAN	Federación Colombiana de Ganaderos
PIB	Producto interno bruto
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
ANOVA	Análisis de varianza
BPG	Buenas prácticas ganaderas
DVB	Diarrea viral bovina
PBS	Solución salina fosfatada
MRS	Man Rogosa, Sharpe
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
DO	Densidad óptica
BGP	Bacilos Gram positivos
BRV	Rotavirus bovino
BNoV	Norovirus bovino
BToV	Torovirus bovino
BCoV	Coronavirus bovino
C	Carbono
FDP	Fructosa difosfato aldolasa
EMP	Embden-Meyerhoff-Parnas
PCR	Polymerase Chain Reaction
DE	Desviación estándar
<i>ln</i>	Logaritmo natural
LBS	Lactobacillus Selection Agar

1. Introducción

La ganadería es una de las principales cadenas productivas en el sector agropecuario colombiano; para el año 2023 representó el 1,46% del Producto Interno Bruto (PIB), basado en sistemas de producción especializado y doble propósito, que representan entre el 7,9% y el 43,3% de la orientación del hato ganadero respectivamente (1).

Las razas de producción lechera que predominan en el país provienen de razas europeas *Bos Taurus* puras o cruzadas, entre las que se encuentran Holstein, Jersey, Pardo Suizo, Ayrshire y Normando.

La población bovina en Colombia, según datos de La Federación Nacional de Ganaderos (Fedegán) y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), asciende a 29.6 millones de cabezas en 2023, distribuidas en más de 620,000 predios (2). Para el 2023, la producción de leche fue de 7.1 millones de litros, concentrándose en el trópico alto y cerca a centros urbanos, así mismo, y el consumo de leche fue de 147 litros/habitante (3).

El éxito en los sistemas de producción lechera se sustenta en gran medida en la promoción integral de la salud del hato, en concordancia con el enfoque “One Health” o “Una Salud”, el cual plantea la necesidad de implementar prácticas productivas sostenibles, fortalecer la bioeconomía y contribuir de manera directa al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible.

Actualmente este enfoque reconoce el vínculo estrecho entre la salud humana, la salud animal y el medio ambiente, a través de un enfoque multidisciplinario y multisectorial. Este concepto establece que es inherentemente beneficioso estimular la salud de los animales en pro del bienestar de los seres humanos, es decir, no se puede lograr la salud humana sin proteger también la salud de las poblaciones animales (4).

La salud animal representa una preocupación fundamental en el sector ganadero, especialmente durante las etapas críticas del desarrollo de las hembras de reemplazo, ya que ellas conforman la próxima generación de vacas productoras (5).

Fases como los primeros días de vida, el destete y el parto constituyen etapas críticas para el bovino. Su impacto es tan significativo que el estado de salud de la ternera predestetada puede influir notablemente en el desempeño a lo largo de toda la vida productiva del animal, afectando aspectos como el crecimiento, la eficiencia reproductiva y la producción de leche (5).

Generalmente, los estudios de investigación relacionado con la etapa del destete en bovinos ha girado en torno al rumen, buscando agilizar y maximizar la ingesta de alimento sólido, incentivar el desarrollo de las papilas ruminales, aumentar la superficie de adsorción de productos de la fermentación ruminal y satisfacer las demandas de crecimiento, Sin embargo, este enfoque centrado exclusivamente en el entorno ruminal deja de lado el impacto que los cambios en la composición de los nutrientes y la microbiota pueden tener en el intestino posterior, una zona igualmente crucial para la salud y el desarrollo del animal. (6).

Adicionalmente, es importante mencionar que una microbiota autóctona establecida ejerce una interacción entre el sistema digestivo e inmunológico y está adaptada para crecer en simbiosis con el hospedador. También promueve el desarrollo del epitelio gastrointestinal, lo que contribuye a prevenir el desarrollo de infecciones y mejorar la función de barrera, mejorando el bienestar del animal (6–8).

El rápido cambio de dieta, el medio ambiente, el transporte, el manejo reproductivo y sanitario, el estrés calórico, entre otros factores, desequilibran la salud intestinal, lo que permite la colonización de patógenos oportunistas que comprometen la salud del animal (9).

En animales sanos el intestino está colonizado por una microbiota típica, sin embargo, cuando ésta presenta desequilibrios, puede permitir la colonización de patógenos y la aparición de diarreas que generan morbilidad, mortalidad y pérdidas económicas en las granjas (8,10).

Comprender los mecanismos de adquisición y cambios en la microbiota en las distintas etapas del bovino y los principios que regulan la colonización microbiana es esencial para crear estrategias que permitan mejorar la salud ruminal e intestinal (11). En este sentido, es necesaria una mayor investigación de los cambios microbiológicos, estructurales y funcionales del intestino en bovinos, sobre todo en animales de pastoreo (6,11,12).

En Colombia, las enfermedades entéricas son comunes en terneros y representan enormes pérdidas económicas en la industria ganadera de leche y de carne debido a la alta morbilidad, mortalidad y costos de tratamiento (13).

La diarrea en terneros durante el período neonatal (primeros 28 días de vida), representa más del 50% de la mortalidad neonatal y antes del destete causa el 56% de morbilidad y el 32% de mortalidad en terneros lecheros (14,15). Esta puede ser ocasionada por diversos factores infecciosos y no infecciosos.

Para promover la salud y productividad animal, desde el campo de la medicina veterinaria, se ha generado un creciente interés hacia el estudio de microorganismos nativos intestinales, con el propósito de seleccionar bacterias beneficiosas como herramientas prometedoras en el desarrollo de probióticos (4,8).

Uno de los principales enfoques de la investigación nutricional en terneros ha sido el rumen; sin embargo, el intestino, no menos importante, la investigación es limitada (6). Por lo anterior, este trabajo analiza la microbiota intestinal bovina como una alternativa al uso de antibióticos y alternativa nutricional, que contribuya a la salud animal (4).

1.1. Planteamiento del problema

A nivel global, la investigación en medicina veterinaria ha incrementado su enfoque en la caracterización de la microbiota intestinal de los bovinos, en pro de la selección de microorganismos con potencial probiótico que generen un impacto beneficioso sobre la salud y la productividad animal (16,17).

En la producción ganadera, los rumiantes enfrentan períodos específicos de estrés para la microbiota intestinal. Diversos estudios indican que el uso de probióticos en bovinos en esos períodos, promueven la salud por medio de la exclusión competitiva de microorganismos patógenos, mejoran la función de barrera, reducen de la acidosis ruminal, producción de compuestos como bacteriocinas y defensinas, mejoran la fermentación ruminal y proveen efectos inmunomoduladores (11,16,18,19).

Aun así, la comunidad microbiana intestinal de los bovinos sigue siendo poco estudiada, mientras que el rumen ha sido el punto focal de la investigación sobre fisiología nutricional de vacas y terneros (6,7,17). En Colombia, la falta de investigación a nivel de bacterias probióticas derivadas de intestino de bovinos Holstein y el aprovechamiento de este potencial, es una limitante para para el desarrollo de productos biológicos, que ofrezcan una alternativa biotecnológica de tratamiento de terneros con patologías digestivas como la diarrea o el desarrollo de productos en nutrición animal.

La diarrea causa el 56% de morbilidad y 32% de mortalidad en terneros antes del destete (5). Es de naturaleza multifactorial, siendo las principales bacterias *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*; virus como el rotavirus, coronavirus y virus de la diarrea viral bovina (DVB); y protozoos como *Cryptosporidium parvum* (20).

Investigaciones resaltan que la especificidad de la especie hospedadora del probiótico es un criterio para evidenciar adhesión y propiedades beneficiosas del producto, es decir,

cuando el probiótico se obtiene de la misma especie animal, los efectos beneficiosos suelen ser mayores (9,21–23).

En Colombia, la disponibilidad de probióticos para bovinos con cepas nativas es muy limitada y su enfoque tiende a ser desarrollo ruminal, predominando en el mercado nacional productos importados, desarrollados a partir de microorganismos de otras fuentes de origen.

Por otro lado, la oferta limitada de otras opciones terapéuticas para el tratamiento de las diarreas en terneros y el uso generalizado de antibióticos, ha estado relacionado con el desarrollo de resistencia de los antimicrobianos en las poblaciones bacterianas, situación que despierta interés para la búsqueda de alternativas sanitarias y nutricionales (10,16,19,21).

Bajo este contexto, es una necesidad aislar y caracterizar bacterias intestinales bovinas e investigar su potencial probiótico para establecer el punto de partida del desarrollo de productos biotecnológicos como opción de tratamiento de patologías digestivas y soporte nutricional.

Pregunta de investigación

De acuerdo con el anterior contexto, el presente trabajo de investigación tiene como foco la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el potencial probiótico *in vitro* de las bacterias intestinales aisladas a partir de bovinos de raza Holstein en Simijaca, Cundinamarca?

1.2. Justificación

Prevenir la diarrea en terneros y tratarla adecuadamente es crucial durante la cría, ya que las enfermedades en esta etapa pueden retrasar el crecimiento, afectar la productividad y provocar la muerte; constituyendo graves pérdidas económicas para los ganaderos. Los antibióticos comúnmente utilizados para la diarrea en terneros pueden promover la resistencia bacteriana y aumentar los residuos en carne, por tal motivo es un desafío encontrar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de diarreas en terneros lactantes y en predestete (24).

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), “la resistencia a los agentes antimicrobianos (RAM) se ha convertido en uno de los principales problemas sanitarios de nuestro tiempo”, siendo una amenaza creciente para el bienestar de los seres humanos y animales. En el 2019 se reportaron 5 millones de muertes humanas vinculadas con la resistencia a los antimicrobianos, incluyendo 1.3 millones de muertes causadas directamente por bacterias resistentes (25). Por ende, con esta investigación se busca analizar el desarrollo de alternativas al uso de antibióticos que contribuyan a la salud intestinal a través de la caracterización de los microorganismos nativos con potencial probiótico.

Por otra parte, la oferta de productos biológicos para terneros en el mercado colombiano es limitada y se basa en solo en un producto desarrollado en el país con cepas nativas ruminales (Rumitec®) y productos importados (Biobac®, Organew®, Booster® RN Terneros), estos últimos de los cuales es incierto el origen de los microorganismos presentes en la composición.

Otra de las aplicaciones del uso de probióticos en ganadería está dirigida como inoculantes de ensilajes. Los inóculos microbianos para ensilaje han sido utilizados para mejorar la fermentación y prevenir el deterioro del alimento a través de la producción de ácidos orgánicos como ácido láctico y ácido acético (26).

Una de las aplicaciones de los probióticos está dirigida al tratamiento de diarreas en terneros. Los terneros recién nacidos y los terneros en proceso de transición al destete son muy susceptibles a enfermedades digestivas, principalmente por diarrea, dada la predisposición a la colonización por bacterias oportunistas y potencialmente patógenas presentes en el ambiente, que comprometen la función de barrera ruminal e intestinal (6,7).

Por lo tanto, el aislamiento y caracterización eficiente de microorganismos con propiedades probióticas es primordial para desarrollar la base de un producto biológico. Por medio del aislamiento y selección de microorganismos como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* y *Streptococcus* y otras especies bacterianas de interés que presenten tolerancia a las condiciones específicas del tracto gastrointestinal, actividad inhibitoria comprobada contra microorganismos patógenos y seguridad para poder ser administrados en un animal, se obtiene el principio activo para un probiótico con potenciales efectos sobre la reducción de la incidencia de enfermedades infecciosas de origen gastrointestinal y mejoramiento del sistema inmunológico del animal.

Dado lo anterior, con este estudio se espera poder contribuir con la identificación y caracterización de potenciales cepas probióticas aisladas de bovinos adultos con el fin de poder en un futuro formular un producto probiótico que contenga microorganismos específicos de la especie a la cual se le debe administrar para poder así evaluar el verdadero impacto del producto.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar *in vitro* bacterias intestinales con potencial probiótico aisladas de bovinos de raza Holstein de Simijaca, Cundinamarca, Colombia.

2.2. Objetivos específicos

- Seleccionar bacterias cultivables a partir de materia fecal de bovinos de raza Holstein.
- Identificar bioquímica y molecularmente los aislamientos bacterianos obtenidos a partir de la materia fecal de la población seleccionada.
- Determinar el potencial probiótico de las bacterias que presentan los perfiles bioquímico y molecular previamente establecidos.

3. Marco conceptual y generalidades

3.1. Probióticos y características generales

Existen diversas categorías emergentes de enfoques probióticos en la industria animal que abarcan productos que se han utilizado para mejorar el rendimiento y mejora de la salud animal, en pro de garantizar la seguridad alimentaria, como se describe en la tabla 1 (27,28).

Los probióticos hacen parte de estas categorías emergentes y se definen como “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, son beneficiosos para la salud del hospedero” (16,22,27,28). Se utilizan cada vez más como una alternativa segura a los antibióticos que antes se utilizaban en la alimentación animal sin restricciones (23,28).

Además, a las cepas bacterianas o fúngicas, los probióticos pueden referirse a preparaciones de enzimas, extractos de cultivos o una combinación (29). Este tipo de productos son cada vez más una alternativa segura al uso de antibióticos y promotores de crecimiento (23,30).

Especialmente las bacterias ácido-lácticas (LAB) se utilizan como probióticos debido a que se conocen como miembros beneficiosos de la microbiota gastrointestinal. Estos microorganismos son un grupo de bacterias Gram positivas, no móviles, anaerobios facultativos y no formadores de esporas capaces de producir una amplia gama de ácidos orgánicos como ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido propiónico como productos finales de la fermentación de carbohidratos en función de su metabolismo homo y heterofermentativo (31,32).

Tabla 1. Categorías microbianas de alimentación directa.

Categoría	Descripción	Tipo de producto
Eubióticos	Aditivos alimentarios que desempeñan un papel esencial en el apoyo al rendimiento y el bienestar animal al favorecer la salud intestinal	Ácidos orgánicos, aceites esenciales, probióticos, probióticos, postbióticos, fitobióticos.
Probióticos	Microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, son beneficiosos para la salud del hospedero.	Cultivos vivos de bacterias, levaduras o hongos.
Prebióticos	Sustancias orgánicas no digeridas ni absorbidas por el hospedador, pero pueden promover el metabolismo y la proliferación de bacterias beneficiosas en el organismo. Sustrato fermentable no utilizado por el animal hospedero. Son carbohidratos no digeribles que no se metabolizan en el intestino delgado, sino que se fermentan en el intestino grueso.	Oligosacáridos (fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos), inulina, lactitol, lactulosa y la fibra de cereales
Postbióticos	Productos de levaduras o hongos o productos de su fermentación.	Productos finales de fermentación de levaduras u hongos, productos de pared celular, cultivos tratados térmicamente (no vivos).
Simbióticos	Aditivos alimentarios que funcionan sinérgicamente a través de múltiples modos de acción.	Probiótico combinado con un prebiótico, o un producto de levaduras que contiene prebióticos.

Tomado de El Jeni (27), Salahlou (33) y Shuyao (34)

Algunos de los microorganismos bacterianos más utilizados en las preparaciones probióticas incluyen los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus* y *Bifidobacterium*; sin embargo, entre los no bacterianos se destacan *Saccharomyces*, *Candida pintolopesii* y *Aspergillus oryzae* (22,30,35,36).

En la Unión Europea, los agentes probióticos más utilizados en suplementos alimenticios son cepas bacterianas del género *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*,

Pediococcus y *Streptococcus*; así como levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces* (33).

Los suplementos biológicos veterinarios más utilizados incluyen *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Prevotellabryanti*, y especies de *Megasphaeraelsdenii* (31,37).

En rumiantes se ha prestado mucha atención a *Lactobacillus spp*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Bifidobacterium*, ya que su implementación en la dieta mejora la fermentación ruminal, la función inmune y la mejora de la eficiencia de la producción en el ganado de leche y de carne (38).

En terneros, varias cepas de *Lactobacillus* son utilizadas como promotores de crecimiento en lugar de antibióticos, contrarrestando los efectos negativos del uso generalizado de antibióticos y reduciendo la resistencia antimicrobiana (31).

Los preparados probióticos se presentan como monocepa o multicepa. Investigaciones han demostrado que la combinación de cepas ejerce un equilibrio más favorable en el metabolismo intestinal que el uso de una sola cepa (25). Idealmente deben sobrevivir al ambiente interno del tracto gastrointestinal, colonizar intestino y convertirse en parte de la microbiota normal del hospedador (39).

Se ha informado acerca del uso de policultivos de especies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. plantarum* y *L. casei*) y *Enterococcus faecium* para el tratamiento de diarreas en terneros. En prerumiantes jóvenes, los probióticos bacterianos como las bacterias ácido-lácticas se utilizan para mejorar la salud animal. Los probióticos se dirigen al intestino, porque el rumen no está desarrollado (40).

Estos microorganismos deben tener la capacidad de sobrevivir y conservarse en el tracto digestivo durante su paso, no deben ser patógenos, ni tóxicos, y no deben causar efectos secundarios. Las candidatas potenciales deberían poder modificar parámetros

fisiológicos o estimular el sistema inmunológico, atenuar patógenos o tratar y prevenir infecciones, inflamación y enfermedad (22).

3.1.1. Selección de microorganismos con propiedades probióticas y métodos de caracterización

Recientemente ha crecido el interés en la investigación y selección de microorganismos con propiedades probióticas en diversas especies animales, con el fin de obtener el principio activo potencial para la fabricación de productos biológicos que impacten la salud y productividad animal. Para cumplir este objetivo, las cepas aisladas deben ser caracterizadas y evaluadas (16).

Existen diversos métodos de evaluación del potencial probiótico de cepas bacterianas (8,23,41). El índice de hidrofobicidad, autoagregación, co-agregación y formación de biopelículas evalúa las propiedades de superficie, con base en el principio de que la adhesión a la superficie epitelial es el primer paso requerido para la colonización de microorganismos probióticos. Las BAL se adhieren al epitelio intestinal mediante la producción de proteínas y permite formar una barrera que previene la colonización por bacterias patógenas (9,16,23).

La evaluación de la producción de varios compuestos metabólicos de BAL, incluyendo ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, que ejercen efectos antimicrobianos contra una gamma de patógenos, es un método crucial en la selección de microorganismos probióticos. La selección de BAL con capacidad inhibitoria es esencial, ya que estos compuestos se producirán *in situ* en el intestino para combatir patógenos (9,16). Se ha evaluado la actividad inhibitoria de microorganismos como *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (23,41).

La tolerancia a condiciones gastrointestinales es otra característica fundamental para evaluar en las cepas con potencial probiótico. Las cepas deben ser capaces de sobrevivir a condiciones ácidas (pH 3) y adaptarse al estrés ácido. La exposición a concentraciones

crecientes de sales biliares es otra propiedad necesaria para sobrevivir en el intestino y que permita una colonización efectiva (16,23,40,41).

La resistencia al fenol también se evalúa debido a que los aminoácidos de origen dietético o endógenos se desnaturalizan, lo que conlleva a la formación de fenoles por la acción de la microbiota intestinal, por lo tanto, los probióticos deben sobrevivir a la acción de compuestos tóxicos producido por la fermentación de las proteínas (9).

El análisis de la actividad enzimática extracelular permite establecer si las bacterias con potencial probiótico secretan enzimas como amilasa, proteasa, lipasa y fitasa, que desempeñan un papel importante en la mejora de la digestibilidad y la absorción de nutrientes (9).

En función de la evaluación de seguridad, la prueba de actividad hemolítica analiza este factor de virulencia conocido entre los microorganismos patógenos. La actividad no hemolítica se considera un requisito para la selección de probióticos (9). La actividad hemolítica es una amenaza para el hospedador, lo que podría causar anemia, bacteremia y edema (23,40).

El ensayo de degradación de mucina, también es una prueba referente a la inocuidad para el consumo animal, ya que el deterioro de la barrera de mucina en el tracto gastrointestinal podría aumentar la susceptibilidad de la mucosa a agentes tóxicos y la intrusión de patógenos (9).

La susceptibilidad a antibióticos es otro criterio importante para comprender la seguridad de los probióticos, también para guiar la terapia antimicrobiana. Las preocupaciones de seguridad incluyen que genes de resistencia a los antibióticos puedan transferirse (23,40,42).

También se han realizado evaluaciones de seguridad de probióticos *in vivo* por toxicidad oral, en donde se correlacionan parámetros como peso corporal, índices orgánicos y

estado de salud (40). Otros métodos de caracterización incluyen compatibilidad y producción de exopolisacáridos, tolerancia a altas concentraciones de hidróxido de sodio (NaCl) y actividad enzimática extracelular (amilasa, proteasa y β -galactosidasa), (9,16,23,42).

3.1.2. Especificidad de los probióticos

La especificidad del probiótico es muy conveniente y es el criterio de selección más importante en la aplicación probiótica. Los microorganismos probióticos deben obtenerse de la misma especie que su hospedero previsto, es decir que deben originarse preferiblemente del animal objetivo, para obtener respuestas específicas, por tal razón deben ser autóctonos del ecosistema en el que se administran (9,23).

La respuesta a los probióticos varía con las cepas, la dieta, el hospedero, la forma farmacéutica, la vía de administración y la dosis. Debido a que la microbiota nativa se adapta fácilmente al intestino y prolifera eficientemente hasta formar una población estable, un probiótico autóctono sería más viable y resaltaría las propiedades específicas de la cepa huésped (28,43).

Las cepas que residen naturalmente en el tracto digestivo de los terneros pueden brindar una mejor protección contra infecciones gastrointestinales (41). Se cree que estas cepas tienen más posibilidades de sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal, permitiendo que la microbiota beneficiosa prolifere, garantizando especificidad de ubicación, colonización e inmunoestimulación (16,23,41,44).

3.1.3. Propiedades y beneficios de la administración de probióticos

Los probióticos brindan beneficios mediante diversos mecanismos de acción, como competir por la adhesión al epitelio y nutrientes, secreción de sustancias inhibitoras como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y biopelículas que impiden la propagación de patógenos y promueven la regeneración del epitelio intestinal, disminución del pH y modulación del sistema inmunitario (30,34).

Tienen la capacidad de modular las comunidades microbianas endógenas para ejercer sus efectos directamente. También tienen la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal de los terneros compitiendo potencialmente por nutrientes, produciendo compuestos inhibidores que reducen el pH o modificando el ambiente intestinal para asegurar una ventaja competitiva (28,34).

Pueden influir en la colonización de patógenos al obstruir su unión a los receptores mediante la unión a los receptores en el tracto gastrointestinal. *Lactobacillus plantarum* WCFS1 secreta una adhesina específica de manosa, que inhibe competitivamente la unión de *E. coli* productora de enterotoxina (ETEC) al receptor, al reconocer los sitios de adhesión específicos de manosa en la superficie epitelial intestinal (34).

Lactobacillus rhamnosus exhibe un notable potencial de adhesión a las líneas celulares epiteliales colónicas y participa en interacciones beneficiosas con las células hospedadoras, inhibiendo eficazmente la internalización de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) (34).

Lactobacillus y *Bifidobacterium* modulan la respuesta inmunitaria al aumentar la producción de citoquinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 y reducir el factor de necrosis tumoral (TNF- α), aumentar la producción de anticuerpos (especialmente IgE e IgG), estimulando la inmunidad innata y preparando la respuesta inmunitaria adaptativa (37).

La suplementación con probióticos incluye diversos beneficios como mejorar la eficiencia alimenticia, aumentar la digestibilidad, estimular el microbioma intestinal, reducir el uso de antibióticos, brindar resistencia a diversos patógenos, mejorar la barrera intestinal y mantener bajos niveles de incidencia de diarreas (18,22,30).

La administración de probióticos tiene un efecto beneficioso sobre el rendimiento del crecimiento de los terneros y sobre la eficiencia alimenticia, ejerciendo su mecanismo de acción de tal manera que estos microorganismos compiten por los nutrientes y producen

compuestos antibacterianos en la luz intestinal, permitiendo que ocupen nichos específicos en la mucosa intestinal y activando el sistema inmunológico innato del animal. Cabe resaltar que los efectos del probiótico dependen en gran medida del tipo de cepa implicada y el tipo de alimento consumido por el ternero (35).

Los probióticos basados en microorganismos bacterianos se han utilizado ampliamente en terneros antes del destete con el objetivo de reducir la diarrea, mejorar la salud intestinal y mejorar el crecimiento. La suplementación con bacterias probióticas puede mejorar la resistencia a los patógenos entéricos, especialmente en el ternero que posee un sistema inmunológico poco desarrollado (45).

Se ha evaluado el desarrollo de cultivos probióticos a partir de *Lactobacillus* de heces de terneros para su administración en terneros para tratar y prevenir trastornos gastrointestinales (23). La administración de probióticos tiene un impacto significativo en la aparición de diarrea en terneros, reduciéndola significativamente (39).

La suplementación con probióticos para mantener la homeóstasis de la microbiota intestinal, es una de las principales herramientas para tratar afecciones clínicas como la diarrea, debido a la creciente preocupación del aumento de la resistencia a los antimicrobianos (37).

El consumo de *Lactobacillus spp* puede mejorar la función inmunológica y equilibrar la estructura del microbioma intestinal, aumentando el rendimiento productivo de los terneros (43).

Los probióticos se han utilizado para el tratamiento y la prevención de enfermedades en el ganado como acidosis ruminal subaguda, mastitis, prevención de la metritis, enfermedad de Johne y diarrea en terneros. También se han utilizado en el ganado para mejorar los signos por estrés calórico y el rendimiento reproductivo (28).

El uso de bacterias ácido-lácticas en alimentación directa como probióticos en rumiantes reduce la abundancia de *E. coli* patógena, reduce la frecuencia de diarrea, mejora la ingesta de materia seca y la protección inmunológica durante la infección por medio de la secreción de bacteriocinas (31).

Un estudio realizado en terneros Holstein demostró que la alimentación con probióticos redujo la tasa promedio de diarrea en un 42,90% y aumentó la ganancia de peso diaria en 43,40%, elevó los índices antioxidantes de catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, aumentó los índices inmunológicos de IgA, IgG e IgM. También aumentó la abundancia de *Lactococcus lactis* y *Bacillus massionigeriensis* y disminuyó la abundancia de cepas patógenas como *E. coli* y *Mycobacterium brisnae* (46).

3.1.4. Bacterias ácido-lácticas y su papel probiótico

Las bacterias ácido – lácticas (LAB) son un grupo heterogéneo de microorganismos filogenéticamente relacionados que utilizan carbohidratos como única fuente de carbono (monosacáridos y disacáridos) y producen ácido láctico como principal producto de la fermentación. Son bacterias Gram positivas, no esporuladas, catalasa negativas, acidófilas y aerotolerantes. Generalmente son cocos o bacilos y presentan tolerancia a pH bajos (47,48).

Según su clasificación taxonómica pertenecen al filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales. Comprenden más de 60 géneros y los que se encuentran con mayor frecuencia incluyen *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Weissella* (48,49). A excepción de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Carnobacterium* la mayoría de las LAB no son patógenas y cuentan con clasificación GRAS (generalmente reconocidas como seguras) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (47,49).

Las LAB metabolizan los carbohidratos en diferentes compuestos como ácido acético, acetaldehído, etanol, diacetilo y principalmente ácido láctico, mediante un proceso

conocido como fermentación, que se define como el metabolismo de los azúcares en que la energía se obtiene de la oxidación parcial de un compuesto orgánico (50).

Estas bacterias fermentan azúcares cuando crecen en condiciones anaeróbicas, pero pueden cambiar su metabolismo fermentativo a metabolismo respiratorio anaeróbico cuando se les proporciona hemo o grupos hemo y menaquinona (47).

El metabolismo de los carbohidratos se puede realizar por 2 mecanismos: homoláctica y heteroláctica. La homofermentación puede generar 2 ATP por molécula de glucosa, mientras que la heterofermentación genera un solo ATP por molécula de glucosa. *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* realizan fermentación homoláctica, mientras que *Leuconostoc*, *Weissella* y *Oenococcus* realizan fermentación heteroláctica (48).

En la fermentación homoláctica las hexosas son fermentadas por especies homolácticas para producir principalmente ácido láctico. Una molécula de hexosa producirá dos moléculas de lactato. Las hexosas se metabolizan a través de la vía Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) a piruvato. Estas especies tienen fructosa difosfato aldolasa (FDP) necesaria para hidrolizar una hexosa de 6C para producir dos moléculas de compuestos de 3C. También carecen de una enzima clave, la fosfocetolasa, presente en las especies que son fermentadoras heterolácticas (51)

Las bacterias lácticas heterofermentativas metabolizan las hexosas para producir una mezcla de ácido láctico, CO₂ y acetato o etanol. Carecen de la enzima fructosa difosfato aldolasa (FDP) de la vía EMP, pero poseen enzimas glucosa fosfato deshidrogenasa y xilulosa fosfocetolasa, lo que le permite hidrolizar hexosas a través de la vía fosfogluconato-fosfocetolasa para generar energía (51).

Desde la antigüedad, las LAB se han utilizado empíricamente en la conservación y producción de alimentos fermentados de origen vegetal y animal. Desde 1930 y 1940 las LAB se han utilizado como iniciadores lácticos en la industria de los alimentos fermentados. Posteriormente, debido al aumento del conocimiento en inmunología, estos

microorganismos empezaron a utilizarse como probióticos y para la producción de diversos metabolitos (47).

Se han caracterizado varias cepas bacterianas pertenecientes a las LAB, las cuales presentan un perfil probiótico y cuando se administran en cantidades adecuadas aportan beneficios para la salud del hospedero. El factor más importante de un probiótico es su impacto potencial en la salud y seguridad. Dentro de las características más deseables incluyen su capacidad para sobrevivir en el tracto gastrointestinal, su capacidad para combatir microorganismos patógenos mediante actividad antimicrobiana y sus propiedades antioxidantes (50).

3.1.5. Papel de los Probióticos en la regulación metabólica

Los efectos beneficiosos de los probióticos se atribuyen en gran medida a los subproductos metabólicos. En el intestino, los probióticos fermentan activamente carbohidratos, lo que conduce a la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como el ácido láctico, propiónico y acético (34).

Dichos metabolitos contribuyen al mantenimiento de la salud intestinal y modulan diversos procesos fisiológicos. Los AGCC proporcionan energía a las células epiteliales intestinales para promover el crecimiento celular y regulan el pH y el nivel de oxígeno para crear un ambiente propicio para el crecimiento de bacterias benéficas (34,46).

El ácido acético coordina la interacción entre las células epiteliales e inmunitarias; el ácido propiónico participa en la gluconeogénesis, proporcionando energía al animal y el ácido butírico mediante el proceso de β -oxidación cubre el 70% de las necesidades energéticas (34).

Las Bifidobacterias y los Lactobacilos favorecen la fermentación de la lactosa y otros azúcares. Tras la ingestión, los probióticos facilitan la descomposición de la lactosa y se producen ácidos orgánicos como el ácido láctico. Esta mejora la motilidad intestinal y suprime la proliferación de bacterias patógenas (34).

Por otro lado, los probióticos facilitan la digestión de proteínas en terneros mediante la secreción de enzimas digestivas como proteasas. La microbiota intestinal participa en el metabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (34).

Algunos probióticos pueden sintetizar sus propias proteínas bacterianas utilizando intermediarios como el amoníaco producido por el metabolismo proteico, reduciendo así la acumulación de sustancias nocivas en el intestino (34).

Los probióticos, en el proceso del metabolismo proteico, pueden producir sustancias biológicamente activas, como péptidos, que regulan la función inmunitaria, promueven el crecimiento y el desarrollo, y ayudan a mejorar la resistencia y el rendimiento del crecimiento de los terneros al reducir la diarrea (34).

Se ha demostrado que los probióticos regulan el metabolismo de los ácidos biliares en el tracto gastrointestinal (TGI), lo que promueve la reabsorción y el reciclaje de ácidos biliares y mejora la digestión de las grasas. Ciertas especies de *Lactobacillus* también pueden influir en la circulación enterohepática de los ácidos biliares al devolver más ácidos biliares al intestino, lo que mejora la emulsificación, la digestión y la absorción de las grasas, mantiene la función intestinal normal y reduce la diarrea causada por la mala digestión de las grasas (34).

Uno de los principales mecanismos de actividad antimicrobiana de los probióticos viene dada por la producción de compuestos antimicrobianos, sin embargo, existen otros mecanismos como como la unión a las células epiteliales, modulación del sistema inmunológico, la competencia por nutrientes y producción de biopelículas al cambiar la población bacteriana del tracto gastrointestinal (28,31).

Las bacterias ácido-lácticas producen dos compuestos: bacteriocinas de alta masa moléculas y sustancias no bacteriocinas de baja masa molecular. Entre estas sustancias se encuentran ácido láctico y acético, responsables del impacto positivo en el ecosistema

gastrointestinal a través de la colonización de la microbiota y la disminución de los microorganismos patógenos (31,46).

Lactobacillus y *Bifidobacterium* además de producir compuestos antimicrobianos, modulan la respuesta inmune al aumentar las interleucinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, reducir el factor de necrosis tumoral (TNF- α), aumentar la producción de anticuerpos como Inmunoglobulinas IgE e IgG, estimulan la inmunidad innata y preparan la respuesta inmune adaptativa (37).

3.2. Microbiota intestinal en rumiantes

El microbioma incluye el conjunto de microorganismos, sus secuencias genómicas, y los factores ambientales en un hábitat determinado. Abarca un conjunto de información más amplio que la microbiota, ya que esta definición incluye el conjunto de datos metabolómicos, metagenómicos y metatranscriptómicos. El término se refiere tanto a bacterias, como hongos, arqueas y otros microorganismos (52).

Por otro lado, la microbiota se refiere específicamente a los microorganismos de un entorno definido. Incluye bacterias, hongos, arqueas, virus y otros microorganismos (52). La constitución de la microbiota intestinal varía según el hospedador, predominando en terneros neonatos *Bacteroidetes*, terneros de 21 días y animales adultos *Bacteroidetes* y *Prevotella*. Se han observado miembros metanógenos y celulolíticos a los 3-4 días edad y en animales maduros. El consorcio microbiano es muy complejo, por lo tanto, la mayoría de las bacterias no están cultivadas (53).

La composición de la microbiota intestinal varía dependiendo de factores ambientales y del hospedero. La colonización espontánea se da en sistemas basados en pastoreo o extensivos, sin embargo, una cría intensiva y la poca exposición de las crías a sus madres reduce drásticamente la adquisición natural de la microbiota autóctona (54).

En el primer escenario, los diferentes segmentos del intestino son colonizados por microbiota típica que se adapta y se desarrolla en simbiosis con el hospedero, pero en el segundo caso, el entorno intestinal se ve afectado al facilitar el asentamiento de microorganismos patógenos (54).

En la mayoría de los mamíferos, un microbioma intestinal estable aumenta eficazmente la digestión y la absorción de nutrientes, acelera la construcción de funciones inmunitarias en el epitelio intestinal, promueve el desarrollo del sistema inmunitario e inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos; ayudando así a reducir la incidencia de enfermedades (34).

El análisis de la diversidad bacteriana intestinal en rumiantes sigue siendo poco estudiado. Sin embargo, se ha relacionado con la edad, el desarrollo del tracto digestivo, prácticas de manejo y transición de las dietas forrajeras a dietas con granos (8,17).

El tracto gastrointestinal de los terneros recién nacidos es colonizado por un grupo diverso de microbiota, siendo esta crucial para el desarrollo del intestino y el sistema inmunológico (9). La microbiota intestinal juega un papel importante en muchos procesos fisiológicos como la digestión de los nutrientes y como barrera contra patógenos y sustancias tóxicas (4,8).

Antes del destete, la microbiota intestinal está compuesta principalmente por bacterias en particular como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Corynebacterium* y *Clostridium*. A medida que el ternero crece y consume alimento sólido se observan cambios significativos en la microbiota intestinal (37).

3.3. Diarrea en terneros

La diarrea es considerada una prioridad para la industria lechera debido a su alta incidencia, sus efectos a corto y largo plazo en la salud y rendimiento de los terneros, así como mayor riesgo de mortalidad (55). Los terneros recién nacidos son particularmente

vulnerables a diversas enfermedades infecciosas, siendo la diarrea neonatal una de las más comunes y perjudiciales.

La diarrea es una afección multifactorial compleja que se produce por la interacción de varios factores de riesgo subyacentes y patógenos infecciosos. Los terneros no pueden adquirir inmunoglobulinas del sistema circulatorio materno debido a las características únicas de la placenta de tipo cotiledonaria y sindesmocorial. La inestabilidad de la microbiota intestinal y la función intestinal incompleta de los terneros recién nacidos con factores importantes que contribuyen a la alta incidencia de diarrea precoz (34).

Algunos factores como la edad, la predisposición genética, condiciones ambientales subóptimas, prácticas de manejo inadecuadas, deficiencias nutricionales, estados de inmunosupresión y comorbilidades, pueden determinar la susceptibilidad a la presentación de diarrea neonatal (34).

Bacterias como *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*; virus como rotavirus bovino (BRV), coronavirus bovino (BCoV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), norovirus bovino (BNoV) y torovirus bovino (BToV); y parásitos como *Cryptosporidium parvum* y *Eimeria spp* son algunos patógenos entéricos comunes que causan diarrea en terneros (37,56,57).

La infección bacteriana progresa rápidamente, desde la reducción de la absorción de los nutrientes, diarrea, pérdida de peso y debilidad hasta causar deshidratación extrema y mortalidad en menos de 24 horas. La primera infección, el deterioro de la función de barrera del epitelio intestinal y el desequilibrio de la microbiota exponen a los terneros a una sobreinfección por múltiples patógenos oportunistas, lo que conlleva a un aumento de la tasa de mortalidad (37).

Factores no infecciosos como un manejo inadecuado de la alimentación, puede causar diarrea en terneros, una dieta desequilibrada o nutricionalmente inadecuada durante la gestación, combinada con actividad física insuficiente puede alterar el metabolismo de

los nutrientes maternos y perjudicar el desarrollo fetal normal. Como resultado los terneros pueden presentar retraso en el crecimiento, debilitamiento de las condiciones fisiológicas, menor resistencia inmunitaria y mayor susceptibilidad a presentar diarrea (34).

Así mismo, vacas malnutridas producen calostro de baja calidad, bajo volumen y con contenido reducido de inmunoglobulinas, lo que afecta significativamente la salud neonatal. Si los terneros recién nacidos no consumen calostro durante las primeras horas de vida, aumenta el riesgo de trastornos digestivos, lo que los hace muy susceptibles a la diarrea (34).

Los antibióticos han sido ampliamente utilizados para el tratamiento de diarreas y promover la salud, sin embargo, su uso excesivo ha provocado el desarrollo de bacterias resistentes y la presencia de residuos en subproductos alimenticios. En terneros la diarrea recurrente antes del destete y el uso inadecuado de antibióticos durante las primeras etapas de vida puede resultar en un desarrollo insuficiente de la función ruminal y la microbiota intestinal, lo que afecta la digestión y absorción de nutrientes durante el crecimiento (34).

Debido a la aparición de cepas patógenas resistentes a los antibióticos, la Unión Europea y China, prohibieron el uso de promotores de crecimiento antimicrobianos en la alimentación animal. Actualmente el aumento de la resistencia antimicrobiana es una de las principales preocupaciones de la OMS, por lo cual el desarrollo de nuevos y diversos agentes antidiarreicos como los probióticos resulta crucial en la industria ganadera (37).

La intervención oportuna en los terneros mediante la suplementación con probióticos y otras estrategias de apoyo es esencial para mejorar su crecimiento y funciones metabólicas. Los probióticos han ganado reconocimiento como alternativas prometedoras a los antibióticos. Pueden mejorar la salud del tracto gastrointestinal al mejorar la integridad de barrera, los procesos metabólicos y optimizando la composición de la microbiota intestinal (34).

4. Metodología (Materiales y Métodos)

4.1. Tipo de estudio

La presente investigación es de tipo Cuantitativo, observacional, descriptivo.

Detalla e interpreta los fenómenos observados y ayuda a plantear hipótesis que serán probadas a través de estudios observacionales. Se basa en tres etapas, las cuales se describen en la figura 1.

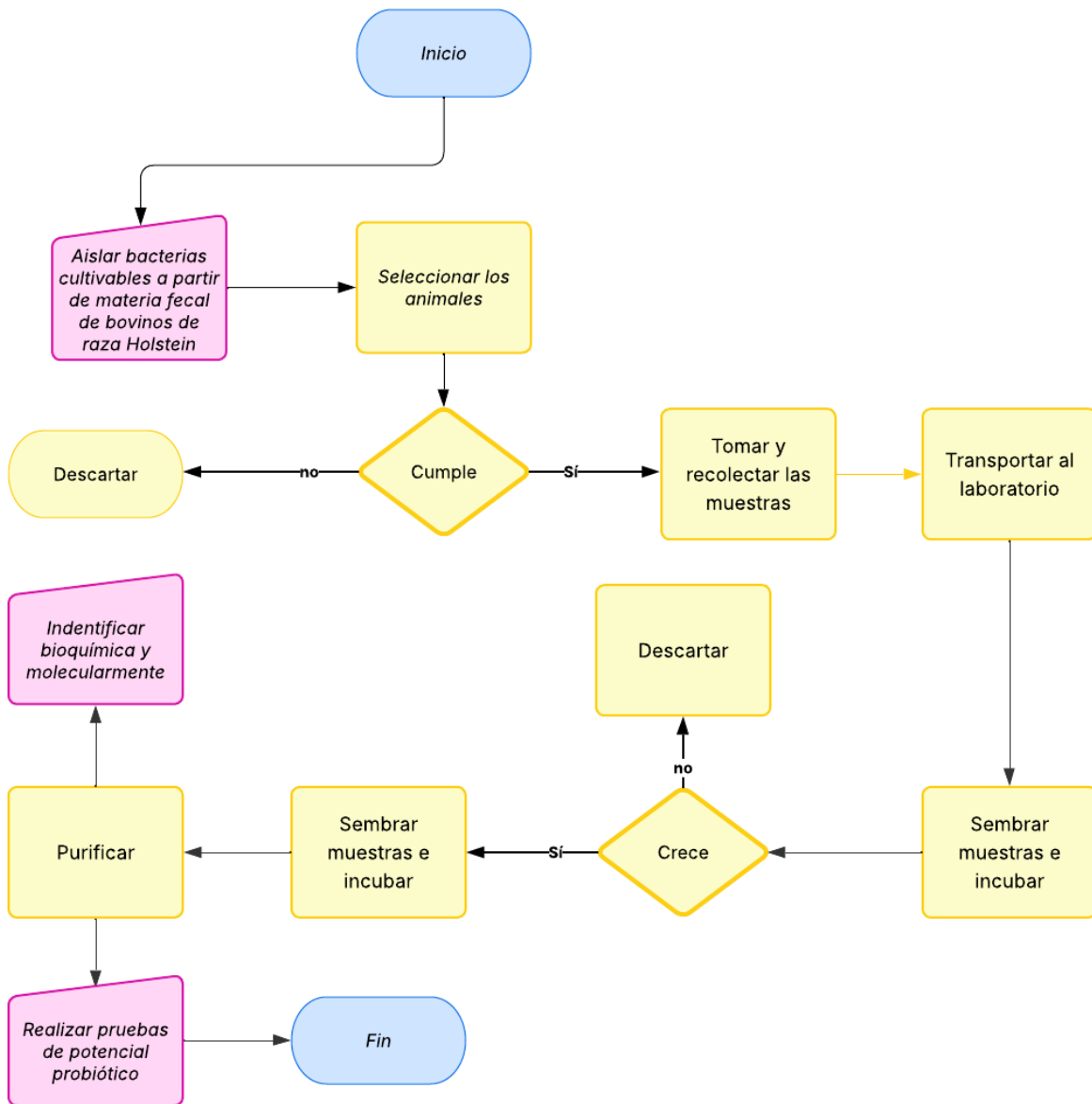


Figura 1. Metodología para la caracterización *in vitro* de bacterias intestinales con potencial probiótico aisladas de bovinos de raza Holstein de Simijaca, Cundinamarca, Colombia. Fuente: Figura propia.

4.2. Selección de animales para muestreo

Para el muestreo se seleccionaron 3 bovinos hembra (novillas) clínicamente sanas de raza Holstein, con una condición corporal 3-4/5, con una dieta específica a base de 20% suplemento (alimento concentrado peletizado, alimento en harina enmelazado, semilla de algodón, silo de maralfalfa y sales mineralizadas) y 80% forraje (Kikuyo y carretón rojo gigante), ubicadas en una finca del municipio de Simijaca, Cundinamarca, Colombia (2.559 m.s.n.m) 5°29'05"N 73°49'01"W, bajo un sistema de pastoreo rotacional.

El control de salud animal se realizó de acuerdo con el plan sanitario preventivo ganadero desarrollado por el personal veterinario de la finca. Antes del muestreo, los animales no recibieron tratamiento antibiótico.

4.3. Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión: Bovinos hembra, raza Holstein, clínicamente sanas, edad 1 a 3 años, CC 3-4/5, sin tratamiento antibiótico hace 3 meses, heces de aspecto pastoso y olor *sui generis*, consumo de agua y alimento *ad libitum*, alimentación con dieta de forraje 80% y 20% suplemento.

Criterios de exclusión: Bovinos machos, bovinos hembra de otras razas, hembras con aparición de una condición de enfermedad previo al muestreo de los animales. Hembras alimentadas con otro forraje diferente.

4.4. Muestreo

El muestreo se realizó por palpación rectal. Se colectaron asépticamente en tubos cónicos plásticos de 50 mL con tapa estériles muestras de materia fecal de cada animal y fueron transportados en refrigeración (4°C) al laboratorio REMA de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca para su respectivo cultivo y aislamiento. El muestreo se realizó por duplicado de los tres bovinos hembra, para un total de 6 muestras de materia fecal para procesar en el laboratorio.

4.5. Aislamiento e identificación bacteriana

Se pesaron 3 g de materia fecal y se homogenizaron asépticamente en 15 mL de solución salina fosfatada (PBS) estéril. Después se realizaron diluciones en serie hasta 4 veces por cada muestra. De cada suspensión se tomó una alícuota de 100 μ L para ser sembrada en agar Man Rogosa, Sharpe (MRS) (PanReac AppliChem, España), un agar selectivo para el aislamiento de bacterias ácido-lácticas. A continuación, las muestras sembradas se incubaron en condiciones de microaerofilia (Anaerogen, Oxoid) por 48 horas a 37°C (16,41,58) (figura 2).

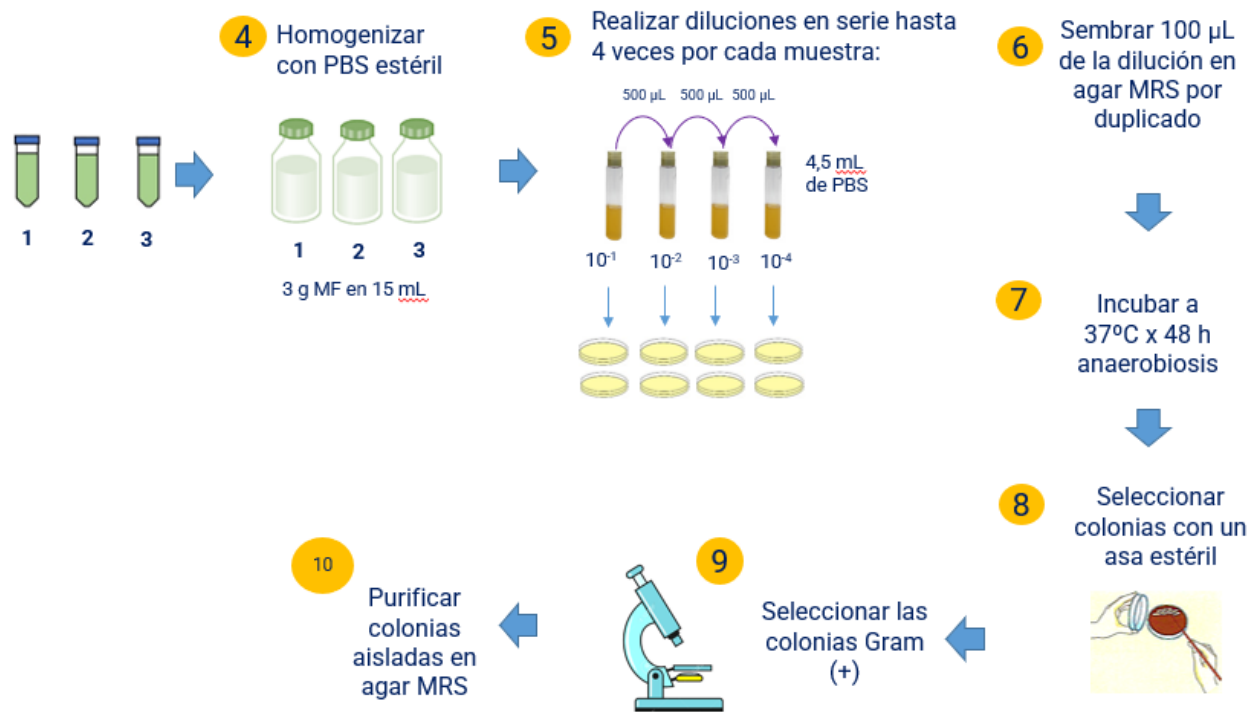


Figura 2. Procedimiento de aislamiento de bacterias a partir de materia fecal bovina de bovinos Holstein. Fuente: Figura propia.

Posteriormente, se seleccionaron colonias con morfología macroscópica característica y se purificaron después de varias generaciones, sembrando en agar MRS e incubando bajo las mismas condiciones mencionadas.

4.5.1 Identificación bioquímica de los aislamientos bacterianos

Los aislados se caracterizaron preliminarmente con tinción de Gram, catalasa y oxidasa (Oxidase strips Oxoid, España). Solo se consideraron los microorganismos que fueron Gram positivos y negativos a catalasa y oxidasa. Los cultivos aislados se mantuvieron en stocks congelados en un medio de congelación que contenía 20% de glicerol a -76°C. Los aislados se subcultivaron en agar y caldo MRS a 37°C durante 24-48 horas antes de su uso en estudios posteriores (16).

4.5.2 identificación molecular de los aislamientos bacterianos

La identificación de cepas implicó un método de extracción desarrollado por CorpoGen, basado en rompimiento por calor y precipitación por “salting out”, el aislamiento y purificación del DNA, amplificación del gen ribosomal 16S mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), purificación de los fragmentos y secuenciación mediante método Sanger utilizando los iniciadores 337F, 518F, 800R, y 1100R del gen ribosomal 16S; limpieza y ensamblaje de las secuencias para obtener la secuencia problema, análisis taxonómico de la secuencia problema mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), comparando contra la base de datos RNA de referencia “refseq_rna”; análisis taxonómico de la secuencia problema mediante la herramienta leBIBI IV SSU-rDNA (16S) (Automated ProKaryotes Phylogeny) de la Universidad de Lyon. Esta herramienta emplea la base de datos BIBI DB mk45 (actualizada a diciembre 2022) y también utiliza las herramientas Kalign v3.3, FastTree v2.1.11, ClAlign 1.0.9, Fastroot v1.5 y ToyTree v1 para generar las relaciones filogenéticas de la muestra. Así mismo implicó un alineamiento múltiple, usando el algoritmo MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*), de la secuencia problema con las treinta secuencias de mayor similitud reportadas por BLAST, generación de un árbol filogenético usando el modelo de distancia genética de Tamura-Nei (TN93), con el método de “Neighbor-Joining” y el método de “Bootstrap” con mil réplicas y clasificación taxonómica de la secuencia consenso. Este proceso fue realizado en colaboración con el laboratorio CorporGen, Bogotá, Colombia (23).

4.6. Caracterización de microorganismos con potencial probiótico

A partir de la revisión documental y de antecedentes se estudiaron diversas metodologías de caracterización de BAL, sin embargo, las seleccionadas corresponden a procesos convencionales en evaluación de propiedades probióticas.

4.6.1. Propiedades de tolerancia al ácido

Por medio de esta prueba se evaluó la tolerancia de los microorganismos aislados a diferentes valores de pH. La tolerancia de las bacterias aisladas se determinó mediante inoculación en caldo MRS previamente ajustado a pH de 3.0, 4.0 y 5.0 con HCl 0.1 N (16).

Se prepararon suspensiones de bacterias en caldo LB + Tween 80% al 0.05% incubadas por 48 horas a 37°C y se ajustaron a 0.04 de DO_{600 nm} (densidad óptica) en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS) (59–61).

Luego se inocularon 150 µL las suspensiones bacterianas en las microplacas de poliestireno por triplicado y se evaluó el crecimiento de los aislados en diferentes condiciones de pH mediante lector de placas (Thermo Labsystems Bioscreen) por 48 horas de incubación a 37°C, comparado con los aislados sin tratamiento (control).

Se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) definida como la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo expresada en h⁻¹

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1}$$

y el tiempo de duplicación (t_d), como el tiempo necesario para que las poblaciones de células se dupliquen:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

4.6.2. Propiedades de tolerancia a la bilis

Por medio de esta prueba se evaluó la capacidad de supervivencia de los microorganismos a diferentes concentraciones de sales biliares. Se determinó mediante inoculación en caldo MRS previamente ajustado con sales biliares a concentraciones del 1%, 0.5% y 0.25% (16).

Se prepararon suspensiones de bacterias en caldo LB + Tween 80% al 0.05% incubadas por 48 horas a 37°C y se ajustaron a 0.04 de DO_{600 nm} (densidad óptica) en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS) (59–61).

Posteriormente, se inocularon 150 µL las suspensiones bacterianas en las microplacas de poliestireno por triplicado y se evaluó el crecimiento de los aislados en diferentes condiciones de sales biliares mediante un analizador automático de curvas de crecimiento (Thermo Labsystems Bioscreen) por 48 horas de incubación a 37°C, comparado con los aislados sin tratamiento (control).

Se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) definida como la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo expresada en h⁻¹

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1}$$

y el tiempo de duplicación (t_d), como el tiempo necesario para que las poblaciones de células se dupliquen:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

4.6.3. Prueba de actividad hemolítica

La evaluación de la actividad hemolítica de las cepas aisladas refiere una evaluación primaria de la seguridad, para determinar la naturaleza no patógena de los aislamientos seleccionados (9,23,58). La actividad no hemolítica se considera necesaria para seleccionar probióticos (9).

La hemólisis es un rasgo característico de cepas patógenas virulentas, por lo tanto, los cultivos aislados se cultivaron en agar sangre (LABG&M Microgen) y se incubaron a 37°C durante 3 días en condiciones anaeróbicas.

Posteriormente se analizó la formación de halos de hemólisis, un halo verde alrededor de las colonias se consideró actividad α -hemolítica, una zona transparente alrededor de las colonias se consideró actividad β -hemolítica (hemólisis completa) y las colonias que no presentaron cambios se consideraron que exhiben actividad γ -hemolítica (ninguna hemólisis).

4.6.4. Ensayo actividad antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana de los aislados se evaluó mediante el método de difusión en agar (40,62). Se utilizaron 3 bacterias potencialmente patógenas en terneros, *E. coli* K99, *S. typhimurium* y *S. dublin*. Se efectuó una siembra masiva o en césped de las bacterias sobre agar LB con hisopos de algodón estériles (58).

Posteriormente se perforaron agujeros en el agar con un punzón metálico (7 mm). Se inocularon 100 μ L de la solución bacteriana de cepas aisladas en los agujeros y se inyectó caldo MRS como control negativo. Se incubaron las muestras a 37°C durante 24 horas. El diámetro de zona de inhibición determinó la capacidad inhibitoria de las cepas patógenas.

4.6.5. Prueba de sensibilidad a antibióticos

Se evaluó la sensibilidad a antibióticos mediante el método de difusión en disco (9,23,41). Se eligieron un total de 11 antibióticos para la prueba: (i) inhibidores de la síntesis de la pared celular: Penicilina (P) 10 UIC, Amoxicilina-clavulánico (AMC) 20/10 μ g, Ampicilina (AM) 10 μ g, Cefoxitina (FOX) 30 μ g, Imipenem (IMP) 10 μ g, Cefazolina (KZ) 30 μ g, Ceftriaxona (CRO) 30 μ g; (ii) alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos: Ciprofloxacina (CIP) 5 μ g, Levofloxacino (LEV) 5 μ g; (iii) inhibición de la

síntesis proteica: Eritromicina (E) 15 µg, Tetraciclina (TE) 30 µg (63). Los discos de antibiótico se obtuvieron de Oxoid y Liofilchem.

Los aislamientos fueron sembrados en placas de agar Muller Hilton (HiMedia, India), en condiciones asépticas se colocaron los sensidiscos de cada uno de los antibióticos y se incubaron por 24 horas a 37°C y posteriormente se realizaron las mediciones.

La ausencia de una zona de inhibición del crecimiento alrededor de los discos antimicrobianos se ha descrito como resistencia bacteriana. Los resultados se expresaron como Resistente ($R \leq 15$ mm), intermedio (I 15–20 mm) y sensible ($S \geq 20$ mm) (40).

4.7. Análisis estadístico

Todos los ensayos *in vitro* se realizaron por triplicado. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de los datos. Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante la prueba de Tukey tras el análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico GraphPad Prism, versión 8.0.1. Un valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

4.8. Consideraciones éticas

La Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, lugar donde se desarrollará proyecto, cuenta con Permiso de estudio para recolección de especímenes de la biodiversidad con fines de investigación científica, establecido mediante la Resolución N° 00321 del 29 de marzo de 2017 por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA).

Este trabajo no representa ningún riesgo sobre la bioseguridad, salud pública, sanidad animal o vegetal y una vez finalizado el proyecto los especímenes aislados serán depositados en una colección nacional registrada ante el Instituto Humboldt de conformidad con la resolución anterior.

Este trabajo está exento de aprobación de un Comité de ética oficial, porque no implica la experimentación directa con animales.

5. Resultados y discusión

5.6. Aislamiento e identificación de bacteriana

Con el fin de seleccionar bacterias ácido-lácticas beneficiosas para ser utilizadas como probióticos, se analizaron muestras de materia fecal de 3 bovinos hembras de raza Holstein, en una finca de trópico alto ubicada en Simijaca, Cundinamarca, Colombia.

En la presente investigación se obtuvieron 20 cepas de colonias pequeñas de 2 a 5 mm, de color crema, opacas y brillantes, con márgenes bien definidos, convexas, lisas, con un olor característico a leche agria. Microscópicamente se observaron bacilos Gram positivos, no esporulados, no flagelados, con extremos redondeados, que se presentaban solos, en pares y en cadenas cortas (Ver figura 3 y tabla 2) (64).

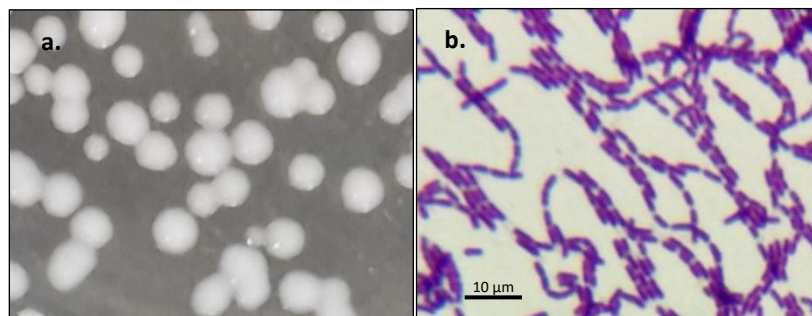


Figura 3. Morfología macroscópica (a) y microscópica (b) típica de bacterias ácido-lácticas aisladas de materia fecal bovina. Fuente: Figura propia.

Se estandarizó el proceso de congelación y cultivos los aislados se conservaron en stock a -76°C . Se verificó el proceso y la viabilidad de las cepas congeladas hasta 10 meses después de su congelación.

Todas las cepas obtenidas se consideraron como presuntas bacterias ácido-lácticas con base en una caracterización primaria: los resultados de la tinción de Gram, la prueba de catalasa y oxidasa negativas. Sin embargo, mediante pruebas de identificación se seleccionaron 6 microorganismos para realizar la evaluación del potencial probiótico.

La prueba catalasa se ha utilizado para identificar microorganismos que producen la enzima catalasa. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno que se libera en forma de burbujas (65). Hubo microorganismos que fueron positivos a esta prueba, por lo tanto, fueron descartados y solo las bacterias que fueron negativas se consideraron en este estudio (Ver figura 4).

Para determinar si un microorganismo produce la enzima citocromo oxidasa se realiza la prueba oxidasa. En presencia de oxígeno atmosférico la enzima intracelular citocromo oxidasa oxida el reactivo fenilendiamina y forma un compuesto color púrpura (indofenol) (Ver figura 4). La prueba de oxidasa identifica la presencia de la enzima citocromo c oxidasa, que es crucial para la respiración celular en algunas bacterias (66).

Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica (66).

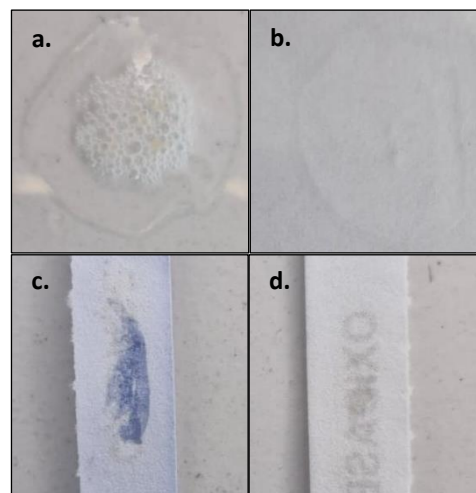



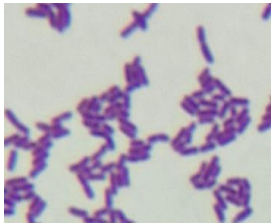

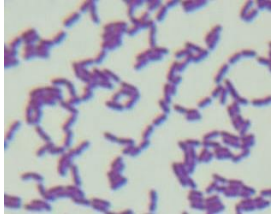

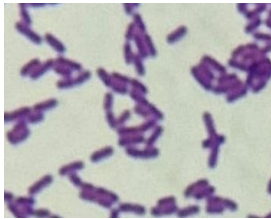
Figura 4. Prueba de catalasa positiva (a) y (b) negativa. Prueba de oxidasa (c) positiva y (d) negativa. Fuente: Figura propia.

El aislamiento de bacterias ácido-lácticas de cualquier fuente debe tener en cuenta sus complejos requerimientos nutricionales y la preferencia por condiciones

microaerófilas/anaeróbicas (64). En este estudio se utilizó un medio comercial de agar MRS sin modificaciones para el cultivo y aislamiento de bacterias ácido-lácticas (Ver tabla 3). Este medio de cultivo fue desarrollado por de Man, Rogosa y Sharpe en 1960 con la intención de producir un medio definido como sustituto del agar de jugo de tomate para el cultivo de lactobacilos (67).

El medio MRS proporciona un buen recuento de colonias y un tamaño y morfología de colonia característicos para lactobacilos y otras bacterias lácticas. Otros microorganismos deben descartarse mediante la apariencia específica de las colonias y mediante pruebas de confirmación como tinción de Gram y prueba de catalasa (67).

Tabla 2. Caracterización preliminar de las bacterias ácido-lácticas aisladas de materia fecal bovina.

Código	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Descripción	Bioquímica
AC001			Colonia blanca, aspecto brillante, redonda. BGP cortos	Catalasa (-) Oxidasa (-)
AC005			Colonia blanca, pequeña, brillante. BGP cortos	Catalasa (-) Oxidasa (-)
AC006			Colonia blanca, brillante BGP cortos.	Catalasa (-) Oxidasa (-)

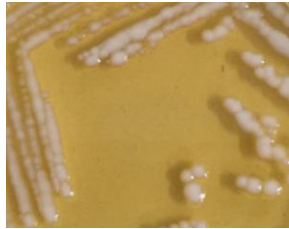
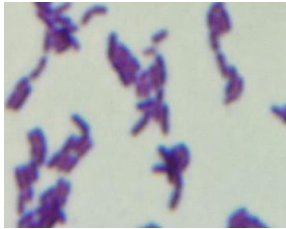
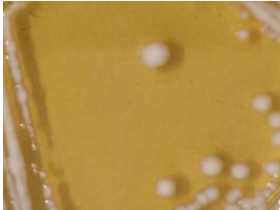
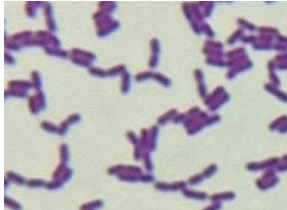

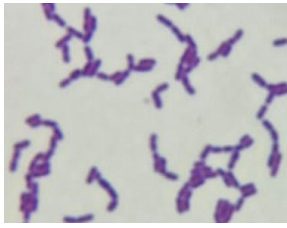
AC007			Colonia blanca, aspecto brillante, redonda. BGP cortos.	Catalasa (-) Oxidasa (-)
AC009			Colonia blanca, brillante. BGP cortos.	Catalasa (-) Oxidasa (-)
AC010			Colonia blanca, brillante. BGP cortos.	Catalasa (-) Oxidasa (-)

Tabla 3. Componentes del agar MRS y su categoría funcional (62).

Componente	Cantidad	Función
di-Amonio Hidrógeno Citrato	2.0 g/L	Agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas
Extracto de Carne	8.0 g/L	Fuente de nitrógeno
Extracto de Levadura	4.0 g/L	Fuente de nitrógeno
D(+)-Glucosa	20.0 g/L	Fuente de carbono y energía
Magnesio Sulfato	0.2 g/L	Cofactores enzimáticos
Manganeso(II) Sulfato	0,05 g/L	Cofactores enzimáticos
Peptona Bacteriológica	10.0 g/L	Fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales
di-Potasio Hidrógeno Fosfato	2.0 g/L	Sistema buffer
Sodio Acetato	5.0 g/L	Cofactores para el crecimiento bacteriano
Tween 80	1.0 g/L	Fuente de ácidos grasos
Agar	10.0 g/L	Agente solidificante

Algunos estudios reportan el uso de agar MRS sin modificaciones para el aislamiento de bacterias ácido-lácticas a partir de materia fecal bovina, suelo de corrales y raciones de alimento, en condiciones de incubación a 37°C durante 48 horas (16,23,41,58,68). Otras investigaciones utilizan agar MRS enriquecido con clorhidrato de cisteína (0.5 g/L) para hacerlo selectivo para lactobacilos ácido-tolerantes (9).

También se ha reportado el uso de otros medios de cultivo como agar M17, el agar Columbia Modificado para el aislamiento de Bifidobacteria y el uso de agar LBS para el aislamiento de Lactobacilos (8,41) (Ver tabla 4).

Tabla 4. Uso de otros medios de cultivo en el aislamiento de Lactobacilos de bovinos

Medio de cultivo	Fuente	Microorganismos aislados	Referencia
MRS	Heces de ganado Suelo de corrales Raciones de alimento	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus y Weissella.</i> (500)	(16)
MRS + clorhidrato de cisteína (0,5 g/L)	Muestras fecales de recto	<i>Lactobacillus</i> (55)	(9)
MRS M17 TPY	Heces recogidas de ganado	<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i> (107)	(41)
TPY + Mupirocina (100 g/L) y ácido acético glacial (1 mL/L)	Muestras fecales	<i>Bifidobacterium</i> (57)	(42)
MRS	Muestras fecales de recto	<i>Lactobacillus</i> (41)	(23)
MRS LBS	Muestras fecales	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus</i> (686)	(69)
MRS	Muestras fecales	<i>Lactobacillus, Enterococcus</i> (55)	(70)
MRS y MRS acidificado	Muestras fecales de recto	<i>Lactobacillus</i> (80)	(71)
MRS	Muestras intestinales	<i>Lactobacillus, Enterococcus</i> (42)	(72)
MRS	Muestras rectales y cavidad bucal	<i>Lactobacillus</i> (96)	(8)

Se ha destacado recientemente la importancia del uso de probióticos derivados de microorganismos autóctonos debido a su potencial de colonización, ya que son

específicos del hospedador. Por lo tanto, la identificación y caracterización de microbiota entérica de bovinos es un prerrequisito para seleccionar candidatos probióticos (16).

Es necesario centrar los estudios en la composición de la microbiota intestinal en bovinos de raza Holstein. En este trabajo encontramos diferentes especies de bacterias ácido-lácticas. De los seis aislados, uno fue identificado por secuenciación del gen 16s rRNA. Este microorganismo pertenece a la especie *Lacticaseibacillus* (Ver figura 5) (Resultados RefSeq NCBI, identidad 99% y cobertura 99%). Los otros aislados fueron enviados al Laboratorio Solutions in Immunology and Microbiology (SIM) para la extracción de ADN y amplificación del gen 16S ARNr, posteriormente, se enviarán al Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM) para la secuenciación. Por sus características se sugiere que son cepas probióticas y por lo tanto dichos microorganismos se utilizaron en las pruebas de potencial probiótico.

La constitución bacteriana cambia con el tipo de alimento consumido por el hospedador. Los piensos ricos en fibra son ricos en celulosa, mientras que los piensos ricos en cereales contienen alto contenido de material almidonado. Esto influye en el tipo de bacterias necesarias para digerir el material consumido en los bovinos (53).

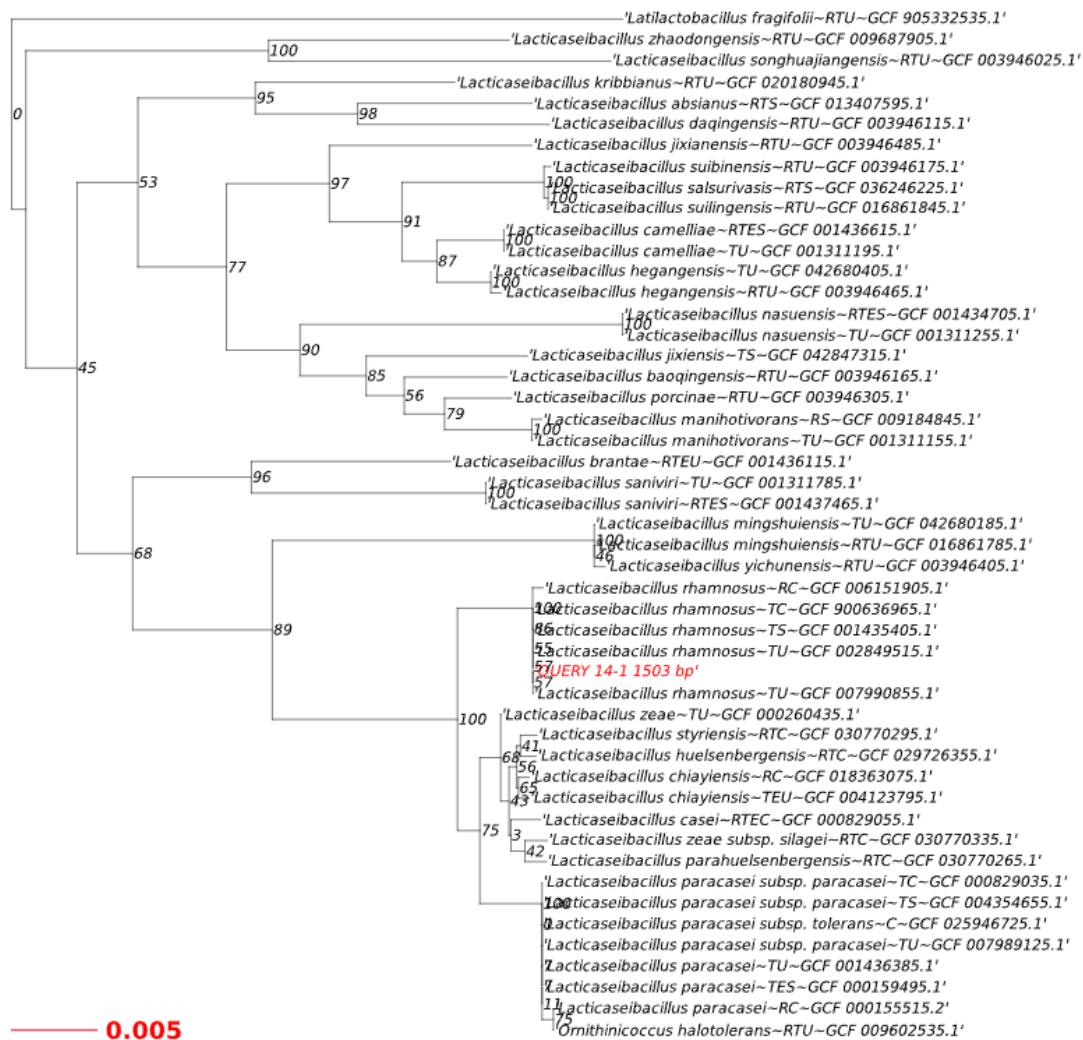


Figura 5. Árbol de distancias filogenéticas (IeBIBI).

En Colombia, se ha reportado el aislamiento y caracterización de *Enterococcus faecium* a partir de materia fecal de terneros Brahman en trópico bajo como cepa probiótica viable para la formulación de un biopreparado para mejorar los parámetros productivos y disminuir trastornos gastrointestinales en terneros (73).

Se ha reportado el aislamiento de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* y *L. casei* en bovinos, su diversidad se puede atribuir a factores ambientales y dietéticos (74).

De materia fecal y cavidad oral de terneros se ha aislado *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus amylovorus*, *Enterococcus faecium* y se ha explorado su capacidad probiótica (8).

Un estudio en terneros machos *Bos Taurus* en condiciones de pastizales en México identificó un total de 17 filos, 24 clases, 33 órdenes, 50 familias, 281 géneros y 297 especies de microorganismos bacterianos, a partir de materia fecal. Dentro de los géneros más abundantes encontraron *Firmicutes* y *Verrucomicrobia* y géneros *Ruminococcaceae* y *Eubacterum* (17).

De manera similar, de muestras fecales de terneros recién nacidos se ha aislado y confirmado a través de la secuenciación de ARNr 16S cepas de *Ligilactobacillus salivarius*. Estas cepas han presentado características que respaldan su potencial probiótico (23).

De materia fecal de novillos Bradford y Brangus, suelo de corrales y raciones de alimento se han obtenido 500 aislados representados por los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella*. Predominando genéticamente *Lactobacillus mucosae* (34%), *Enterococcus hirae* (26%) y *E. faecium-durans* (20%) en materia fecal y suelos de corrales. En raciones de alimento predominó *E. faecium-durans* (46%), *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici* (27%), *Lactobacillus acidophilus* (11%) (16).

Mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S se ha identificado *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium-durans*, *Enterococcus hirae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella hellenica*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus mucosae* y *Lactobacillus plantarum* de materia fecal bovina (16).

Cepas bacterianas aisladas de heces de terneros sanos han sido identificadas mediante secuenciación del gen ARNr 16S y pertenecían a las especies *B. longum*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus paracasei* y *Streptococcus macedonicus* (41).

5.7. Evaluación de las propiedades probióticas

5.7.1. Propiedades de tolerancia al ácido

Una característica importante que permite la función beneficiosa de las cepas probióticas a nivel intestinal es su supervivencia en el ambiente ácido del estómago y su tolerancia a sales biliares (16,41). Las condiciones ácidas fueron toleradas de forma diferente por cada uno de los aislados. Todos pudieron tolerar la exposición ácida a pH de 5.0 y 4.0 (figura 6).

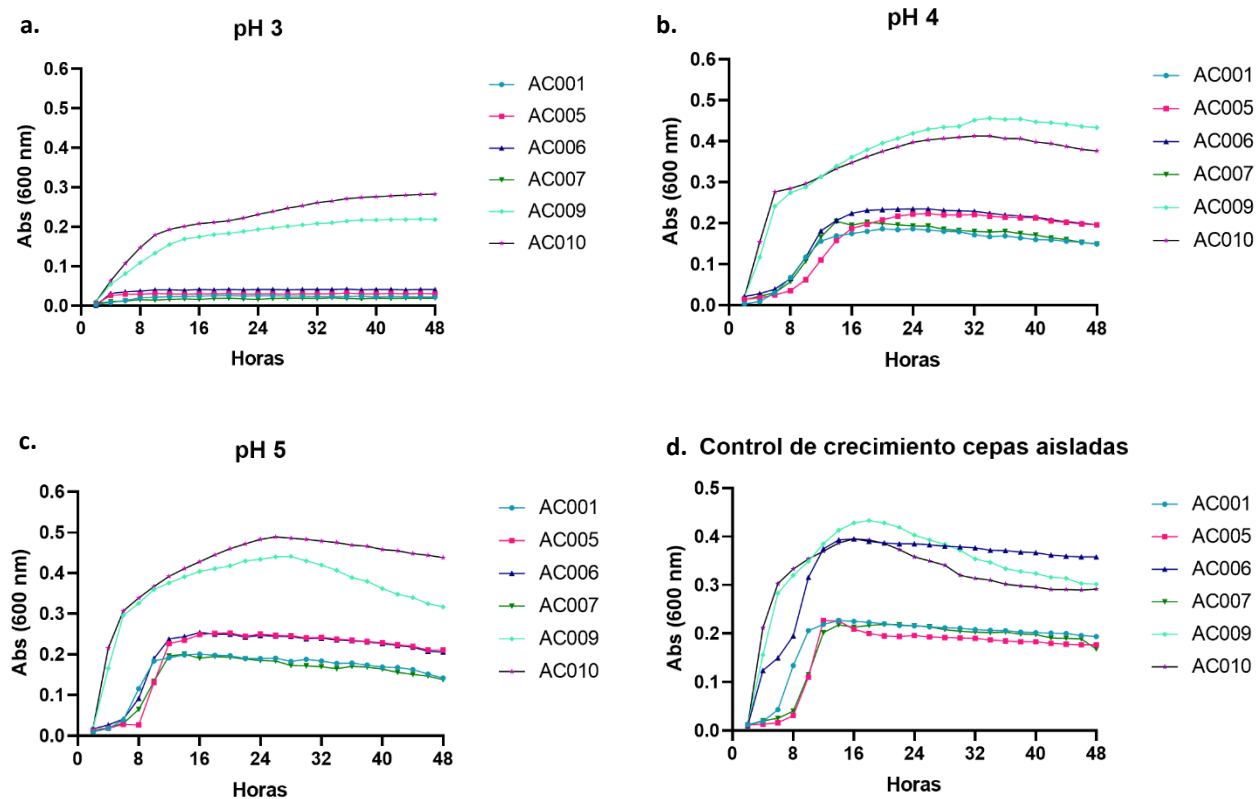


Figura 6. Comportamiento de las cepas aisladas expuestas a pH diferentes por 48 horas.

Las cepas AC009 y AC010 mostraron una mejor capacidad para sobrevivir en condiciones de pH de 3.0 como peor caso establecido en este estudio, toleraron

altamente el ácido y podrían sobrevivir en el jugo gástrico; también mostraron un mejor comportamiento respecto a las demás cepas con un pico máximo de DO_{600nm} de 0.456 (pH 4.0), 0.441 (pH 5.0) y 0.413 (pH 4.0), 0.489 (pH 5.0) respectivamente ($P < 0.05$).

Estas cepas poseen una mayor resistencia al estrés ácido, permitiéndoles mantener un crecimiento más prolongado y alcanzar una DO final superior, a pesar de reflejar una tasa de multiplicación menor, con velocidad específica de crecimiento de 0.523 y 0.593 μ (h^{-1}) y un tiempo de duplicación 1.1 y 1.3 respectivamente, comparado con las cepas AC005 y AC006 (Ver tabla 4).

Las cepas AC001, AC009 y AC010 mostraron un perfil de crecimiento más estable en las 3 concentraciones de pH evaluadas, con velocidad específica de crecimiento (μ) superiores y tiempos de duplicación consistentes, lo que denota una mayor adaptación a condiciones de pH moderadamente ácidas.

Tabla 5. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) de las cepas aisladas sometidas a pH de 3.0, 4.0 y 5.0.

pH	Control		3.0		4.0		5.0	
Cepa	μ (h^{-1})	t_d	μ (h^{-1})	t_d	μ (h^{-1})	t_d	μ (h^{-1})	t_d
AC001	0.325	2.1	0.309	2.2	0.404	1.7	0.326	2.1
AC005	0.293	2.3	0.936	0.7	0.211	3.3	0.292	2.3
AC006	0.302	2.2	1.717	0.4	0.222	3.1	0.284	2.4
AC007	0.265	2.6	0.147	4.7	0.243	2.8	0.286	2.4
AC009	0.522	1.3	0.523	1.3	0.436	1.5	0.455	1.5
AC010	0.807	0.8	0.593	1.1	0.669	1.0	0.696	0.9

Aunque las cepas AC005 y AC006 mostraron una mayor velocidad específica de crecimiento (μ) mayor y un tiempo de duplicación (t_d) reducido a un pH de 3.0, sus valores de DO final fueron menores en comparación con otras cepas que presentaron menores tasas de crecimiento. Esto se explica considerando que la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación reflejan la rapidez con que las células se dividen

durante la fase exponencial, pero no refleja la biomasa máxima que la población pueda alcanzar bajo ciertas condiciones específicas.

En ambientes ácidos (pH 3.0) AC005 y AC006 se multiplican rápidamente durante las primeras etapas del crecimiento debido a mecanismos adaptativos que favorecen la proliferación inicial. Sin embargo, la acidez prolongada podría restringir la viabilidad celular y el crecimiento sostenido, resultando en una menor biomasa acumulada.

El pH ruminal es de 5.8 a 6.2 y el del abomaso puede llegar a ser tan bajo como 3.0 y las cepas probióticas deben sobrevivir a esas condiciones (16). La capacidad de los probióticos para tolerar un pH bajo es la base para la selección de cepas con potencial probiótico. Se demostró que al ser residentes de la microbiota nativa en bovinos, los aislados pudieron soportar condiciones de estrés ácido a nivel intestinal (9,16).

Se ha reportado que *L. animalis* SB310 muestra resistencia a la exposición a pH de 3.0 y *Bifidobacterium longum* muestra una resistencia muy pobre a condiciones de digestión gástrica e intestinal artificial (41).

Las bacterias ácido-lácticas se clasifican como homofermentativas y heterofermentativas; ambos tipos están adaptados a entornos de pH bajo, aunque la resistencia al ácido varía entre especies y cepas. Estos microorganismos suelen enfrentarse a un pH bajo estable o a un estrés ácido repentino y transitorio a través de diversos mecanismos que incluyen vías metabólicas centrales, la bomba de protones, los cambios en la composición de la membrana celular y la densidad celular, la reparación de daños en el ADN y las proteínas, así como los procesos de neutralización (75).

Se ha demostrado que *Lactobacillus casei* exhibe mayores niveles intracelulares de aspartato y arginina en el ambiente ácido, durante el estrés ácido, el aspartato mejora el flujo de metabolitos hacia la biosíntesis de arginina. Esto indica que la arginina y el aspartato están relacionados con la regulación de la resistencia al ácido de las cepas (75).

Por otro lado, la fermentación maloláctica realizada por *Lactobacillus* y *Leuconostoc* es una descarboxilación de L-malato para producir ácido láctico, liberando en el proceso CO₂, que neutraliza los protones y disminuye su concentración, mejorando la capacidad de supervivencia a un entorno de bajo pH (75).

5.7.2. Propiedades de tolerancia a la bilis

Los probióticos deben sobrevivir a las complejas condiciones del tracto gastrointestinal y para ello deben ser capaces de soportar las concentraciones de sales biliares en el estómago e intestino (9). Las sales biliares funcionan como un detergente biológico que emulsiona y solubiliza los lípidos, por lo que le confiere una propiedad antimicrobiana a través de la disolución de las membranas bacterianas (76).

Es deseable que las cepas probióticas tengan la capacidad de hidrolizar las sales biliares, ya que la desconjugación de estas sales libera aminoácidos que puede utilizar como fuente de carbono, nitrógeno y energía, ya que la glicina se puede metabolizar a amoníaco y CO₂ y la taurina a amoníaco, CO₂ y sulfato (76).

Los resultados demuestran, que exposición de los aislados a una concentración creciente de sales biliares no afectó considerablemente su crecimiento (Ver figura 7). La cepa AC009 y AC010 tuvieron un comportamiento similar al grupo control > 0.300 DO_{600nm} cuando fueron expuestas a sales biliares al 1% durante 48 horas. De hecho, ambas cepas alcanzaron la fase exponencial mucho más rápido (en 8 horas de cultivo) respecto el grupo control (entre 8 y 16 horas).

Al ser cepas nativas aisladas de intestino, las bacterias tuvieron que estar constantemente expuestas a sales biliares, por lo que al parecer concentraciones del 1% no afectaron su crecimiento. La tolerancia a las sales biliares es una propiedad fundamental que determina la capacidad de las cepas probióticas para establecerse en el intestino (9).

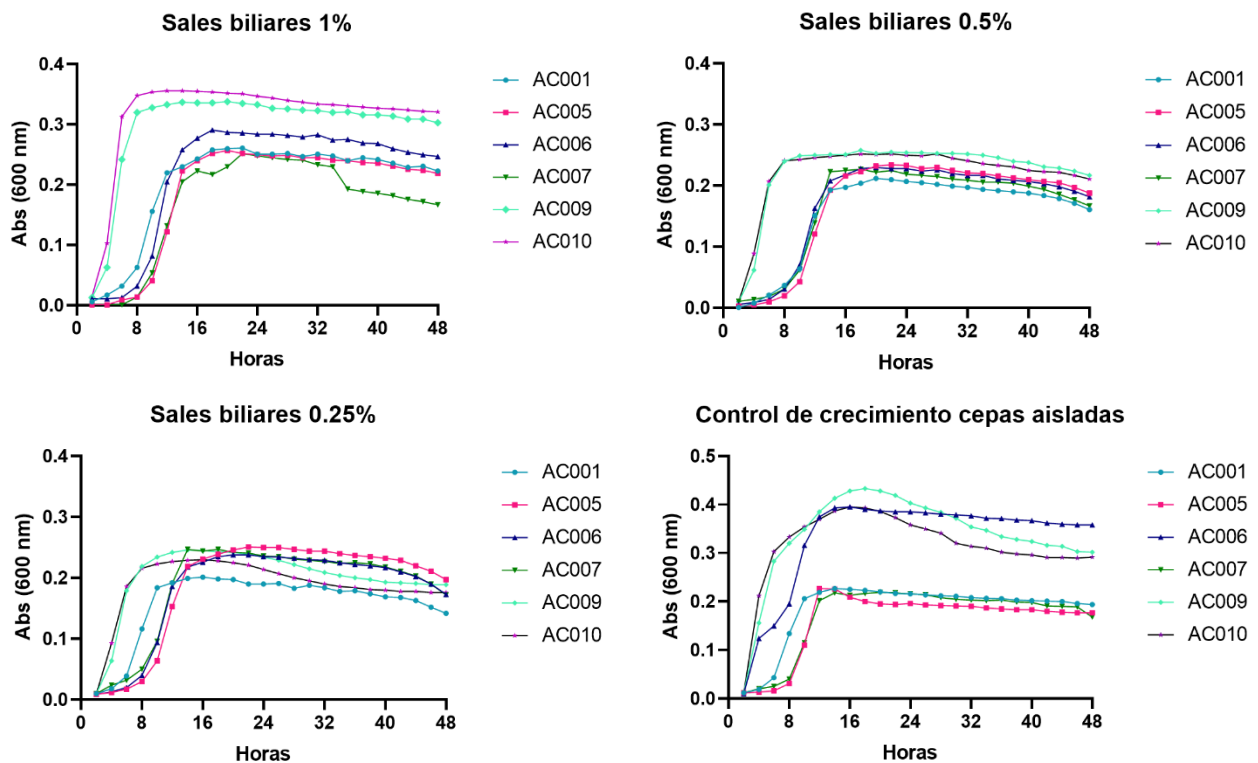


Figura 7. Comportamiento de las cepas aisladas expuestas a diferentes concentraciones de sales biliares por 48 horas.

En general todas las cepas mantienen o incluso aumentan ligeramente su velocidad específica de crecimiento (μ) en presencia de sales biliares al 1%, especialmente AC005 y AC007 que muestran incrementos notables (de 0.293 a 0.513 h^{-1} y de 0.265 a 0.645 h^{-1} , respectivamente). Así mismo el tiempo de duplicación (t_d) se reduce en concentraciones altas de sales biliares al 1%, indicando que los microorganismos se dividen más rápido bajo esta condición (Ver tabla 5).

Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) de las cepas aisladas evaluadas en sales biliares al 1%, 0.5% y 0.25%.

Bilis	Control		1%		0.5%		0.25%	
	μ (h^{-1})	t_d	μ (h^{-1})	t_d	μ (h^{-1})	t_d	μ (h^{-1})	t_d
AC001	0.325	2.1	0.362	1.9	0.407	1.7	0.384	1.8
AC005	0.293	2.3	0.513	1.3	0.379	1.8	0.312	2.2
AC006	0.302	2.2	0.392	1.7	0.353	1.9	0.311	2.2
AC007	0.265	2.6	0.645	1.0	0.321	2.1	0.266	2.6

AC009	0.522	1.3	0.548	1.2	0.536	1.2	0.514	1.3
AC010	0.807	0.8	0.760	0.9	0.758	0.91	0.731	0.9

A concentraciones más bajas de sales biliares (0.5% y 0.25%), las cepas muestran valores de μ y t_d cercanos o ligeramente menores que el control, lo que sugiere que estas concentraciones no afectan negativamente el crecimiento o incluso podrían favorecerlo.

Se ha reportado que la suplementación con factores de crecimiento específicos como bilis de buey favorecerá el crecimiento de lactobacilos (64). Esto es consistente con los resultados de este estudio, las cepas aisladas mostraron un crecimiento más rápido en presencia de sales biliares comparado con el control.

En un estudio dos aislados crecieron significativamente más rápido con una concentración de bilis al 1%, en comparación con otros, lo que indica su mayor tolerancia a sales biliares. Otros aislados han mostrado resistencia a la bilis en una concentración del 0.3% (62).

También, otras investigaciones evaluaron concentraciones de sales biliares de 0.1%, 0.25% y 0.5% (16), 0,3% (9,23,41), 0.3%, 0.4% y 0.5% (58) y demostraron que las cepas aisladas fueron resistentes.

En estudios previos se ha demostrado la tolerancia a concentraciones de sales biliares de *L. animalis* SB310 y *L. paracasei* subsp. *Paracasei* SB137, *Lactococcus lactis*, *L. salivarius* ya que la exposición no causó una disminución significativa de su viabilidad (8,23,41). Y se ha reportado que *L. fermentum* ha sido intolerante a concentraciones de sales biliares de 0.5% (9).

5.7.3. Prueba de actividad hemolítica

Por medio de esta prueba se determinó la naturaleza no patógena de los 6 aislados seleccionados, lo que confirma su seguridad para ser utilizados en una preparación probiótica (Ver figura 8). La actividad no hemolítica se considera un prerrequisito para la selección de probióticos (9).

Estudios previos reportan que las cepas *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus equi* han sido γ -hemolíticas y por lo tanto son seguras (58). También que las cepas *L. salivarius*, *L. agilis*, *L. reuteri*, *L. mucosae* y *L. acidophilus* muestran propiedades no hemolíticas (9,23).

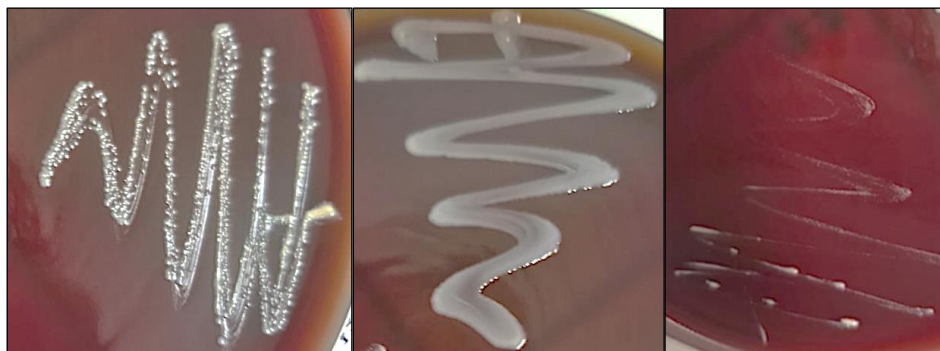


Figura 8. Colonias aisladas sembradas en agar sangre. Los aislados mostraron una naturaleza no hemolítica. Fuente: Figura propia.

5.7.4. Ensayo actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas es importante en el proceso de selección de probióticos potenciales (9,40). Las bacterias ácido-lácticas son capaces de producir compuestos con efectos antimicrobianos como ácidos orgánicos, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno contra diversos patógenos (9,16,62).

La producción de compuestos antimicrobianos es una de las características fundamentales para que los probióticos compitan con los patógenos y los excluyan, para finalmente sobrevivir en el tracto intestinal y expresar efectos probióticos en el hospedero (62).

Los ácidos orgánicos como el ácido láctico induce un microambiente local que no es favorable para el crecimiento de patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. El ácido láctico se sintetiza principalmente mediante la vía glucolítica en condiciones anaeróbicas, y este compuesto puede elaborarse a partir de azúcares como pentosas y hexosas (32).

Los principales patógenos capaces de causar diarrea en terneros son las bacterias *S. enterica* y *E. coli*. Por lo tanto, la actividad antimicrobiana de los aislados seleccionados se evaluó contra dichos microorganismos.

Los ensayos de inhibición del crecimiento por difusión en agar demostraron que todos los aislados tuvieron actividad antimicrobiana. Con respecto al control, la formación de halos de inhibición fue superior en 15 mm (Ver tabla 6).

Tabla 7. Actividad inhibitoria de los aislados.

Código	<i>E. coli</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>
AC001	16 ± 0.58	18 ± 0.58	17 ± 0.58
AC005	15 ± 0.00	13 ± 0.58	16 ± 0.58
AC006	20 ± 0.58	15 ± 1.73	20 ± 0.58
AC007	21 ± 0.58	22 ± 0.58	20 ± 0.58
AC009	17 ± 0.58	20 ± 0.00	18 ± 0.58
AC010	19 ± 0.58	21 ± 0,58	19 ± 0.58

Los valores son la media ± DE de tres determinaciones independientes (n=3) de cada muestra.

En este estudio todos los aislados mostraron actividad antimicrobiana debido a la formación de halos de inhibición frente a la exposición a microorganismos patógenos *E. coli* K99, *S. typhimurium* y *S. dublin* (Ver figura 9).

Estos resultados son consistentes con otras investigaciones, en donde se ha demostrado la actividad antimicrobiana de aislados de *Lactobacillus* frente a bacterias patógenas como *E. coli* y *Salmonella* (62). Así mismo se ha demostrado la actividad inhibitoria contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium* de *L. paracasei* y *L. animalis* (41).

Otros estudios han demostrado que la acumulación de peróxido de hidrógeno por bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus mucosae* en las suspensiones celulares es eficaz para reducir las células viables de patógenos (16).

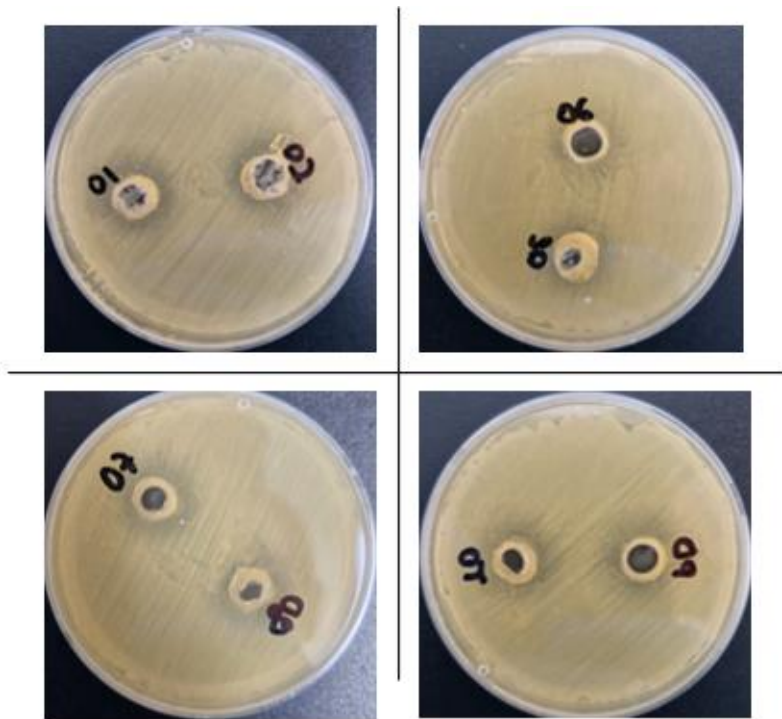


Figura 9. Actividad inhibitoria de los aislados bacterianos obtenidos frente a microorganismos patógenos. Fuente: Figura propia.

En el futuro se podrían realizar estudios en modelos animales para determinar el potencial probiótico *in vivo* de las cepas seleccionadas. Así mismo se puede evaluar el desempeño de la producción de ácidos orgánicos de LAB en la inhibición de microorganismos patógenos sobre piensos fermentados.

5.7.5. Prueba de sensibilidad a antibióticos

La susceptibilidad de los aislados a los antibióticos es otro criterio a evaluar para comprender la seguridad de los probióticos y al mismo tiempo guiar la terapia antimicrobiana (9). La transferencia de genes de resistencia a los antibióticos es una preocupación de seguridad del uso del probiótico, por lo tanto, se debe valorar (40).

Los resultados de la prueba de sensibilidad a los antibióticos se describen en la tabla 7.

Tabla 8. Perfil de sensibilidad a antibióticos (zona de inhibición en mm) de los aislamientos seleccionados.

Antibiótico (cantidad en disco)	AC001	AC005	AC006	AC007	AC008	AC009	AC010
Ampicilina (AMC 20/10 µg)	S (25)	S (24)	S (24)	S (23)	S (22)	S (40)	S (40)
Ceftriaxona (CRO 30 µg)	R (7)	R (0)	R (0)	R (0)	R (8)	I (20)	I (19)
Cefazolina (KZ 30 µg)	R (13)	I (17)	I (20)	I (18)	R (14)	S (21)	I (15)
Ciprofloxacina (CIP 5 µg)	S (30)	S (36)	S (34)	S (38)	S (36)	S (27)	S (32)
Cefoxitin (FOX 30 µg)	I (18)	I (15)	I (16)	I (15)	I (18)	S (40)	S (20)
Eritromicina (E 15 µg)	S (25)	S (24)	S (24)	S (23)	S (22)	S (40)	S (40)
Imipenem (IMP 10µg)	S (40)	S (43)	S (45)	S (42)	S (50)	S (40)	S (40)
Levofloxacina (LEV 5 µg)	S (30)	S (35)	S (36)	S (38)	S (38)	S (30)	S (39)
Penicilina (P 10 UI)	I (18)	I (19)	I (16)	I (15)	I (17)	S (30)	S (34)
Tetraciclina (TE 30 µg)	R (13)	R (12)	R (11)	R (12)	I (15)	S (40)	S (20)
Ampicilina (AM 10 µg)	S (25)	S (26)	S (23)	S (22)	S (23)	S (38)	S (30)

R (≤ 15 mm); I (15-20 mm); S (≥ 20 mm)

Estos resultados indican que, que las cepas AC009 y AC010 no mostraron resistencia a los 11 antibióticos evaluados de los grupos β -lactámicos y quinolonas, tetraciclinas. Todos los aislados fueron sensibles a Ampicilina, Ciprofloxacina, Eritromicina, Imipenem, Levofloxacina y Ampicilina. Las cepas AC001, AC005, AC006, AC007 y AC008 fueron resistentes a Ceftriaxona (Ver tabla 6).

Los resultados de este estudio son consistentes con otras investigaciones en referencia a la resistencia a las tetraciclinas, lo que sugiere una creciente presión antibiótica causada por el amplio uso de este medicamento en medicina veterinaria, que contribuye a la resistencia en las bacterias intestinales de bovinos (9,77).

Por otro lado, se ha reportado la resistencia de bifidobacterias aisladas de tracto gastrointestinal de terneros a amikacina, apramicina, sulfato de colistina, flumequina, ácido nalidíxico y sulfametoxazol, gentamicina, neomicina y estreptomina (42). No es

deseable usar cepas bacterianas resistentes a los antibióticos como probióticos para evitar la transferencia de elementos de resistencia genética a la microbiota intestinal (62).

6. Conclusiones

Las bacterias ácido-lácticas autóctonas aisladas del tracto intestinal de bovinos Holstein demostraron resistencia a condiciones gastrointestinales, capacidad antimicrobiana y seguridad biológica, considerándose como candidatos probióticos con beneficios frente a la salud intestinal y la prevención de diarreas.

El aislamiento de seis cepas de bacterias ácido-lácticas (LAB) nativas del tracto intestinal bovino, particularmente las cepas AC009 y AC010, representa un avance relevante para el desarrollo de probióticos específicos de hospedador. Las cepas autóctonas poseen una mayor capacidad de adaptación al ambiente intestinal de los bovinos, lo que favorece su supervivencia, colonización y persistencia en el intestino, elementos clave para mantener un equilibrio microbiano saludable y prevenir desórdenes gastrointestinales.

Los aislados inhibieron el crecimiento de *E. coli* K99, *S. typhimurium* y *S. dublin*, principales agentes etiológicos de la diarrea neonatal en terneros. Los halos de inhibición de hasta 21 mm evidencian la producción de metabolitos antimicrobianos (ácido láctico, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno) capaces de controlar bacterias patógenas intestinales. En la práctica, esto sugiere que la administración de estas cepas puede disminuir la incidencia, duración y severidad de los cuadros diarreicos, reduciendo la necesidad de tratamientos antibióticos.

Por sus propiedades fisiológicas y funcionales, las cepas seleccionadas pueden contribuir a estabilizar la microbiota intestinal y favorecer bacterias benéficas, reducir la colonización por patógenos entéricos causantes de diarreas infecciosas, mejorar la digestibilidad y aprovechamiento de nutrientes, especialmente en periodos de estrés digestivo o destete y disminuir el uso profiláctico de antibióticos, promoviendo una producción más sostenible y segura.

Los resultados demuestran que el aislamiento de LAB nativas de bovinos Holstein en trópico alto es factible y que estas cepas poseen características deseables como tolerancia al ácido y bilis, seguridad y capacidad antimicrobiana. En particular, las cepas

AC009 y AC010 reúnen los atributos más sobresalientes, posicionándolas como candidatas prometedoras para el desarrollo de biopreparados probióticos orientados a mejorar la salud intestinal y la productividad en bovinos.

7. Recomendaciones

Se requieren estudios futuros a mayor escala en donde se amplie el número de muestras y número de animales para aumentar la representatividad de los resultados. También se podría considerar una secuenciación de genoma completo de las cepas seleccionadas para confirmar identidad y descartar genes de resistencia.

Adicionalmente, dado que la caracterización fue principalmente *in vitro*, el siguiente paso con las cepas que mostraron potencial probiótico debería ser la evaluación en modelos animales midiendo parámetros de salud intestinal, respuesta inmune y productividad (efecto sobre diarreas y ganancia de peso).

Por otra parte, se podría considerar el uso de estos aislados como principio activo en la formulación de un producto biotecnológico para bovinos Holstein de trópico alto, realizando un análisis de viabilidad de las cepas en diferentes formas de administración (piensos, suplementos líquidos y liofilizados) y su capacidad de mantenerse vivas en diversas condiciones de almacenamiento.

El uso de probióticos nativos puede convertirse en un sello de calidad diferenciada en ganaderías sostenibles que proporcionen un valor agregado sobre los animales o subproductos como carne y leche. Los resultados abren la puerta a reducir el uso de antibióticos como promotores de crecimiento y utilizar probióticos en bovinos, alineándose esta práctica con políticas de inocuidad y producción sostenible a nivel mundial.

8. Apropiación Social del Conocimiento y/o publicaciones

Los resultados de este estudio contribuyen al fortalecimiento del conocimiento científico aplicado en el ámbito de la salud y nutrición animal, particularmente en sistemas productivos lecheros de trópico alto. Aporta conocimiento valioso para el sector ganadero, en especial para los productores lecheros de la región de Simijaca - Cundinamarca, Colombia, al demostrar el potencial probiótico de bacterias nativas como alternativas seguras y sostenibles frente al uso de antibióticos.

La caracterización de bacterias ácido-lácticas nativas con potencial probiótico constituye una alternativa innovadora frente al uso de antibióticos, lo cual reviste especial importancia para la sostenibilidad de la producción bovina y la inocuidad de los alimentos derivados. Abre oportunidades para desarrollar bioproductos locales que fortalezcan la competitividad del sector y por lo tanto haya alternativas para mejorar la salud intestinal y el rendimiento productivo de los bovinos de raza Holstein.

La transferencia de este conocimiento hacia asociaciones ganaderas permitirá generar prácticas de manejo más seguras, responsables y alineadas con las políticas nacionales e internacionales de reducción en el uso de antimicrobianos lideradas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH).

Asimismo, los hallazgos obtenidos constituyen una base científica sólida para la implementación de prácticas de manejo más responsables con la salud animal, la seguridad alimentaria y el bienestar del consumidor, contribuyendo de manera directa a la innovación y al mejoramiento de la productividad del sector agropecuario en Colombia.

Bibliografía

1. Fedegán. Documentos de estadística | Fedegán. [cited 2024 Nov 10]. Available from: <https://www.fedegan.org.co/estadisticas/documentos-de-estadistica>
2. Fedegán. Inventario ganadero | Fedegán. 2024 [cited 2025 Apr 18]. Available from: <https://www.fedegan.org.co/estadisticas/inventario-ganadero>
3. Fedegán. Producción. [cited 2024 Nov 10]. Available from: <https://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>
4. Janse MEM, Zinkweg DB, Larsen OFA, van de Burgwal L. Innovations in the veterinary intestinal health field: A patent landscape analysis. *One Health*. 2022;15:100419.
5. Urie NJ, Lombard JE, Shivley CB, Koprak CA, Adams AE, Earleywine TJ, et al. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. *J Dairy Sci*. 2018 Oct 1;101(10):9229–44.
6. Steele MA, Penner GB, Chaucheyras-Durand F, Guan LL. Development and physiology of the rumen and the lower gut: Targets for improving gut health. *J Dairy Sci*. 2016 Jun 1;99(6):4955–66.
7. Guo W, Bi SS, Wang WW, Zhou M, Neves ALA, Degen AA, et al. Maternal rumen and milk microbiota shape the establishment of early-life rumen microbiota in grazing yak calves. *J Dairy Sci*. 2023 Mar 1;106(3):2054–70.
8. Maldonado NC, de Ruiz CS, Otero MC, Sesma F, Nader-Macías ME. Lactic acid bacteria isolated from young calves: Characterization and potential as probiotics. *Res Vet Sci*. 2012 Apr 1;92(2):342–9.
9. Singh A, Kumar S, Vinay V, Tyagi B, Choudhury PK, Rashmi HM, et al. Autochthonous *Lactobacillus* spp. isolated from Murrah buffalo calves show potential application as probiotic. 2021 [cited 2024 May 1]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.04.002>
10. Renaud DL, Kelton DF, Weese JS, Noble C, Duffield TF. Evaluation of a multispecies probiotic as a supportive treatment for diarrhea in dairy calves: A randomized clinical trial. *J Dairy Sci*. 2019 May 1;102(5):4498–505.

11. Wang H, Yu Z, Gao Z, Li Q, Qiu X, Wu F, et al. Effects of compound probiotics on growth performance, rumen fermentation, blood parameters, and health status of neonatal Holstein calves. *J Dairy Sci.* 2022 Mar 1;105(3):2190–200.
12. Liu H, Yan C, Hao C, Wang D, Liu Y, Luo ZB, et al. Dynamic changes in intestinal microbiota and metabolite composition of pre-weaned beef calves. *Microb Pathog.* 2023 Feb 1;175:105991.
13. Siabato AMM, Gaona RC, Terranova OMV. Prevalencia de patógenos asociados al síndrome de diarrea neonatal bovina en el Valle del Cauca (Colombia). *Acta Agron.* 2022 [cited 2024 Nov 10];71(3):320–6. Available from: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/100006
14. Caliskan M, Dabak M, Tumer KC. The relationship between serum cytokine profile and vitamin D in calves with neonatal diarrhea. *Cytokine.* 2023 May 1;165:156173.
15. Carter HSM, Steele MA, Costa JHC, Renaud DL. Evaluating the effectiveness of colostrum as a therapy for diarrhea in preweaned calves. *J Dairy Sci.* 2022 Dec 1 [cited 2025 Nov 3];105(12):9982–94. Available from: <https://www.sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S002203022200618X>
16. Maldonado NC, Ficooseco CA, Mansilla FI, Melián C, Hébert EM, Vignolo GM, et al. Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. *Livest Sci.* 2018 Jun 1;212:99–110.
17. Pacheco-Torres I, García-De la Peña C, Meza-Herrera CA, Vaca-Paniagua F, Díaz-Velásquez CE, Méndez-Catalá CF, et al. Explorando la microbiota bacteriana fecal bovina en la Reserva de la Biosfera de Mapimí, norte de México. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2022 Oct 1 [cited 2024 May 1];13(4):910–27. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242022000400910&lng=es&nrm=iso&tlng=es
18. Anee IJ, Alam S, Rowshan A, Begum R, Md S, Khandaker AM. The role of probiotics on animal health and nutrition. *The Journal of Basic and Applied Zoology* 2021 82:1. 2021 Oct 29 [cited 2023 Nov 12];82(1):1–16. Available from: <https://basicandappliedzoology.springeropen.com/articles/10.1186/s41936-021-00250-x>

19. Dar AH, Singh SK, Rahman JU, Ahmad SF. The effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and/or prebiotic mannan oligosaccharides on growth performance, nutrient utilization, blood metabolites, faecal bacteria, and economics of crossbred calves. *Iran J Vet Res.* 2022 [cited 2023 Nov 9];23(4):322. Available from: [/pmc/articles/PMC9984140/](#)
20. Cho Y il, Yoon KJ. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci.* 2014 [cited 2024 Feb 21];15(1):1. Available from: [/pmc/articles/PMC3973752/](#)
21. Zhang Y, Choi SH, Nogoy KM, Liang S. Review: The development of the gastrointestinal tract microbiota and intervention in neonatal ruminants. *Animal.* 2021 Aug 1;15(8):100316.
22. Lambo MT, Chang X, Liu D. The Recent Trend in the Use of Multistrain Probiotics in Livestock Production: An Overview. *Animals (Basel).* 2021 Oct 1 [cited 2023 Nov 10];11(10). Available from: [/pmc/articles/PMC8532664/](#)
23. Kumar S, Kumar B, Chouraddi R, Bhatia M, Rashmi HM, Vishnu Behare P, et al. In vitro screening for potential probiotic properties of *Ligilactobacillus salivarius* isolated from cattle calves. *Curr Res Biotechnol.* 2022 Jan 1;4:275–89.
24. Du W, Wang X, Hu M, Hou J, Du Y, Si W, et al. Modulating gastrointestinal microbiota to alleviate diarrhea in calves. *Front Microbiol.* 2023 [cited 2024 Apr 4];14. Available from: [/pmc/articles/PMC10286795/](#)
25. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet.* 2022 Feb 12 [cited 2024 Apr 4];399(10325):629–55. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673621027240/fulltext>
26. Ellis JL, Bannink A, Hindrichsen IK, Kinley RD, Pellikaan WF, Milora N, et al. The effect of lactic acid bacteria included as a probiotic or silage inoculant on in vitro rumen digestibility, total gas and methane production. *Anim Feed Sci Technol.* 2016 Jan 1;211:61–74.
27. El Jeni R, Villot C, Koyun OY, Osorio-Doblado A, Baloyi JJ, Lourenco JM, et al. Invited review: “Probiotic” approaches to improving dairy production: Reassessing “magic foo-foo dust.” *J Dairy Sci.* 2024 Apr 1 [cited 2024 May 2];107(4):1832–56.

- Available from:
<http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030223007907/fulltext>
28. Barreto MO, Soust M, Moore RJ, Olchoway TWJ, Alawneh JI. Systematic review and meta-analysis of probiotic use on inflammatory biomarkers and disease prevention in cattle. *Prev Vet Med.* 2021 Sep 1 [cited 2025 Aug 17];194:105433. Available from: <https://www.sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S016758772100177X>
 29. Zommiti M, Ferchichi M. Probiotics and Prebiotics in Animal Feed. *Probiotics and Prebiotics in Foods: Challenges, Innovations, and Advances.* 2021 Jan 1;233–61.
 30. Branco-Lopes R, Bernal-Córdoba C, Valldecabres A, Winder C, Canozzi ME, Silva-del-Río N. Characterization of controlled trials on probiotic supplementation to dairy calves: A scoping review. *J Dairy Sci.* 2023 Aug 1;106(8):5388–401.
 31. Zeineldin M, Barakat R, Elolimy A, Salem AZM, Elghandour MMY, Monroy JC. Synergetic action between the rumen microbiota and bovine health. *Microb Pathog.* 2018 Nov 1;124:106–15.
 32. Punia Bangar S, Suri S, Trif M, Ozogul F. Organic acids production from lactic acid bacteria: A preservation approach. *Food Biosci.* 2022 Apr 1 [cited 2025 Sep 9];46:101615. Available from: <https://www.sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S2212429222000748>
 33. Salahlou M, Hajimohammadi A, Nazifi S, Rowshan-Ghasrodashti A, Nikzad M, Mirzaei A. Effects of probiotic and yeast extract supplement on liver functionality index and metabolic parameters in transition period of dairy cattle. *The Veterinary Journal.* 2025 Feb 1 [cited 2025 Aug 17];309:106280. Available from: <https://www.sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S1090023324002193>
 34. Shuyao Z, Shuhao B, Liangliang L, Mudassar I, Faisal AK, Abdul AF, et al. Current Insights into Neonatal Calf Diarrheal Etiology and the Therapeutic Role of Probiotics. *J Integr Agric.* 2025 Jul 29 [cited 2025 Jul 28]; Available from: <https://www.sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S2095311925002084>

35. Frizzo LS, Zbrun M V., 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 Nov 3;169(3–4):147–56.
36. Bunešová V, Domig KJ, Killer J, Vlková E, Kopečný J, Mrázek J, et al. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe*. 2012 Feb 1;18(1):166–8.
37. Ali M, Xu C, Hina Q, Li A, Li K. Interrelations Between Probiotics, Gut Microbiota, Intestinal Barrier, and Immune Response; Focusing on Diarrhea in Dairy Calves1. *J Integr Agric*. 2024 May 16;
38. Eyre KE, Pan L, Harper K, Prada e Silva LF. The effect of a *Bacillus*-based probiotic on feed intake and digestibility of a forage and a feedlot diet in *Bos indicus* steers. *Vet Anim Sci*. 2025 Sep 1 [cited 2025 Aug 17];29:100463. Available from: <https://www-sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S2451943X25000390>
39. Alawneh JI, Barreto MO, Moore RJ, Soust M, Al-harbi H, James AS, et al. Systematic review of an intervention: the use of probiotics to improve health and productivity of calves. *Prev Vet Med*. 2020 Oct 1;183:105147.
40. Pei L, Yang H, Qin S, Yan Z, Zhang H, Lan Y, et al. Isolation and Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Strains From Healthy Equines for Potential Use in Salmonella Infection. *J Equine Vet Sci*. 2021 Jan 1;96:103312.
41. Ripamonti B, Agazzi A, Bersani C, De Dea P, Pecorini C, Pirani S, et al. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*. 2011 Jun 1;17(3):97–105.
42. Vlková E, Rada V, Popelářová P, Trojanová I, Killer J. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. *Livest Sci*. 2006 Dec 1 [cited 2025 Aug 19];105(1–3):253–9. Available from: <https://www-sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S1871141306001429>
43. Varada VV, Kumar S, Tyagi N, Tyagi AK. Effects of compound lyophilized probiotics on selected faecal microbiota, immune response, and antioxidant status in newborn buffalo calves. *Curr Res Biotechnol*. 2022 Jan 1;4:493–502.

44. Liang Y, Hudson RE, Ballou MA. Supplementing neonatal Jersey calves with a blend of probiotic bacteria improves the pathophysiological response to an oral *Salmonella enterica* serotype Typhimurium challenge. *J Dairy Sci.* 2020 Aug 1;103(8):7351–63.
45. Cangiano LR, Yohe TT, Steele MA, Renaud DL. Invited Review: Strategic use of microbial-based probiotics and prebiotics in dairy calf rearing. *Applied Animal Science.* 2020 Oct 1;36(5):630–51.
46. Cai X, Yi P, Chen X, Wu J, Lan G, Li S, et al. Intake of compound probiotics accelerates the construction of immune function and gut microbiome in Holstein calves. *Microbiol Spectr.* 2024 Apr 22;12(6).
47. Mozzi F. Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Food and Health.* 2016 Jan 1 [cited 2025 Nov 7];501–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472004141>
48. Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, et al. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 May 12 [cited 2025 Nov 7];9:612285. Available from: www.frontiersin.org
49. Onyeaka HN, Nwabor OF. Lactic acid bacteria and bacteriocins as biopreservatives. *Food Preservation and Safety of Natural Products.* 2022;147–62.
50. Jayasree Joshi T, S.V S, Mohan L, Nandagopal P, Arakal JJ. Functional metabolites of probiotic lactic acid bacteria in fermented dairy products. *Food and Humanity.* 2024 Dec 1 [cited 2025 Nov 7];3:100341. Available from: <https://www-sciencedirect-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S2949824424001162>
51. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol.* 2018 [cited 2025 Nov 7];4(4):665. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6613329/>
52. Richard ML, Sokol H. The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*

- 2019 Jun 1 [cited 2024 May 5];16(6):331–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30824884/>
53. Xu Q, Qiao Q, Gao Y, Hou J, Hu M, Du Y, et al. Gut Microbiota and Their Role in Health and Metabolic Disease of Dairy Cow. *Front Nutr*. 2021 Aug 4 [cited 2024 May 5];8. Available from: [/pmc/articles/PMC8371392/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30824884/)
 54. Frizzo LS, Bertozzi E, Soto LP, Sequeira GJ, Rodriguez Armesto R, Rosmini MR. Studies on translocation, acute oral toxicity and intestinal colonization of potentially probiotic lactic acid bacteria administered during calf rearing. *Livest Sci*. 2010 Mar 1 [cited 2025 Aug 30];128(1–3):28–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141309003400>
 55. van Staaveren N, Hyland E, Houlahan K, Lynch C, Miglior F, Kelton DF, et al. Recording of calf diseases for potential use in breeding programs: a case study on calf respiratory illness and diarrhea. *Can J Anim Sci*. 2022 Dec 15 [cited 2025 Nov 3];103(2):192–203. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008398422000143>
 56. Fresno AH, Alencar ALF, Liu G, Wridt MW, Andersen FB, Pedersen HS, et al. Effect of feeding dairy calves with milk fermented with selected probiotic strains on occurrence of diarrhoea, carriage of pathogenic and zoonotic microorganisms and growth performance. *Vet Microbiol*. 2023 Nov 1 [cited 2025 Nov 3];286:109885. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113523002390>
 57. Aydin O, Ulas N, Genc A, Baysal S, Kandemir O, Aktas MS. Investigation of hemogram, oxidative stress, and some inflammatory marker levels in neonatal calves with escherichia coli and coronavirus diarrhea. *Microb Pathog*. 2022 Dec 1 [cited 2025 Nov 3];173:105802. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401022004156>
 58. Pei L, Yang H, Qin S, Yan Z, Zhang H, Lan Y, et al. Isolation and Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Strains From Healthy Equines for Potential Use in Salmonella Infection. *J Equine Vet Sci*. 2021 Jan 1;96:103312.
 59. Helen Shiprah V, Sahu S, Ranjan Thakur A, Ray Chaudhuri S. Screening of Bacteria for Lactic Acid Production from Whey Water. *Am J Biochem Biotechnol*.

- 2013 Jun 20 [cited 2025 Sep 20];9(2):118–23. Available from: <https://thescipub.com/abstract/ajbbbsp.2013.118.123>
60. Somashekaraiah R, Shruthi B, Deepthi B V., Sreenivasa MY. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from neera: A naturally fermenting coconut palm nectar. *Front Microbiol.* 2019 Jun 28 [cited 2025 Sep 20];10(JUN):448547. Available from: www.frontiersin.org
61. Wang H, Guo J, Chen X, He H. The Metabolomics Changes in Luria–Bertani Broth Medium under Different Sterilization Methods and Their Effects on *Bacillus* Growth. *Metabolites.* 2023 Aug 1 [cited 2025 Sep 21];13(8):958. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10456909/>
62. Gupta M, Pattanaik AK, Singh A, Sharma S, Jadhav SE, Kumar A, et al. Functional and probiotic characterization of *Ligilactobacillus salivarius* CPN60 isolated from calf faeces and its appraisal in rats. *J Biosci Bioeng.* 2021 Dec 1 [cited 2025 Sep 9];132(6):575–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/hemeroteca.lasalle.edu.co/science/article/pii/S1389172321002334>
63. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009 Jan 1 [cited 2025 Aug 28];27(1):44–52. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-antimicrobianos-S0213005X08000177>
64. Ozogul F, Yazgan H, Ozogul Y. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus acidophilus*. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Third edition.* 2022 Jan 1 [cited 2025 Aug 29];4:187–97. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128187661000155>
65. Liu X, Kokare C. Microbial Enzymes of Use in Industry. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications.* 2017 Jan 1 [cited 2025 Aug 29];267–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012803725600011X>
66. Ogodo AC, Agwaranze DI, Daji M, Aso RE. Microbial techniques and methods: basic techniques and microscopy. *Analytical Techniques in Biosciences: from*

- Basics to Applications. 2022 Jan 1 [cited 2025 Aug 29];201–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128226544000038>
67. de man, rogosa and sharpe (MRS) agar. *Prog Ind Microbiol*. 2003 Jan 1 [cited 2025 Sep 23];37(C):511–3. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0079635203800668>
 68. Soundharrajan I, Kim D, Kuppusamy P, Muthusamy K, Lee HJ, Choi KC. Probiotic and Triticale Silage Fermentation Potential of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis* and Their Impacts on Pathogenic Bacteria. *Microorganisms*. 2019 Sep 1 [cited 2024 May 2];7(9). Available from: [/pmc/articles/PMC6780645/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3480645/)
 69. Brashears MM, Jaroni D, Trimble J. Isolation, Selection, and Characterization of Lactic Acid Bacteria for a Competitive Exclusion Product To Reduce Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle. *J Food Prot*. 2003 Mar 1 [cited 2025 Dec 6];66(3):355–63. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22030642>
 70. Kumar S, Varada VV, Banakar PS, Tyagi N, Chouraddi R, Hogarehalli Mallapa R, et al. Screening and characterization of Sahiwal cattle calves-origin lactic acid bacteria based on desired probiotic attributes for potential application. *Anim Biotechnol*. 2023 [cited 2025 Dec 6];34(4):1612–25. Available from: [https://www-tandfonline-com.hemeroteca.lasalle.edu.co/doi/pdf/10.1080/10495398.2022.2043885](https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10495398.2022.2043885)
 71. Lin WC, Ptak CP, Chang CY, Ian MK, Chia MY, Chen TH, et al. Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated From Dairy Cow Feces Exhibiting Promising Probiotic Properties and in vitro Antibacterial Activity Against Foodborne Pathogens in Cattle. *Front Vet Sci*. 2020 May 15 [cited 2025 Dec 6];7:532726. Available from: www.frontiersin.org
 72. Soto LP, Frizzo LS, Bertozzi E, Avataneo E, Sequeira GJ, Rosmini MR. Molecular Microbial Analysis of *Lactobacillus* Strains Isolated from the Gut of Calves for Potential Probiotic Use. *Vet Med Int*. 2010 Jan 1 [cited 2025 Dec 6];2010(1):274987. Available from: [/doi/pdf/10.4061/2010/274987](https://doi.org/10.4061/2010/274987)
 73. Arroyo PLC, Hurtado CAB, Pérez EP. Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros Brahman en Sucre, Colombia.

- Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2018 [cited 2024 Apr 24];29(2):438–48. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
74. Abdou AM, Syame SM, Bakry MA, Effat MM, Fouad EA. Isolation and identification of probiotic lactobacilli from ruminant animals. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2024 Apr 1 [cited 2025 Aug 30];23(2):216–22. Available from: https://journals.lww.com/egpj/fulltext/2024/23020/isolation_and_identification_of_probiotic.5.aspx
75. Wang C, Cui Y, Qu X. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Arch Microbiol*. 2018 Mar 1 [cited 2025 Sep 21];200(2):195–201. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-017-1446-2>
76. Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Mar [cited 2025 Sep 2];72(3):1729. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1393245/>
77. Bunešová V, Vlková E, Geigerová M, Rada V. Effect of rearing systems and diets composition on the survival of probiotic bifidobacteria in the digestive tract of calves. *Livest Sci*. 2015 Aug 1;178:317–21.

Anexos

A. Análisis estadístico

Se presentan los resultados del análisis estadístico para cada ensayo, junto con los datos primarios y la DE. $P < 0.05$ significa que el resultado del estudio es estadísticamente significativo, lo que indica que la probabilidad de que el resultado observado sea solo una coincidencia aleatoria es muy baja. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (que postula que no hay diferencia o efecto) en favor de la hipótesis alternativa.

Sales biliares 1%

Horas	AC001	AC005	AC006	AC007	AC009	AC010
2	0.006 ± 0.003	0.001 ± 0.001	0.011 ± 0.005	0.001 ± 0.002	0.013 ± 0.000	0.015 ± 0.001
4	0.017 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.011 ± 0.003	0.001 ± 0.002	0.063 ± 0.002	0.103 ± 0.000
6	0.032 ± 0.002	0.009 ± 0.002	0.013 ± 0.003	0.001 ± 0.001	0.242 ± 0.001	0.313 ± 0.009
8	0.063 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.032 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.320 ± 0.001	0.348 ± 0.003
10	0.156 ± 0.006	0.041 ± 0.004	0.082 ± 0.002	0.054 ± 0.000	0.328 ± 0.001	0.354 ± 0.003
12	0.220 ± 0.005	0.122 ± 0.003	0.205 ± 0.002	0.132 ± 0.001	0.333 ± 0.001	0.356 ± 0.003
14	0.230 ± 0.004	0.223 ± 0.002	0.258 ± 0.002	0.205 ± 0.000	0.337 ± 0.001	0.356 ± 0.002
16	0.243 ± 0.003	0.240 ± 0.002	0.277 ± 0.004	0.223 ± 0.002	0.336 ± 0.001	0.355 ± 0.001
18	0.258 ± 0.002	0.252 ± 0.002	0.291 ± 0.001	0.217 ± 0.003	0.336 ± 0.001	0.354 ± 0.001
20	0.260 ± 0.003	0.257 ± 0.009	0.287 ± 0.003	0.23 ± 0.002	0.338 ± 0.001	0.352 ± 0.001
22	0.261 ± 0.002	0.252 ± 0.002	0.286 ± 0.004	0.252 ± 0.003	0.335 ± 0.001	0.351 ± 0.001
24	0.251 ± 0.003	0.250 ± 0.003	0.284 ± 0.005	0.248 ± 0.001	0.333 ± 0.001	0.347 ± 0.001
26	0.251 ± 0.003	0.248 ± 0.003	0.284 ± 0.003	0.245 ± 0.002	0.327 ± 0.001	0.344 ± 0.003
28	0.252 ± 0.003	0.249 ± 0.003	0.282 ± 0.003	0.242 ± 0.002	0.326 ± 0.001	0.34 ± 0.003
30	0.247 ± 0.003	0.245 ± 0.003	0.279 ± 0.003	0.241 ± 0.000	0.324 ± 0.001	0.337 ± 0.002
32	0.251 ± 0.003	0.245 ± 0.001	0.283 ± 0.005	0.233 ± 0.000	0.323 ± 0.001	0.334 ± 0.002
34	0.248 ± 0.003	0.241 ± 0.001	0.274 ± 0.003	0.23 ± 0.001	0.320 ± 0.006	0.333 ± 0.001
36	0.240 ± 0.003	0.240 ± 0.001	0.275 ± 0.001	0.193 ± 0.001	0.321 ± 0.001	0.331 ± 0.002
38	0.245 ± 0.003	0.237 ± 0.001	0.269 ± 0.003	0.189 ± 0.002	0.316 ± 0.000	0.329 ± 0.002
40	0.242 ± 0.002	0.236 ± 0.002	0.268 ± 0.001	0.186 ± 0.001	0.316 ± 0.001	0.327 ± 0.008
42	0.236 ± 0.003	0.231 ± 0.002	0.260 ± 0.002	0.182 ± 0.001	0.314 ± 0.001	0.326 ± 0.002
44	0.229 ± 0.003	0.226 ± 0.002	0.254 ± 0.002	0.176 ± 0.000	0.309 ± 0.001	0.324 ± 0.002

46	0.231 ± 0.002	0.224 ± 0.002	0.250 ± 0.002	0.172 ± 0.001	0.309 ± 0.001	0.322 ± 0.009
48	0.223 ± 0.002	0.219 v 0.002	0.247 ± 0.001	0.167 ± 0.000	0.303 ± 0.001	0.321 ± 0.001

ANOVA summary	
F	11.11
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.2871

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0.4362	5	0.08724	F (5, 138) = 11.11	P<0.0001
Residual (within columns)	1.083	138	0.007850		
Total	1.520	143			

Sales biliares 0.5%:

Horas	AC001	AC005	AC006	AC007	AC009	AC010
2	0.001 ± 0.003	0.003 ± 0.001	0.006 ± 0.005	0.011 ± 0.004	0.010 ± 0.003	0.010 ± 0.006
4	0.008 ± 0.003	0.005 ± 0.001	0.009 ± 0.005	0.014 ± 0.004	0.062 ± 0.002	0.089 ± 0.003
6	0.021 ± 0.004	0.010 ± 0.001	0.014 ± 0.003	0.019 ± 0.005	0.201 ± 0.003	0.207 ± 0.001
8	0.037 ± 0.006	0.020 ± 0.001	0.030 ± 0.003	0.031 ± 0.006	0.240 ± 0.007	0.241 ± 0.003
10	0.064 ± 0.005	0.043 ± 0.002	0.070 ± 0.004	0.062 ± 0.005	0.249 ± 0.007	0.243 ± 0.003
12	0.151 ± 0.009	0.121 ± 0.006	0.163 ± 0.005	0.139 ± 0.007	0.250 ± 0.001	0.246 ± 0.003
14	0.193 ± 0.011	0.193 ± 0.006	0.208 ± 0.006	0.223 ± 0.007	0.251 ± 0.009	0.248 ± 0.003
16	0.197 ± 0.003	0.216 ± 0.005	0.218 ± 0.005	0.225 ± 0.007	0.251 ± 0.009	0.250 ± 0.007
18	0.204 ± 0.003	0.223 ± 0.005	0.228 ± 0.006	0.227 ± 0.006	0.258 ± 0.009	0.252 ± 0.003
20	0.212 ± 0.003	0.232 ± 0.006	0.230 ± 0.008	0.222 ± 0.004	0.253 ± 0.005	0.251 ± 0.003
22	0.210 ± 0.003	0.234 ± 0.005	0.228 ± 0.001	0.225 ± 0.003	0.255 ± 0.001	0.252 ± 0.003
24	0.207 ± 0.006	0.233 ± 0.005	0.228 ± 0.009	0.219 ± 0.003	0.254 ± 0.006	0.250 ± 0.004
26	0.205 ± 0.006	0.228 ± 0.008	0.224 ± 0.001	0.217 ± 0.006	0.254 ± 0.006	0.249 ± 0.004
28	0.202 ± 0.006	0.230 ± 0.005	0.226 ± 0.004	0.215 ± 0.006	0.253 ± 0.009	0.252 ± 0.004
30	0.199 ± 0.006	0.225 ± 0.006	0.220 ± 0.005	0.211 ± 0.006	0.253 ± 0.009	0.245 ± 0.004

32	0.197 ± 0.003	0.221 ± 0.008	0.217 ± 0.007	0.209 ± 0.003	0.252 ± 0.008	0.241 ± 0.003
34	0.194 ± 0.003	0.220 ± 0.007	0.217 ± 0.006	0.206 ± 0.008	0.250 ± 0.009	0.236 ± 0.003
36	0.192 ± 0.003	0.216 ± 0.008	0.211 ± 0.006	0.206 ± 0.003	0.246 ± 0.008	0.233 ± 0.003
38	0.190 ± 0.008	0.213 ± 0.009	0.209 ± 0.005	0.204 ± 0.009	0.240 ± 0.009	0.231 ± 0.003
40	0.188 ± 0.003	0.210 ± 0.009	0.207 ± 0.006	0.199 ± 0.006	0.238 ± 0.008	0.225 ± 0.003
42	0.184 ± 0.009	0.207 ± 0.009	0.203 ± 0.007	0.194 ± 0.006	0.231 ± 0.006	0.223 ± 0.003
44	0.179 ± 0.009	0.205 ± 0.006	0.198 ± 0.006	0.186 ± 0.006	0.229 ± 0.007	0.222 ± 0.005
46	0.171 ± 0.006	0.197 ± 0.009	0.191 ± 0.007	0.177 ± 0.005	0.224 ± 0.007	0.217 ± 0.006
48	0.161 ± 0.003	0.188 ± 0.006	0.182 ± 0.005	0.167 ± 0.006	0.217 ± 0.007	0.211 ± 0.006

ANOVA summary	
F	4.179
P value	0.0014
P value summary	**
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.1315

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0.1080	5	0.02161	F (5, 138) = 4.179	P=0.0014
Residual (within columns)	0.7135	138	0.005170		
Total	0.8215	143			

Sales biliares 0.25%:

Horas	AC001	AC005	AC006	AC007	AC009	AC010
2	0.010 ± 0.004	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.001	0.010 ± 0.003	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001
4	0.018 ± 0.005	0.012 ± 0.002	0.013 ± 0.001	0.024 ± 0.002	0.064 ± 0.003	0.093 ± 0.001
6	0.039 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.020 ± 0.001	0.032 ± 0.002	0.179 ± 0.008	0.186 ± 0.001
8	0.116 ± 0.007	0.030 ± 0.002	0.040 ± 0.003	0.050 ± 0.002	0.219 ± 0.009	0.216 ± 0.003
10	0.184 ± 0.009	0.064 ± 0.003	0.094 ± 0.006	0.096 ± 0.005	0.234 ± 0.009	0.223 ± 0.003
12	0.192 ± 0.009	0.153 ± 0.005	0.186 ± 0.001	0.191 ± 0.008	0.242 ± 0.009	0.227 ± 0.003
14	0.199 ± 0.009	0.219 ± 0.002	0.218 ± 0.004	0.247 ± 0.008	0.246 ± 0.009	0.229 ± 0.003
16	0.201 ± 0.009	0.231 ± 0.002	0.226 ± 0.005	0.244 ± 0.008	0.245 ± 0.009	0.230 ± 0.003
18	0.198 ± 0.008	0.239 ± 0.001	0.235 ± 0.005	0.247 ± 0.008	0.243 ± 0.009	0.228 ± 0.001

20	0.197 ± 0.008	0.246 ± 0.002	0.238 ± 0.005	0.242 ± 0.007	0.242 ± 0.009	0.225 ± 0.007
22	0.190 ± 0.008	0.251 ± 0.002	0.238 ± 0.005	0.241 ± 0.008	0.239 ± 0.009	0.221 ± 0.007
24	0.109 ± 0.008	0.250 ± 0.001	0.235 ± 0.005	0.236 ± 0.009	0.234 ± 0.008	0.214 ± 0.007
26	0.191 ± 0.006	0.250 ± 0.001	0.234 ± 0.005	0.235 ± 0.009	0.229 ± 0.008	0.207 ± 0.001
28	0.183 ± 0.008	0.247 ± 0.001	0.232 ± 0.005	0.231 ± 0.009	0.222 ± 0.006	0.200 ± 0.001
30	0.188 ± 0.008	0.244 ± 0.001	0.230 ± 0.005	0.229 ± 0.009	0.215 ± 0.006	0.195 ± 0.001
32	0.184 ± 0.007	0.244 ± 0.001	0.229 ± 0.005	0.227 ± 0.008	0.209 ± 0.007	0.190 ± 0.001
34	0.178 ± 0.007	0.240 ± 0.002	0.225 ± 0.005	0.224 ± 0.006	0.204 ± 0.007	0.186 ± 0.002
36	0.179 ± 0.006	0.237 ± 0.001	0.222 ± 0.005	0.225 ± 0.004	0.200 ± 0.003	0.184 ± 0.002
38	0.174 ± 0.007	0.235 ± 0.001	0.220 ± 0.005	0.223 ± 0.005	0.197 ± 0.005	0.181 ± 0.003
40	0.169 ± 0.007	0.232 ± 0.002	0.217 ± 0.005	0.218 ± 0.005	0.193 ± 0.005	0.180 ± 0.003
42	0.168 ± 0.007	0.229 ± 0.005	0.210 ± 0.005	0.211 ± 0.005	0.192 ± 0.004	0.178 ± 0.003
44	0.163 ± 0.005	0.220 ± 0.001	0.202 ± 0.005	0.203 ± 0.004	0.191 ± 0.006	0.178 ± 0.003
46	0.152 ± 0.002	0.211 ± 0.001	0.190 ± 0.004	0.190 ± 0.004	0.189 ± 0.006	0.176 ± 0.003
48	0.142 ± 0.002	0.197 ± 0.001	0.173 ± 0.003	0.172 ± 0.004	0.189 ± 0.006	0.176 ± 0.001

ANOVA summary	
F	0.9953
P value	0.4231
P value summary	ns
Significant diff. among means (P < 0.05)?	No
R square	0.03481

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0.02381	5	0.004761	F (5, 138) = 0.9953	P=0.4231
Residual (within columns)	0.6602	138	0.004784		
Total	0.6840	143			

pH 5.0:

Horas	AC001	AC005	AC006	AC007	AC009	AC010
2	0.010 ± 0.003	0.012 ± 0.002	0.017 ± 0.002	0.013 ± 0.003	0.019 ± 0.000	0.019 ± 0.000
4	0.018 ± 0.003	0.019 ± 0.002	0.027 ± 0.002	0.020 ± 0.003	0.166 ± 0.005	0.216 ± 0.005
6	0.039 ± 0.002	0.028 ± 0.002	0.041 ± 0.001	0.031 ± 0.003	0.296 ± 0.004	0.307 ± 0.005
8	0.116 ± 0.009	0.027 ± 0.002	0.092 ± 0.000	0.065 ± 0.003	0.326 ± 0.004	0.339 ± 0.005

10	0.184 ± 0.009	0.131 ± 0.002	0.190 ± 0.005	0.134 ± 0.003	0.360 ± 0.004	0.367 ± 0.006
12	0.192 ± 0.009	0.227 ± 0.000	0.238 ± 0.009	0.196 ± 0.006	0.376 ± 0.000	0.392 ± 0.005
14	0.199 ± 0.009	0.235 ± 0.009	0.244 ± 0.008	0.201 ± 0.007	0.391 ± 0.009	0.411 ± 0.006
16	0.201 ± 0.008	0.249 ± 0.009	0.254 ± 0.008	0.191 ± 0.007	0.404 ± 0.012	0.428 ± 0.009
18	0.198 ± 0.008	0.252 ± 0.009	0.250 ± 0.006	0.195 ± 0.007	0.411 ± 0.012	0.445 ± 0.009
20	0.197 ± 0.008	0.253 ± 0.009	0.250 ± 0.006	0.193 ± 0.009	0.418 ± 0.012	0.460 ± 0.009
22	0.190 ± 0.009	0.245 ± 0.009	0.243 ± 0.006	0.189 ± 0.009	0.430 ± 0.012	0.472 ± 0.009
24	0.190 ± 0.008	0.250 ± 0.011	0.247 ± 0.007	0.185 ± 0.012	0.434 ± 0.012	0.483 ± 0.009
26	0.191 ± 0.006	0.247 ± 0.012	0.245 ± 0.008	0.184 ± 0.012	0.440 ± 0.012	0.489 ± 0.009
28	0.183 ± 0.006	0.246 ± 0.012	0.244 ± 0.008	0.173 ± 0.012	0.441 ± 0.012	0.486 ± 0.009
30	0.188 ± 0.006	0.241 ± 0.011	0.239 ± 0.008	0.172 ± 0.012	0.430 ± 0.012	0.483 ± 0.009
32	0.184 ± 0.006	0.242 ± 0.011	0.240 ± 0.008	0.170 ± 0.012	0.420 ± 0.012	0.479 ± 0.009
34	0.178 ± 0.006	0.238 ± 0.011	0.236 ± 0.008	0.165 ± 0.012	0.407 ± 0.012	0.475 ± 0.009
36	0.179 ± 0.002	0.235 ± 0.012	0.234 ± 0.008	0.171 ± 0.012	0.389 ± 0.012	0.469 ± 0.009
38	0.174 ± 0.006	0.232 ± 0.012	0.231 ± 0.009	0.169 ± 0.012	0.380 ± 0.012	0.466 ± 0.009
40	0.169 ± 0.005	0.229 ± 0.012	0.227 ± 0.009	0.164 ± 0.012	0.362 ± 0.014	0.458 ± 0.008
42	0.168 ± 0.005	0.224 ± 0.012	0.222 ± 0.009	0.156 ± 0.009	0.348 ± 0.013	0.455 ± 0.009
44	0.163 ± 0.006	0.220 ± 0.012	0.218 ± 0.009	0.151 ± 0.008	0.340 ± 0.009	0.448 ± 0.009
46	0.152 ± 0.006	0.211 ± 0.012	0.208 ± 0.009	0.147 ± 0.008	0.325 ± 0.009	0.444 ± 0.008
48	0.142 ± 0.006	0.211 ± 0.012	0.206 ± 0.009	0.138 ± 0.008	0.317 ± 0.009	0.438 ± 0.007

ANOVA summary	
F	45.84
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.6242

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	1.502	5	0.3003	F (5, 138) = 45.84	P<0.0001
Residual (within columns)	0.9040	138	0.006551		
Total	2.406	143			

pH 4.0:

Horas	AC001	AC005	AC006	AC007	AC009	AC010
2	0.003 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.021 ± 0.005	0.013 ± 0.003	0.019 ± 0.004	0.019 ± 0.006
4	0.009 ± 0.003	0.018 ± 0.000	0.028 ± 0.005	0.022 ± 0.002	0.117 ± 0.005	0.154 ± 0.007
6	0.030 ± 0.002	0.025 ± 0.001	0.039 ± 0.003	0.030 ± 0.002	0.241 ± 0.005	0.276 ± 0.005
8	0.067 ± 0.002	0.035 ± 0.003	0.065 ± 0.002	0.057 ± 0.004	0.274 ± 0.006	0.285 ± 0.005
10	0.117 ± 0.002	0.062 ± 0.008	0.117 ± 0.009	0.107 ± 0.012	0.288 ± 0.007	0.296 ± 0.008
12	0.156 ± 0.007	0.110 ± 0.013	0.181 ± 0.010	0.166 ± 0.012	0.313 ± 0.007	0.313 ± 0.008
14	0.169 ± 0.010	0.158 ± 0.013	0.207 ± 0.010	0.205 ± 0.012	0.339 ± 0.010	0.333 ± 0.010
16	0.175 ± 0.010	0.187 ± 0.008	0.224 ± 0.009	0.195 ± 0.012	0.361 ± 0.010	0.348 ± 0.010
18	0.180 ± 0.010	0.197 ± 0.006	0.231 ± 0.009	0.202 ± 0.012	0.379 ± 0.010	0.362 ± 0.010
20	0.186 ± 0.010	0.208 ± 0.005	0.233 ± 0.008	0.199 ± 0.012	0.395 ± 0.010	0.375 ± 0.012
22	0.184 ± 0.010	0.217 ± 0.004	0.234 ± 0.008	0.196 ± 0.012	0.407 ± 0.010	0.386 ± 0.012
24	0.186 ± 0.010	0.222 ± 0.002	0.235 ± 0.008	0.193 ± 0.012	0.419 ± 0.010	0.397 ± 0.012
26	0.183 ± 0.010	0.223 ± 0.001	0.235 ± 0.007	0.193 ± 0.012	0.429 ± 0.009	0.403 ± 0.012
28	0.180 ± 0.010	0.220 ± 0.002	0.231 ± 0.007	0.185 ± 0.012	0.434 ± 0.009	0.407 ± 0.012
30	0.179 ± 0.009	0.220 ± 0.002	0.230 ± 0.008	0.182 ± 0.012	0.436 ± 0.009	0.410 ± 0.012
32	0.172 ± 0.009	0.221 ± 0.004	0.229 ± 0.007	0.180 ± 0.012	0.451 ± 0.009	0.413 ± 0.012
34	0.167 ± 0.009	0.217 ± 0.004	0.224 ± 0.007	0.178 ± 0.009	0.456 ± 0.008	0.413 ± 0.012
36	0.169 ± 0.008	0.214 ± 0.004	0.220 ± 0.007	0.180 ± 0.009	0.453 ± 0.009	0.407 ± 0.012
38	0.164 ± 0.008	0.213 ± 0.004	0.217 ± 0.006	0.175 ± 0.009	0.454 ± 0.009	0.406 ± 0.012
40	0.160 ± 0.008	0.213 ± 0.003	0.215 ± 0.005	0.171 ± 0.009	0.447 ± 0.009	0.398 ± 0.012
42	0.159 ± 0.008	0.206 ± 0.003	0.208 ± 0.006	0.164 ± 0.009	0.445 ± 0.009	0.394 ± 0.012
44	0.156 ± 0.008	0.202 ± 0.002	0.204 ± 0.005	0.160 ± 0.009	0.441 ± 0.010	0.387 ± 0.010
46	0.153 ± 0.008	0.198 ± 0.002	0.200 ± 0.005	0.153 ± 0.009	0.436 ± 0.009	0.380 ± 0.012
48	0.149 ± 0.008	0.196 ± 0.001	0.196 ± 0.003	0.149 ± 0.009	0.433 ± 0.009	0.376 ± 0.010

ANOVA summary	
F	39.05
P value	<0.0001
P value summary	****
Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes
R square	0.5859

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	1.266	5	0.2533	F (5, 138) = 39.05	P<0.0001

Residual (within columns)	0.8951	138	0.006486		
Total	2.162	143			

pH 3:

Horas	AC001	AC005	AC006	AC007	AC009	AC010
2	0.003 ± 0.009	0.004 ± 0.011	0.001 ± 0.005	0.006 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.001
4	0.008 ± 0.000	0.026 ± 0.004	0.031 ± 0.002	0.010 ± 0.001	0.054 ± 0.002	0.063 ± 0.002
6	0.013 ± 0.003	0.029 ± 0.004	0.035 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.081 ± 0.002	0.107 ± 0.004
8	0.020 ± 0.002	0.029 ± 0.005	0.037 ± 0.003	0.015 ± 0.001	0.109 ± 0.002	0.147 ± 0.005
10	0.021 ± 0.003	0.031 ± 0.005	0.040 ± 0.004	0.014 ± 0.001	0.133 ± 0.007	0.179 ± 0.006
12	0.023 ± 0.003	0.030 ± 0.006	0.040 ± 0.002	0.016 ± 0.001	0.155 ± 0.007	0.193 ± 0.006
14	0.023 ± 0.004	0.029 ± 0.005	0.039 ± 0.003	0.017 ± 0.001	0.169 ± 0.007	0.201 ± 0.006
16	0.024 ± 0.004	0.030 ± 0.006	0.041 ± 0.002	0.016 ± 0.002	0.175 ± 0.007	0.208 ± 0.006
18	0.025 ± 0.005	0.030 ± 0.005	0.040 ± 0.002	0.018 ± 0.001	0.180 ± 0.007	0.211 ± 0.006
20	0.026 ± 0.003	0.031 ± 0.005	0.041 ± 0.002	0.019 ± 0.002	0.183 ± 0.007	0.215 ± 0.006
22	0.024 ± 0.002	0.029 ± 0.005	0.040 ± 0.004	0.017 ± 0.002	0.188 ± 0.007	0.222 ± 0.006
24	0.025 ± 0.004	0.030 ± 0.005	0.041 ± 0.002	0.016 ± 0.002	0.193 ± 0.004	0.231 ± 0.006
26	0.025 ± 0.004	0.030 ± 0.005	0.041 ± 0.002	0.018 ± 0.002	0.197 ± 0.003	0.239 ± 0.007
28	0.024 ± 0.004	0.029 ± 0.005	0.040 ± 0.002	0.019 ± 0.003	0.201 ± 0.004	0.247 ± 0.007
30	0.024 ± 0.004	0.030 ± 0.006	0.041 ± 0.002	0.019 ± 0.003	0.205 ± 0.004	0.253 ± 0.008
32	0.023 ± 0.004	0.030 ± 0.006	0.041 ± 0.002	0.018 ± 0.003	0.208 ± 0.004	0.261 ± 0.009
34	0.023 ± 0.003	0.030 ± 0.006	0.041 ± 0.002	0.020 ± 0.004	0.210 ± 0.004	0.265 ± 0.009
36	0.023 ± 0.003	0.032 ± 0.005	0.042 ± 0.002	0.018 ± 0.003	0.214 ± 0.003	0.271 ± 0.009
38	0.024 ± 0.005	0.030 ± 0.005	0.040 ± 0.001	0.017 ± 0.004	0.217 ± 0.003	0.274 ± 0.009
40	0.022 ± 0.002	0.030 ± 0.006	0.041 ± 0.002	0.019 ± 0.004	0.217 ± 0.004	0.276 ± 0.009
42	0.023 ± 0.002	0.031 ± 0.005	0.041 ± 0.002	0.018 ± 0.004	0.218 ± 0.004	0.278 ± 0.009
44	0.023 ± 0.002	0.030 ± 0.005	0.040 ± 0.002	0.019 ± 0.004	0.218 ± 0.003	0.280 ± 0.009
46	0.022 ± 0.002	0.031 ± 0.005	0.041 ± 0.002	0.019 ± 0.004	0.219 ± 0.003	0.282 ± 0.009
48	0.022 ± 0.002	0.030 ± 0.005	0.041 ± 0.002	0.019 ± 0.004	0.218 ± 0.003	0.283 ± 0.009

ANOVA summary	
F	131.9
P value	<0.0001
P value summary	****

Significant diff. among means ($P < 0.05$)?	Yes
R square	0.8270

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	0.9414	5	0.1883	F (5, 138) = 131.9	$P < 0.0001$
Residual (within columns)	0.1969	138	0.001427		
Total	1.138	143			