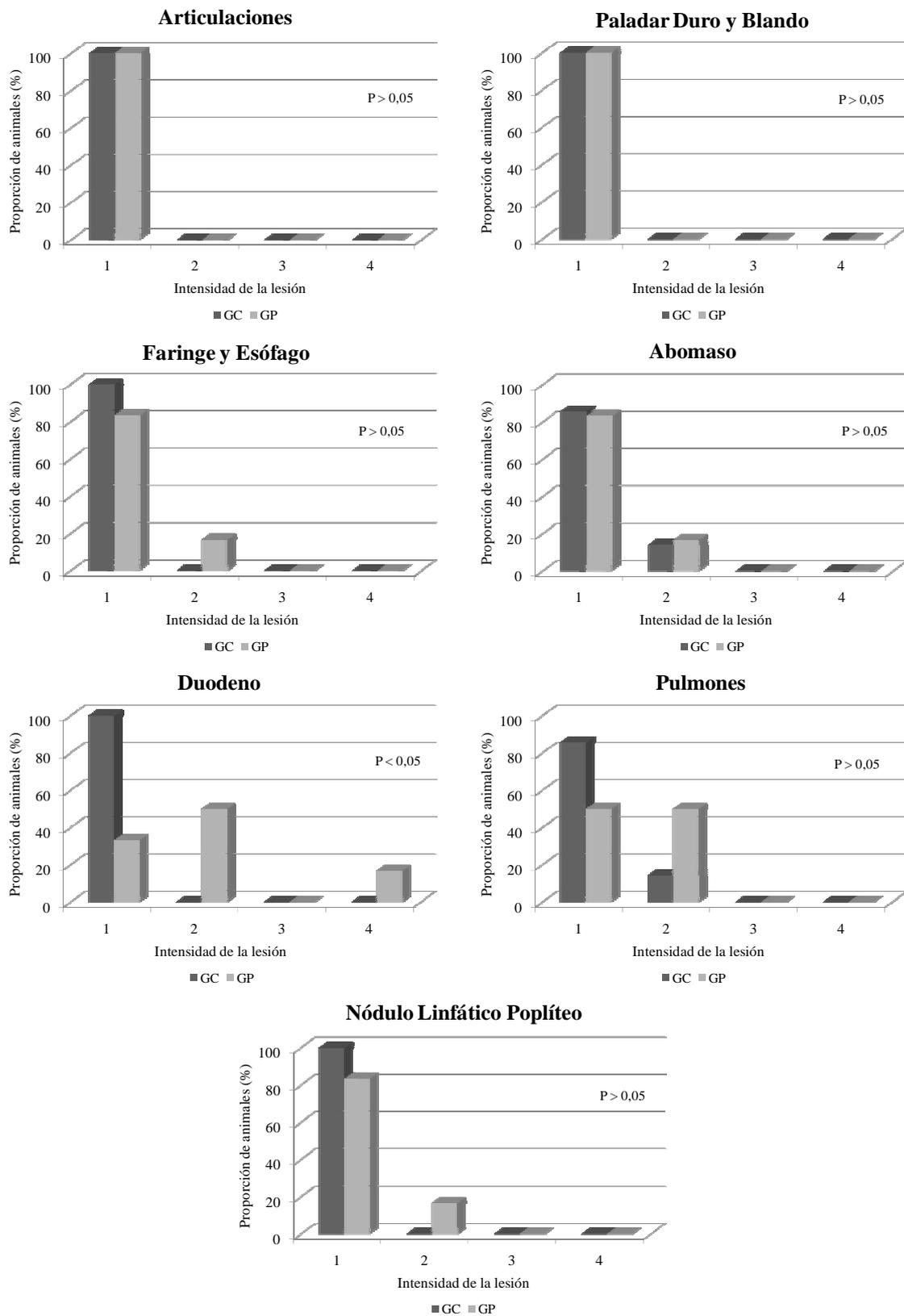


**Figura 40:** Lesiones macroscópicas en necropsias programadas de órganos no diana: articulaciones, paladar duro y blando, faringe y esófago, abomaso, duodeno, pulmones y NL poplíteo del GC y el GP.



#### 4.6.10. Lesiones microscópicas

En hígado se pudo observar que la mayoría de los animales muertos espontáneamente presentaron colangiohepatitis mononuclear en los espacios porta con estasis canalicular e infiltración mixta intrasinusoidal. Los nódulos paratifoideos (NPT) se ubicaron sin una localización estable en la estructura del lobulillo tradicional. Estos nódulos son el resultado del reclutamiento de los macrófagos y los polimorfonucleares. Finalmente se forman centros de necrosis de coagulación focal (figura 41 A1) como consecuencia de la muerte de los fagocitos. En cambio, en la mayoría de los animales que fueron sacrificados al final del experimento se encontraron lesiones muy leves (tumefacción celular sin signos inflamatorios), y algunos de ellos animales no presentaban lesiones (figura 41 B1).

En el bazo de la mayoría de los animales muertos espontáneamente, se observó un severo proceso inflamatorio agudo, en ocasiones de tipo hemorrágico, con la presencia de nódulos NPT (figura 42 A2 y A3). En cambio, los animales sacrificados al final del experimento, en su mayoría, no presentaban lesiones (figura 42 B1, B2 y B3).

En yeyuno, en aquellos animales que murieron espontáneamente, se observó una necrosis de los enterocitos de los extremos de las vellosidades junto a infiltrado mononucleares en la lámina propia (figura 43 A2 y A3). Por otra parte, la mayoría de los animales que fueron sacrificados al final de la experiencia no presentaron lesiones (figura 43 B1, B2 y B3).

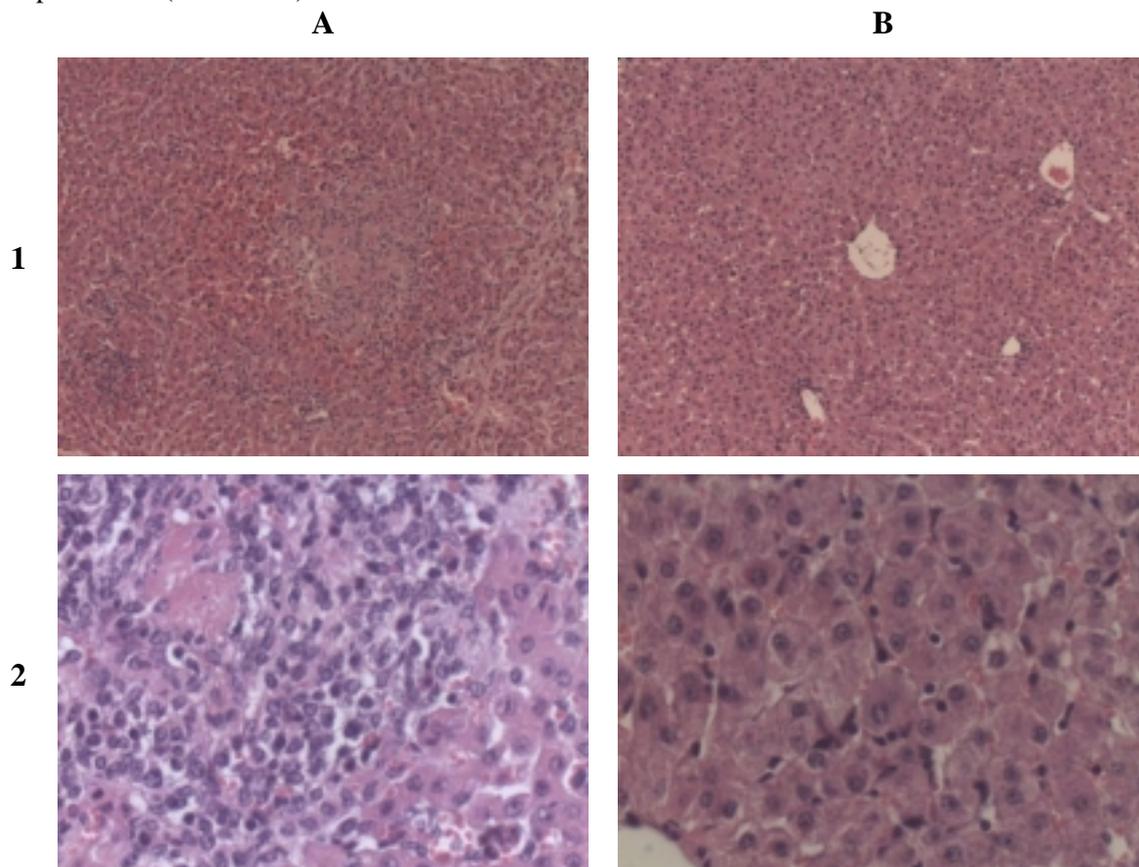
En válvula ileocecal, en aquellos animales que murieron al principio de la etapa de muertes espontáneas, se observó una enteritis con necrosis de las glándulas y vellosidades junto a un intento regenerativo del fondo glandular (figura 44 A2) y una hiperplasia del tejido linfoideo asociado. Sin embargo, aquellos que murieron al final de la etapa de muertes espontáneas presentaban enteritis fibrinonecrótica e infiltración de la lámina propia con células mononucleares. En la válvula ileocecal de la mayoría de los animales sacrificados al final del experimento, no se observaron lesiones (figura 44 B1 y B2).

La figura 45 muestra el porcentaje de animales que presentan los distintos niveles de lesiones en cada uno de los órganos de las necropsias espontáneas. En estos animales que murieron espontáneamente, se observaron lesiones severas características

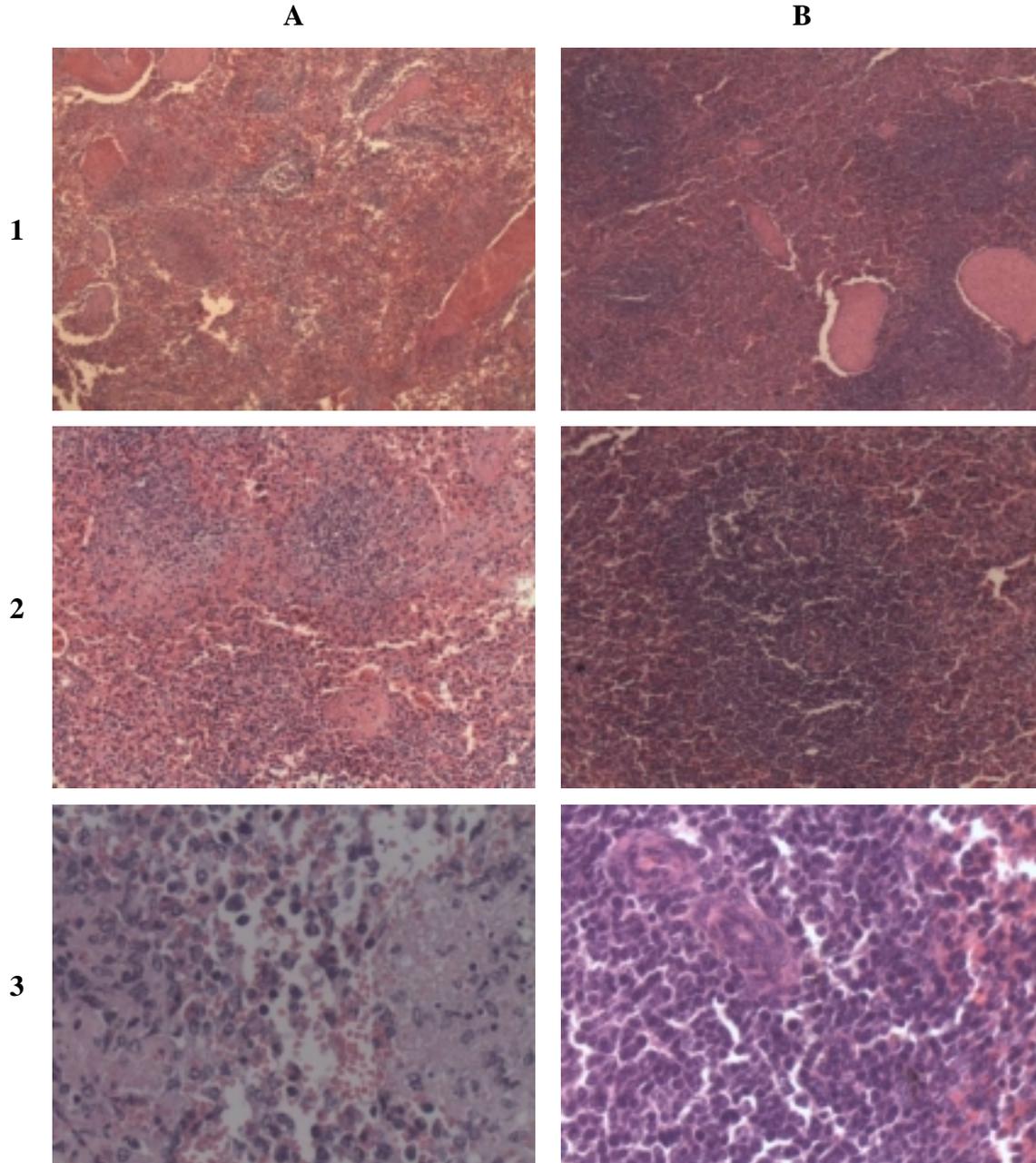
de la salmonelosis en todos los órganos diana. En el Bazo, las lesiones encontradas en el GP fueron menos severas ( $P < 0,05$ ) que en el GC.

Al igual que sucedió con las lesiones macroscópicas observadas, las lesiones microscópicas de las necropsias programadas de los animales que sobrevivieron presentaron lesiones menos graves que los que murieron espontáneamente. En la mayoría de los órganos las lesiones fueron similares ( $P > 0,05$ ) en el GP y GC, solo el nódulo linfático poplíteo se vio más afectado en el último grupo (figura 46).

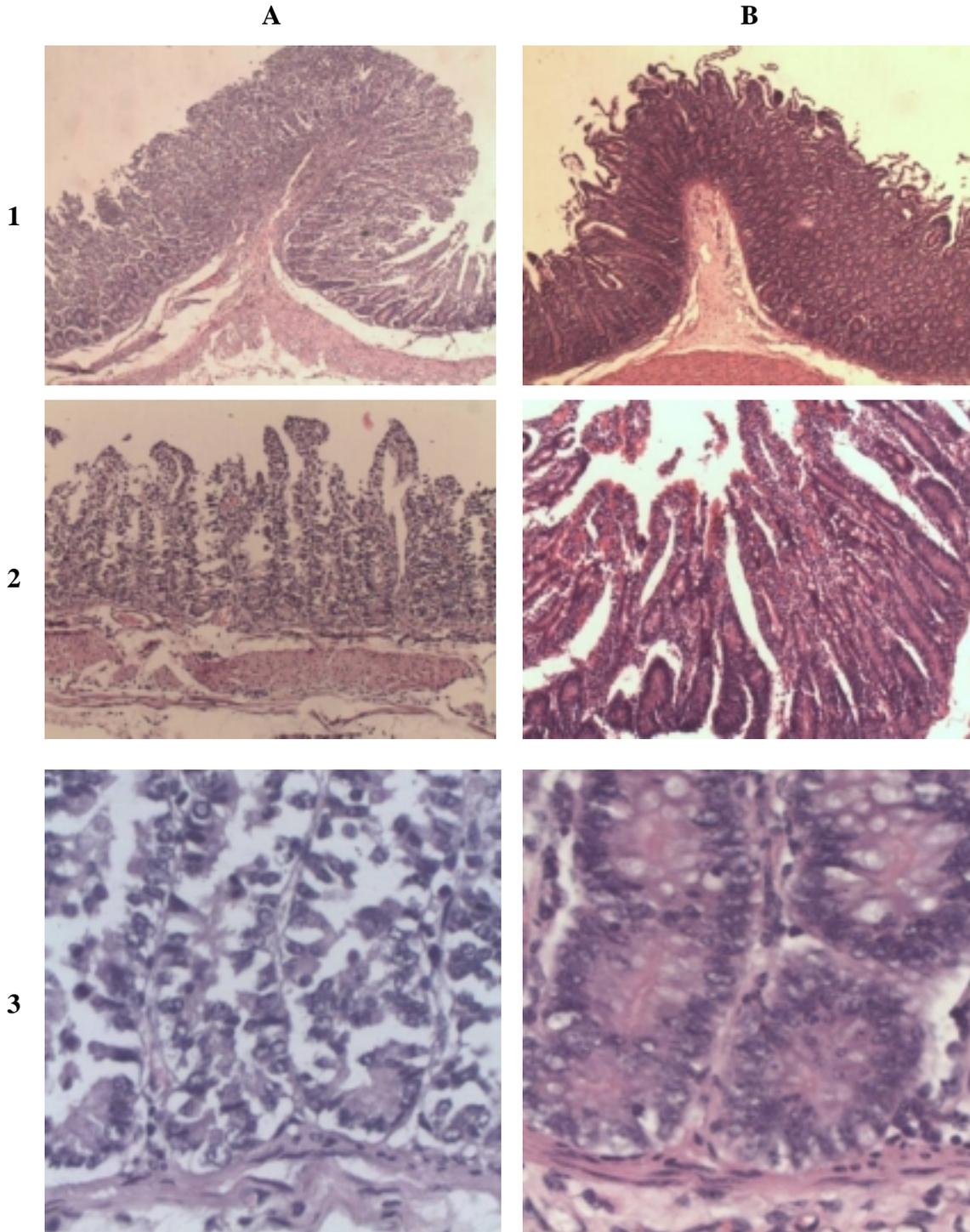
**Figura 41:** Lesiones microscópicas del hígado. A1) NPT totalmente conformado con amplia necrosis de coagulación donde se ve un infiltrado mononuclear y degeneración parenquimatosa en animales muertos espontáneamente (H-E x 100). B1) Hígado sin lesión aparente en animales sacrificados al final del experimento (H-E x 100). A2) Detalle de la periferia de un NPT dentro de un lobulillo hepático en animales muertos espontáneamente (H-E x 400). B2) Detalle de una porción del lobulillo hepático sin lesión aparente de los animales sacrificados al final del experimento (H-E x 400).



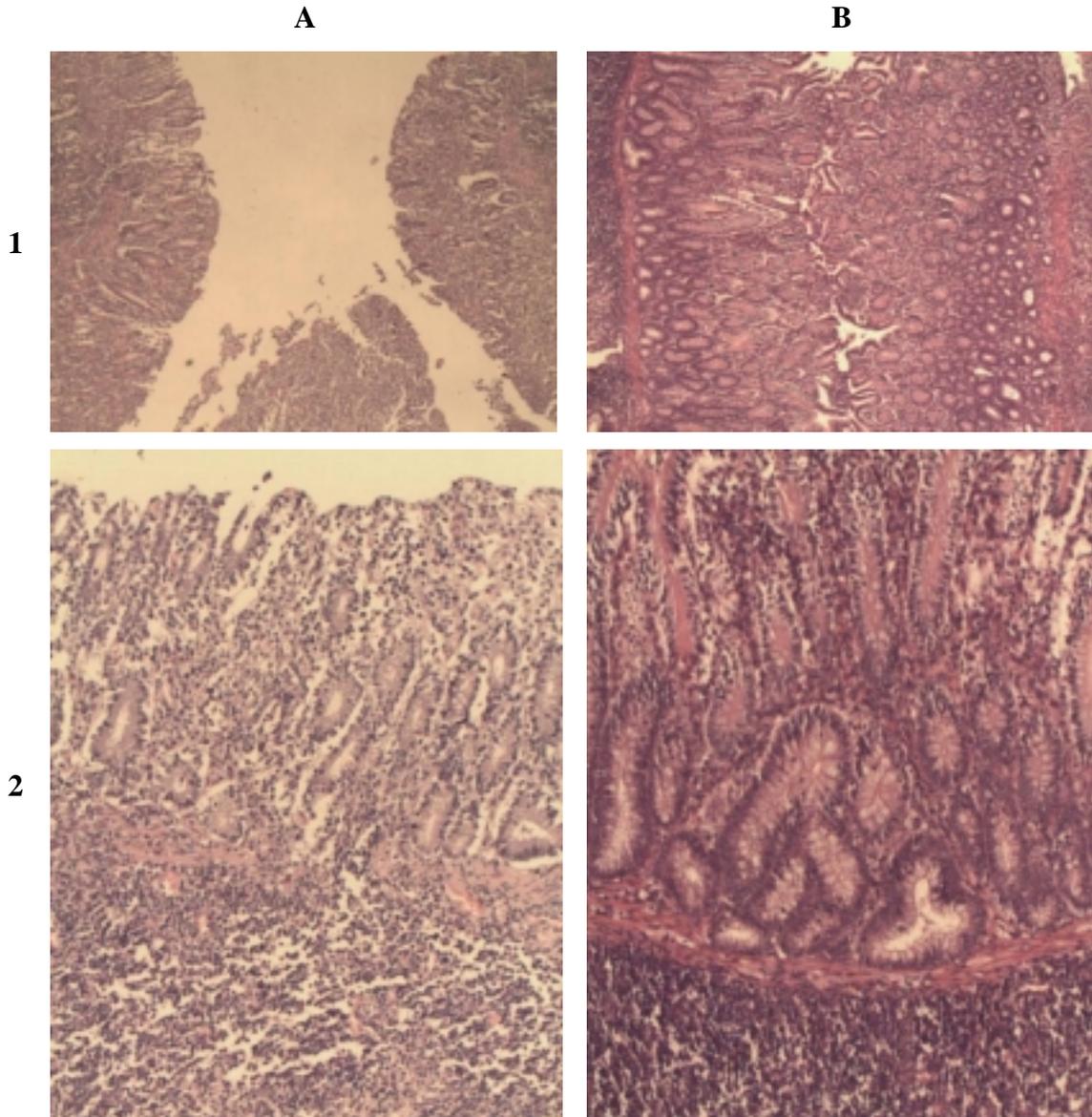
**Figura 42:** Lesiones microscópicas del bazo. A1) Esplenitis hemorrágica salmonelósica con presencia de NPT en animales muertos espontáneamente (H-E x 40). B1) Bazo sin lesión aparente en animales sacrificados al final del experimento (H-E x 40). A2) NPT en la pulpa roja del bazo en animales muertos espontáneamente (H-E x 100). B2) Pulpa blanca del bazo sin lesión aparente en animales sacrificados al final del experimento (H-E x 100). A3) Detalle de la periferia de 2 NPT en la pulpa roja del bazo en animales muertos espontáneamente (H-E x 400). B3) Detalle de los centros germinativos en la pulpa blanca del bazo sin lesión aparente en terneros sacrificados al final del experimento (H-E x 400).



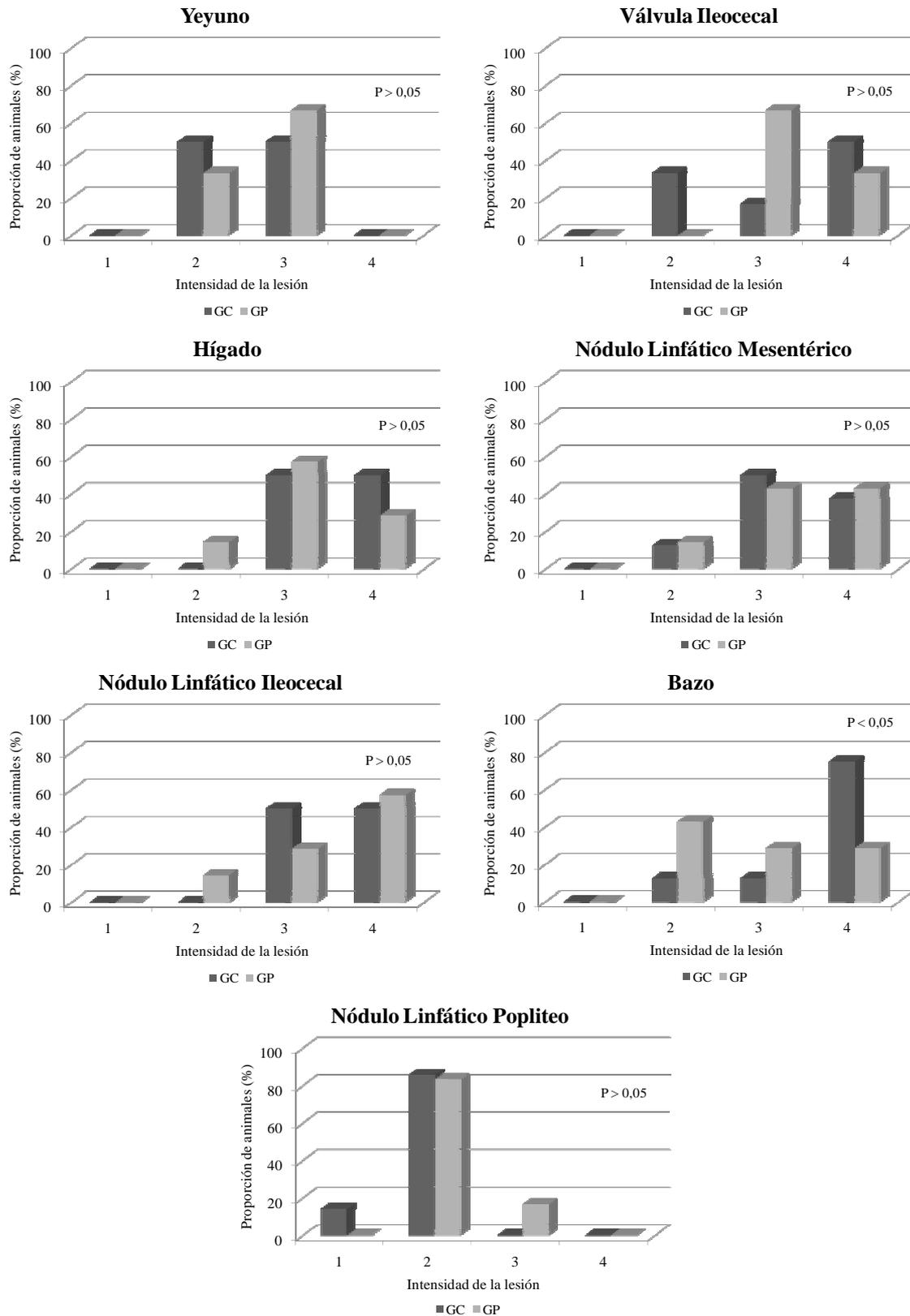
**Figura 43:** Lesiones microscópicas del yeyuno. A1) Panorámica de una vellosidad intestinal con enteritis y atrofia de las microvellosidades en animales muertos espontáneamente (H-E x 40). B1) Panorámica de una vellosidad intestinal sin lesión aparente en animales sacrificados al final el experimento (H-E x 40). A2) Enteritis superficial con infiltrados mononucleares en animales muertos espontáneamente (H-E x 100). B2) Mucosa intestinal sin lesión aparente en animales sacrificados al final del experimento (H-E x 100). A3) Detalle de la mucosa donde se observa pérdida de arquitectura y una necrosis de los enterocitos del extremo de las vellosidades en animales muertos espontáneamente (H-E x 400). B3) Detalle de la mucosa intestinal sin lesión aparente en animales sacrificados al final del experimento (H-E x 400).



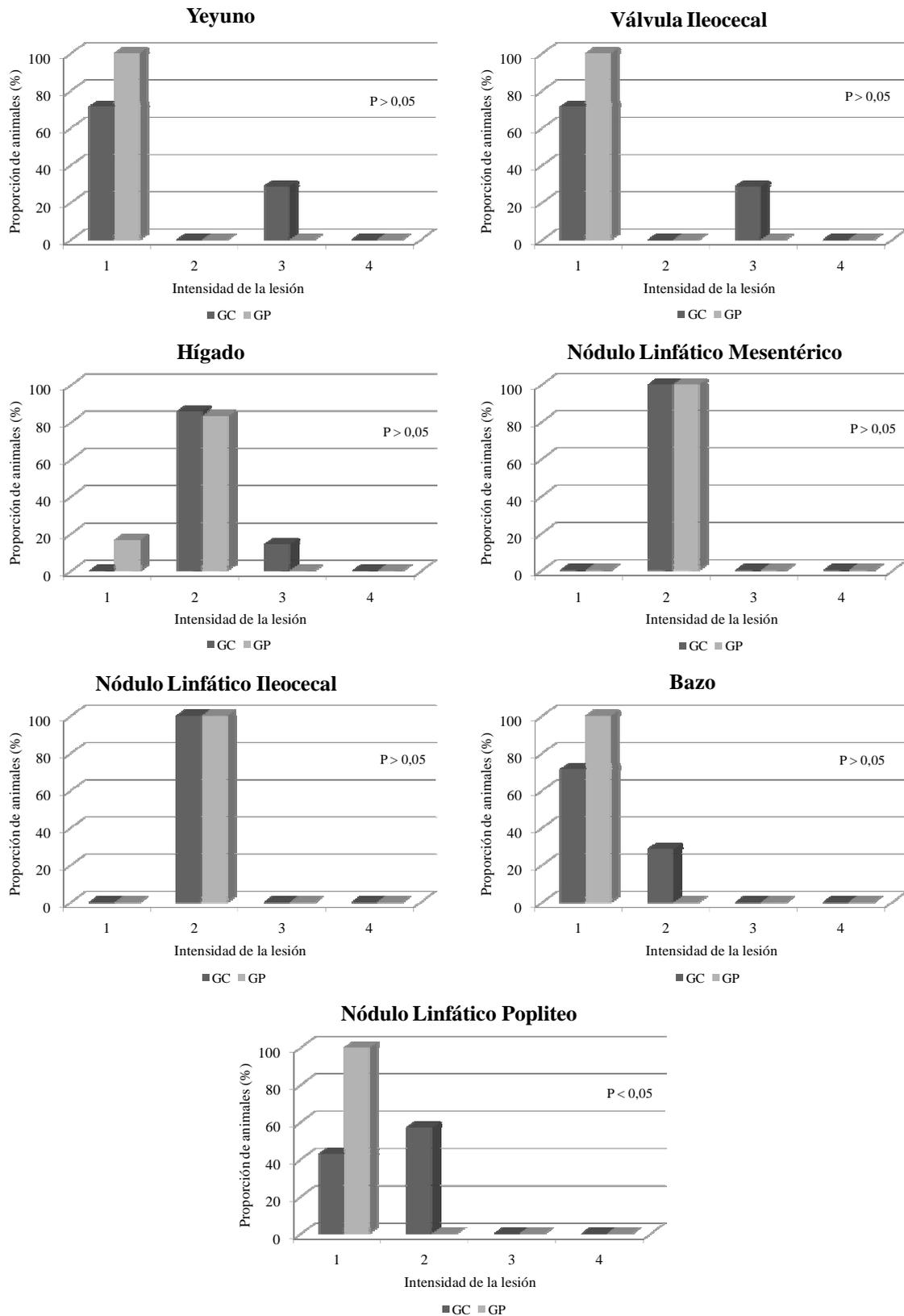
**Figura 44:** Lesiones microscópicas de la válvula ileocecal. A1) Panorámica de la válvula ileocecal con enteritis necrotizante en animales que murieron espontáneamente (H-E x 40). B1) Panorámica de la válvula ileocecal sin lesión aparente en animales sacrificados al final del experimento (H-E x 40). A2) Necrosis de la mucosa con pérdida de arquitectura e infiltrados mononucleares en animales que murieron espontáneamente (H-E x 100). B2) Detalle de la mucosa sin lesión aparente en animales sacrificados al final del experimento (H-E x 100).



**Figura 45:** Lesiones microscópicas de necropsias no programadas en yeyuno, válvula ileocecal, hígado, bazo, NL ileocecal, NL mesentérico y NL poplíteo del GC y GP.



**Figura 46:** Lesiones microscópicas de necropsias programadas en yeyuno, válvula ileocecal, hígado, bazo, NL ileocecal, NL mesentérico y NL poplíteo del GC y GP.



Los NPT se observaron solamente en los órganos de los animales que murieron espontáneamente. El yeyuno fue el único órgano que no se vio afectado por esta lesión. El análisis de cada órgano individualmente, muestra que en el bazo hay una tendencia a encontrar una menor cantidad de estas lesiones en los animales del GP. En los otros órganos, siempre el GC presentó mayor proporción de animales con NPT que el GP, pero las diferencias no fueron significativas. En cambio si se realiza un análisis de todos los órganos juntos en los cuales se encontraron estas lesiones, se encuentra una diferencia significativa ( $P = 0,042$ ) entre ambos grupos de animales (tabla 18).

**Tabla 18:** Proporción de animales que presentaron NPT en el GC y el GP.

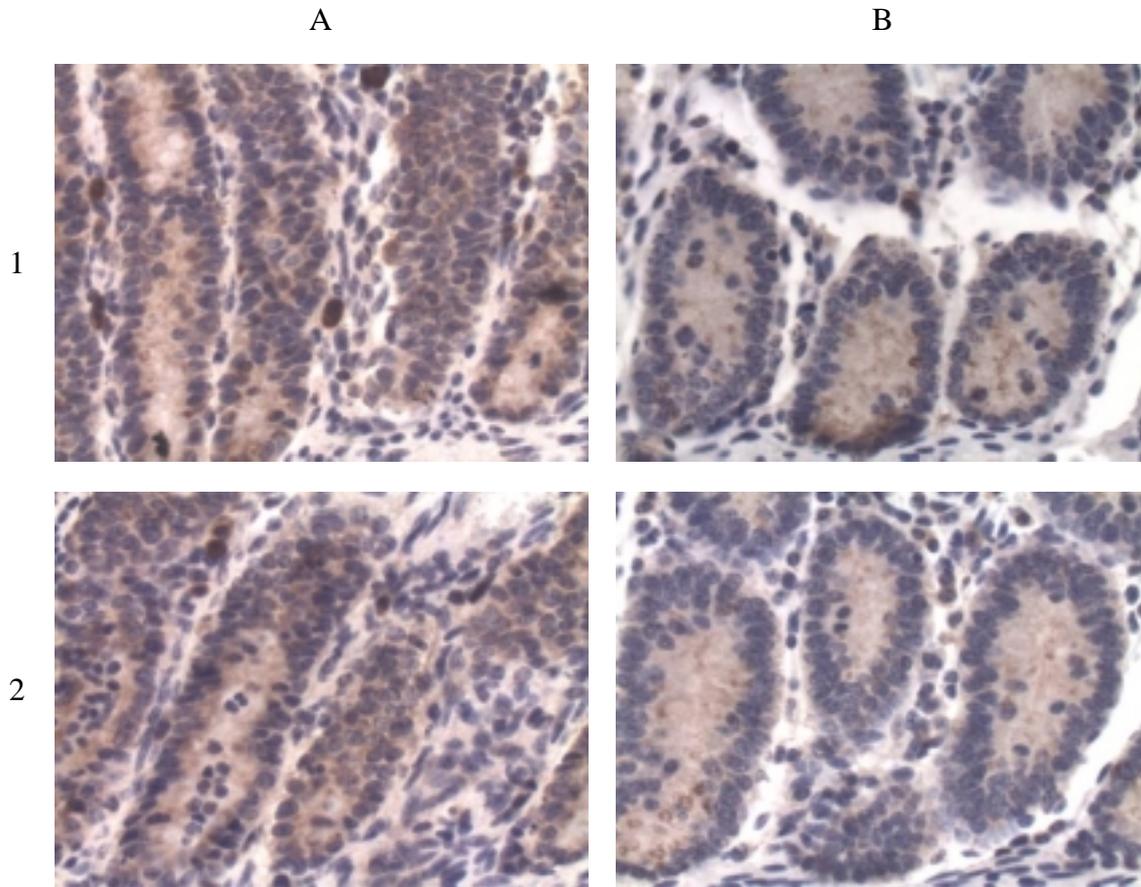
Órgano	CG*	GP*	Significancia
Bazo	5/8	1/7	0,066
Hígado	3/8	2/7	0,724
Nódulo linfático mesentérico	2/8	1/7	0,617
Nódulo linfático ileocecal	2/6	1/7	0,435
Válvula ileocecal	1/6	0/6	0,317

\*Cantidad de animales que presentaron NPT/cantidad total de animales

#### 4.6.11. Inmunomarcación de IgA en yeyuno

Las células de la mucosa intestinal y la submucosa mostraron una intensa marcación citoplasmática. Se encontró reacción positiva específica en las células y en el moco. La inmunomarcación también se observó en la secreción de las glándulas de la mucosa (Figura 47). La marcación no mostró diferencias entre ambos grupos de terneros. El GP presentó la misma producción de IgA en los animales muertos espontáneamente y en los sacrificados al final de la experiencia. En cambio el GC presentó una inmunomarcación menor en los órganos de los terneros a los que se le realizó una necropsia programada, que si bien no fue una diferencia estadísticamente significativa, hubo una tendencia ( $P = 0,067$ ) a ser menor que en los animales que murieron espontáneamente a causa de la salmonelosis.

**Figura 47:** Inmunomarcación para IgA en el yeyuno de terneros afectados por salmonelosis. A1 y A2 Inmunomarcación para IgA en el yeyuno de terneros muertos espontáneamente. B1 y B2 Inmunomarcación para IgA en el yeyuno de terneros sacrificados al final del experimento.

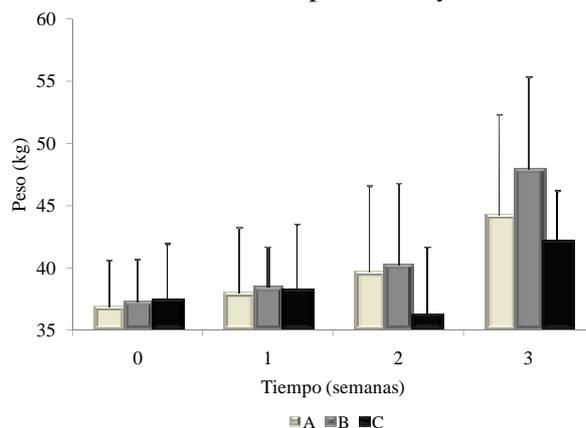


#### **4.7. Evaluación de la performance de crecimiento de terneras suplementadas con 2 inóculos probióticos conservados por congelación**

##### **4.7.1. Peso de las terneras**

Los animales permanecieron en buen estado de salud durante todo el tiempo que duró el experimento.

El peso de las terneras del tratamiento A no difirió ( $P > 0,05$ ) de ninguno de los otros 2 grupos. A su vez, el peso del grupo B fue superior ( $P < 0,05$ ) al peso del grupo C. Por otro lado, se pudo observar que el mayor aumento de peso ( $P < 0,05$ ) se dio en la semana 3 del experimento (figura 48).

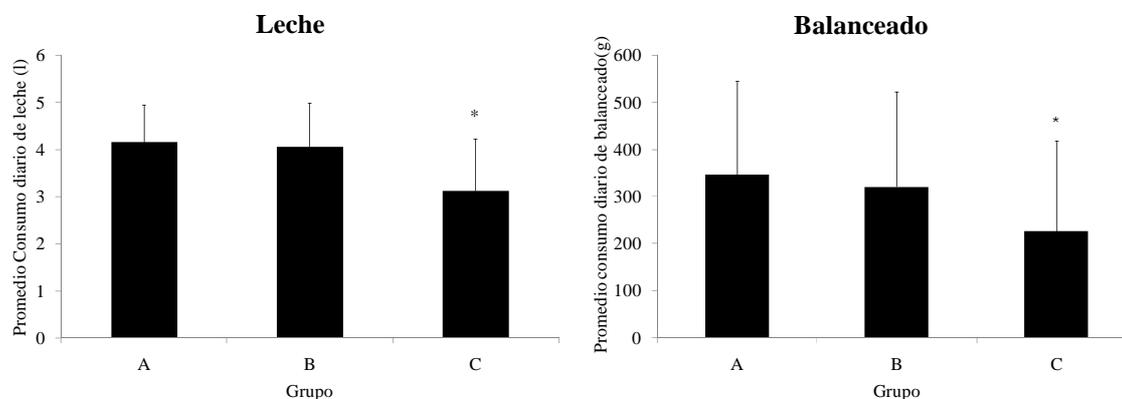
**Figura 48:** Peso de las terneras al inicio del experimento y durante las 3 semanas siguientes

La letra A representa al grupo suplementado con el inóculo A, la letra B representa al grupo suplementado con el inóculo B y la letra C representa al grupo control.

#### 4.7.2. Consumo de alimento y conversión alimentaria

El consumo promedio, tanto de leche como de balanceado fue significativamente mayor en los 2 grupos inoculados con las BAL (figura 49).

Durante los primeros días del experimento todos los grupos consumieron la misma cantidad de leche. El día 5 comenzaron a aumentar el consumo ( $P < 0,05$ ) los animales de los grupos probióticos. Esta diferencia en el consumo se mantuvo hasta el final de la experiencia. En el consumo del balanceado se observó una diferencia entre los grupos probióticos y control que comenzó a partir del día 4 de la experiencia. Con respecto a la conversión alimentaria, el grupo B presentó un valor menor, pero las diferencias no fueron significativas por la gran variabilidad entre cada animal (tabla 19).

**Figura 49:** Consumo promedio de leche y balanceado por grupo de terneras

\*Significa que difiere ( $P < 0,05$ ) del resto de los grupos

La letra A representa al grupo suplementado con el inóculo A, la letra B representa al grupo suplementado con el inóculo B y la letra C representa al grupo control.

**Tabla 19:** Conversión alimentaria durante las 3 semanas de experimentación

Grupo	Conversión alimentaria (kg de materia seca consumida/kg de peso ganado)
A	2,85 ± 2,74
B	1,66 ± 0,67
C	2,73 ± 2,13

La letra A representa al grupo suplementado con el inóculo A, la letra B representa al grupo suplementado con el inóculo B y la letra C representa al grupo control.

#### 4.7.3. Recuento de *Lactobacillus* en leche de tanque

La carga de *Lactobacillus* totales fue menor ( $P < 0,05$ ) en la leche del grupo control que en la leche de los grupos suplementados con los probióticos. Esta alta carga de BAL en la leche de los grupo A y B, ocasionó una producción de ácidos suficiente para llevar la leche a un pH significativamente menor al de la leche control. Por otro lado, se pudo observar, en las leches inoculadas, que un gran porcentaje de los *Lactobacillus* presentes eran las cepas integrantes de los inóculos administrados (tabla 20).

**Tabla 20:** Recuento de *Lactobacillus* y pH en leche de tanque

Grupo	<i>Lactobacillus</i> totales (Log UFC/ml)	<i>Lactobacillus</i> del inóculo (Log UFC/ml)	pH
A	7,18 ± 0,16 <sup>a</sup>	5,90 ± 0,31 <sup>a</sup>	4,75 <sup>a</sup>
B	6,80 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,72 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,55 <sup>a</sup>
C	4,57 ± 0,64 <sup>b</sup>	ND	6,7 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes muestran diferencias significativas entre grupos.

La letra A representa al grupo suplementado con el inóculo A, la letra B representa al grupo suplementado con el inóculo B y la letra C representa al grupo control. ND: no detectado.

#### 4.7.4. Recuento de la microbiota fecal

La figura 50 muestra los recuentos de las poblaciones de coliformes, enterococos, *Lactobacillus*, inóculos probióticos y levaduras a lo largo del experimento. Se observó la presencia de BAL integrantes de cada uno de los inóculos en los grupos A y B a partir de la semana 1, las mismas no se modificaron a lo largo del tiempo ( $P > 0,05$ ) y los recuentos celulares fueron similares en ambos grupos ( $P > 0,05$ ).

Las poblaciones de *Lactobacillus* totales presentaron recuentos similares ( $P>0,05$ ) entre los diferentes grupos, y permanecieron constantes durante todo el experimento.

La población de coliformes en ambos grupos fueron similares ( $P>0,05$ ) y se mantuvieron invariables a lo largo del experimento.

Los enterococos aumentaron a partir de la semana 2 y tampoco se vieron influenciados por el efecto del tratamiento.

Las levaduras disminuyeron significativamente a partir de la semana 1 en todos los grupos y tampoco hubo variación entre los tratamientos.

En la figura 51 se muestran las relaciones entre las diferentes poblaciones evaluadas. La relación inóculo A/*Lactobacillus* totales disminuyó en la semana 2 y 3 con respecto a la semana 1 ( $P<0,05$ ). En cambio, la relación del inóculo B/*Lactobacillus* totales se mantuvo estable a lo largo del tiempo ( $P>0,05$ ) y fue superior a la relación inóculo A/*Lactobacillus* totales ( $P<0,05$ ).

La relación *Lactobacillus*/Coliformes no presentó diferencias entre los grupos y tampoco varió en el tiempo. Al final del experimento, en la semana 3, esta relación era superior a 1 en los 2 grupos de probióticos y menor a 1 en el grupo control.

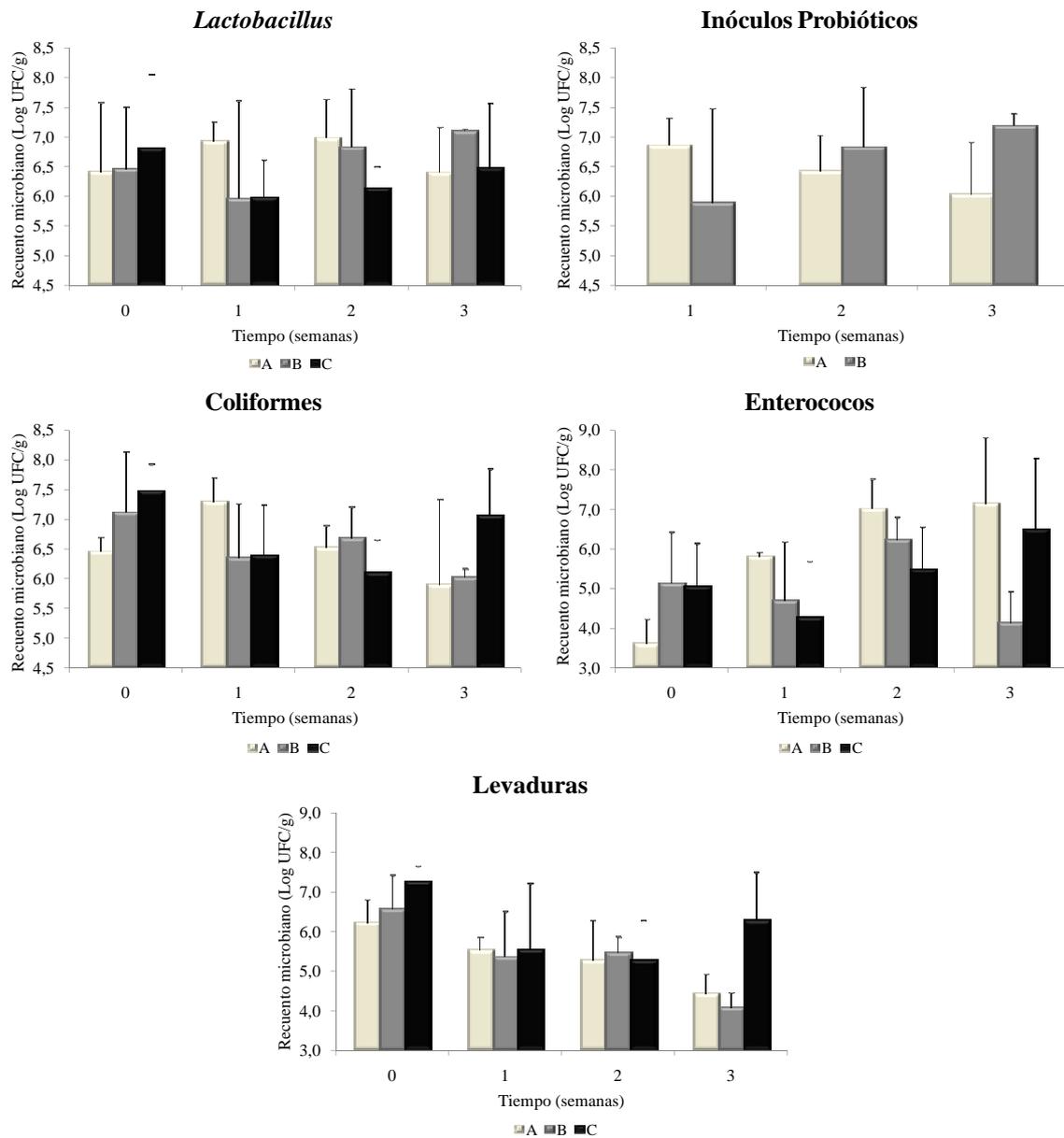
En cuanto a la relación *Lactobacillus*/enterococos hubo una diferencia entre los diferentes tratamientos. El grupo B presentó mayor relación superior ( $P<0,05$ ) a los otros 2 grupos en la semana 3.

La relación *Lactobacillus*/Levaduras no varió a lo largo del tiempo para el grupo control y el grupo A. El grupo B presentó un recuento similar durante las 2 primeras semanas y mostró un aumento ( $P<0,05$ ) en la semana 3. Hubo diferencias entre tratamientos en la semana 3, presentando mayor relación ambos grupos probióticos con respecto al grupo control.

La relación enterococos/coliformes no presentó diferencias entre grupos y comenzó a aumentar ( $P<0,05$ ) a partir de la semana 2.

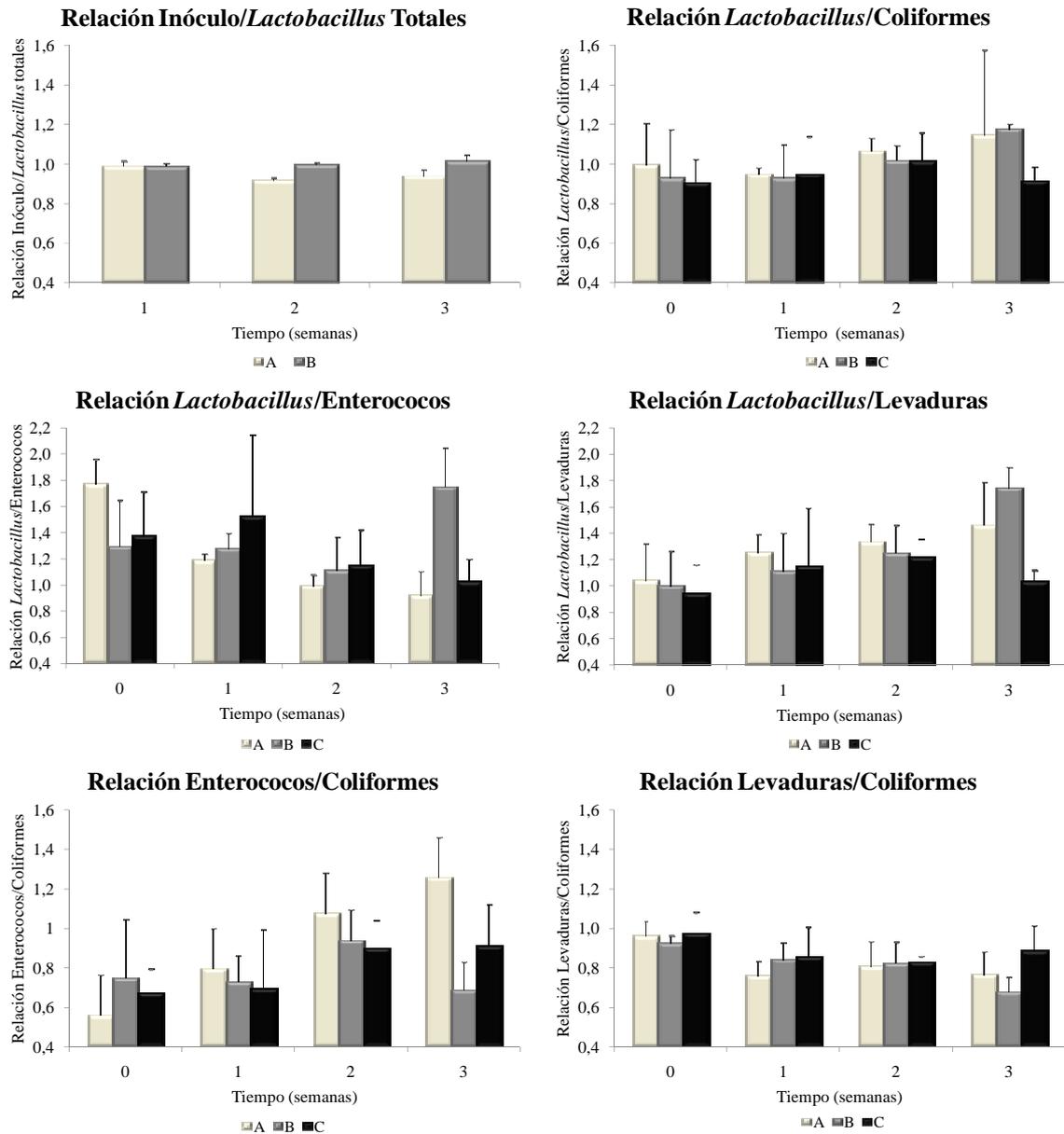
La relación levaduras/coliformes disminuyó significativamente ( $P<0,05$ ) a partir de la semana 1 no presentando diferencias entre tratamientos.

**Figura 50:** Recuento de las poblaciones de coliformes, enterococos, *Lactobacillus*, inóculos probióticos y levaduras a lo largo del experimento.



La letra A representa al grupo suplementado con el inóculo A, la letra B representa al grupo suplementado con el inóculo B y la letra C representa al grupo control.

**Figura 51:** Relación entre las cantidades de diferentes poblaciones: Inóculo/*Lactobacillus*, *Lactobacillus*/Coliformes, *Lactobacillus*/Enterococos, *Lactobacillus*/Levaduras, Enterococos/Coliformes y Levaduras/Coliformes, a lo largo del experimento.



La letra A representa al grupo suplementado con el inóculo A, la letra B representa al grupo suplementado con el inóculo B y la letra C representa al grupo control.

## **5. DISCUSIÓN**

### 5.1. Aislamiento e identificación de BAL

La identificación de especies microbianas mediante el uso de métodos fenotípicos puede, en algunos casos, ser incierta, complicada y consume mucho tiempo. El empleo de métodos moleculares ha revolucionado la identificación, mejorando su calidad y eficacia. Algunas de estas metodologías utilizan el ADNr o sus regiones espaciadoras como blanco. Estas técnicas son útiles tanto para la identificación y detección confiable de diferentes especies bacterianas, así como también para el monitoreo de las mismas (Blaiotta y col., 2008). De esta forma, los integrantes de un inóculo probiótico multicepa, pueden ser identificados diferenciándolos entre ellos o con otras cepas que comparten el mismo ambiente como por ejemplo los starters en los alimentos como yogurt o quesos.

El uso de primers o sondas específicos de especie no es aplicable en ambientes donde se encuentren diversas especies de *Lactobacillus* ya que es necesario el conocimiento previo de las mismas. En estos casos se deben aplicar herramientas moleculares más generales (Blaiotta y col., 2008). Las técnicas más utilizadas son la comparación de secuencias parciales o totales del gen 16S ADNr, patrones de ARDRA del 16S ADNr o de la región intergénica del 16S-23S ADNr para la identificación de especies de *Lactobacillus* en diferentes ambientes (Guan y col., 2003; Heilig y col., 2002; Delfederico y col., 2005).

Mientras que el uso de la metodología de secuenciación del 16S ADNr otorga una alta resolución de la diversidad de las especies microbianas en un determinado ambiente, es una técnica que consume mucho tiempo y es demasiado costosa para ser implementada como método de rutina en la búsqueda de cepas en muestras complejas. Los métodos utilizados para un primer análisis de muestras de materia fecal deben ser rápidos y mostrar un panorama general de la ecología microbiana. La técnica de ARDRA fue utilizada para comparar aislamientos bacterianos en un gran rango de comunidades microbianas. La ventaja de dicha técnica es que es rápida, reproducible, genera una vista previa de la diversidad microbiológica, y es práctica a la hora de evaluar un gran número de muestras con objetivos experimentales tales como intervenciones en la dieta (Ziemer y col., 2004).

La técnica de ARDRA permitió diferenciar a *Enterococcus hirae* del resto de los aislamientos los cuales correspondían a *Lactobacillus* spp. Esta diferenciación pudo ser observada mediante la restricción con cualquiera de las 3 enzimas utilizadas.

Los *Lactobacillus* aislados pertenecían a 2 grupos: grupo *L. casei-Pediococcus* y grupo *Leuconostoc* en el cual se encuentra *Weissella paramesenteroides* y otros *Lactobacillus*. Esta especie puede ser diferenciada del grupo *L. casei-Pediococcus* por el perfil de restricción característico obtenido con las enzimas *Hae* III y *Hinf* I.

La metodología aplicada permitió además la distinción entre especies filogenéticamente relacionadas pertenecientes al grupo *L. casei-Pediococcus*, como *L. ruminis*, *L. salivarius*, *L. curvatus*, *P. acidilactici*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. mucosae*, que poseen una homología del 16S ADNr del 90,3 al 99% (Vandamme y col., 1996).

La similitud entre los perfiles obtenidos mediante el estudio *in silico* de las secuencias presentes en el GenBank y los aislamientos permitió determinar que las cepas de la misma especie presentan perfiles similares. Este estudio resultó ser una herramienta más para corroborar la identificación hasta el nivel de especie. La obtención de estos perfiles diferenciables entre los aislamientos, sumado a la diferenciación de los mismos con otras especies relacionadas (tabla 9) demuestra que esta técnica permite en gran medida la distinción de especies con alto porcentaje de homología. Tal es el caso de *E. faecium* y *E. faecalis* que también fueron halladas en el intestino de terneros (Schneider y col., 2004) y las mismas pueden ser distinguibles de *E. hirae* por medio de la restricción con la enzima *Hinf* I. Dentro de los mismos grupos filogenéticos existen especies con mayor homología que otras como por ejemplo *L. fermentum* y *L. reuteri* que son las más estrechamente relacionadas a *L. mucosae* (Roos y col., 2000). A pesar de tales similitudes, el estudio *in silico* demostró que esta última también se diferencia de las 2 primeras por la metodología de ARDRA (Tabla 9). Estos resultados validan la técnica de ARDRA como una herramienta altamente discriminativa entre las especies de BAL, que permitiría agrupar los aislamientos por especie, y luego realizar la secuenciación de algunos de los exponentes de cada grupo. Esto ahorraría tiempo y dinero cuando se necesita analizar gran número de aislamientos.

*L. salivarius*, que fue la especie predominante en este trabajo, también fue detectada por Schneider y col., (2004) en terneros jóvenes criados en la misma zona

geográfica. *L. salivarius* es un habitante recurrente del tracto gastrointestinal de otras especies tales como pollos (Guan y col., 2003), cerdos (Thanantong y col., 2006) y humanos (Silvi y col., 2003; Heiling y col., 2002). Muchas cepas que corresponden a esta especie han sido evaluadas en cuanto a sus propiedades probióticas. Algunas de ellas aisladas en infantes demostraron poseer capacidad antimicrobiana contra patógenos (Lee y col., 2003) y *L. salivarius* CTC2197 fue capaz de prevenir la colonización de *Salmonella enteritidis* en pollos (Pascual y col., 1999).

La especie a la cual pertenece una determinada cepa no garantiza que la misma posea características probióticas debido a que estas propiedades benéficas son dependientes de cepas y es por eso que debe desarrollarse un estudio funcional. Las cepas deben ser consideradas GRAS, poseer efecto probiótico y capacidades tecnológicas adecuadas para ser propagadas y conservadas a través del tiempo. Los productos probióticos de uso veterinario que están actualmente en el mercado, son multicepa y contienen *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Saccharomyces* spp., *Propionibacterium* spp., *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp., entre otros (Soto y col., 2009).

El análisis molecular de las poblaciones benéficas que habitan el tracto gastrointestinal y el consecuente conocimiento de su composición es crítico para el desarrollo y comercialización de los productos probióticos (Tannock, 2001).

El monitoreo con técnicas moleculares permitiría evaluar el efecto producido por el consumo de probióticos en la microbiota fecal y podría utilizarse para seleccionar en estudios *in vivo* las cepas más aptas y la forma de administración más adecuada.

## **5.2. Selección de las cepas aisladas**

### **5.2.1. Estudio de las propiedades probióticas *in vitro***

Solo un porcentaje de las cepas en estudio evidenciaron capacidad de autoagregación a diferentes tiempos. Estos resultados corroboran que dicha característica es específica de cepa y que está en relación con la producción de Fpa (Cesena y col., 2001). Esta técnica sencilla puede ser utilizada como primer paso para la selección de cepas con potencial capacidad de adherencia a células del epitelio intestinal y posteriormente pueden ser sometidas a estudios más específicos para la evaluación de la adherencia a células eucariotas en estudios *in vitro* e *in vivo*.

A su vez, la producción de Fpa no implica que las células productoras coagreguen con cualquier otro tipo de bacterias. Cepas tales como *L. salivarius* DSPV 326T tuvieron la capacidad de unirse a un solo genotipo *E. coli* y los aislamientos *E. hirae* DSPV 320T y *L. curvatus* DSPV 352T no fueron capaces de unirse a ninguno de los patógenos indicadores a pesar ser productoras de Fpa. De los 3 indicadores utilizados, *S. dublin* DSPV 595T fue la más sensible, evidenciando la formación de arenilla en menor tiempo y con mayor cantidad de BAL, por lo que dicha cepa fue la más adecuada para el estudio de esta característica. Los resultados aquí obtenidos validan las investigaciones anteriores que han mostrado que la coagregación entre pares de bacterias es altamente específico y esta mediado por una proteína adhesina en un tipo de células y con un receptor sacárido complementario en la otra célula (Rickard y col., 2003).

Al igual que con las propiedades de agregación y coagregación, el efecto inhibitor del ELC depende de la BAL productora. También las cepas indicadoras presentan diferentes susceptibilidades a las sustancias inhibitorias propias de cada cepa. *E. coli* DSPV 284T fue la cepa más sensible a las sustancias inhibitorias. Esta característica demuestra que dicho patógeno es de utilidad para la búsqueda de sustancias inhibitorias. Debido a que los ELC con pH neutro no produjeron inhibición, es posible que algunos aislamientos hayan mostrado capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas patógenas estudiadas, debido al efecto que provoca el ácido láctico sobre las mismas. La producción de ácidos orgánicos por las BAL disminuye el pH del ambiente y lo convierte en selectivo contra los microorganismos sensibles al bajo pH (Gotcheva y col., 2002). Otra de las posibilidades es que el cambio de pH desnaturalice las sustancias proteicas (bacteriocinas) intervinientes en la inhibición. Las bacteriocinas, excepto en raras excepciones (Du Toit y col., 1998), son activas frente a otras BAL. Por lo que no se puede descartar que algunas de estas cepas sean productoras de bacteriocinas. Estos resultados pueden estar en relación con el hecho de que las bacteriocinas generalmente no inhiben bacterias Gram negativas (Servin y Coconnier, 2003).

El control potencial de patógenos intestinales por BAL con capacidades probióticas es de interés para el uso preventivo y terapéutico de infecciones intestinales. Las cepas que no presentan ninguna de las características estudiadas, no fueron tenidas

en cuenta en los siguientes estudios siendo descartadas para la conformación del inóculo probiótico.

### 5.2.2. Estudio de la resistencia a condiciones gastrointestinales

La tolerancia al ácido y la resistencia a la bilis, son características deseadas y necesarias que deben poseer las cepas que actúan en el tracto gastrointestinal.

En este trabajo se estudió la capacidad de multiplicación de las cepas a diferentes pHs, siendo ésta, una prueba más exigente que la evaluación del mantenimiento de la viabilidad en dichas condiciones. Todas las cepas demostraron alta resistencia a pH 4 o más alto, multiplicándose en tales medios. Pocas bacterias pueden tolerar pH menores a 3, pero la habilidad de sobrevivir y crecer en ambientes de bajo pH es característico de las BAL (Marteau y col., 1997). Las cepas del grupo 2 y 3, resultaron ser las adaptadas a las condiciones evaluadas.

Luego del pasaje a través de las condiciones gástricas del estómago, las bacterias deben atravesar la barrera que presenta el intestino con la presencia de sales biliares. Diferentes autores, que han evaluado la resistencia a bilis de las cepas, han utilizado concentraciones de bilis obteniendo resultados variados entre los diferentes microorganismos (Gusils y col., 2002; Gotcheva y col., 2002; Mishra y Prasad, 2005). El efecto del estrés producido por la bilis sobre las cepas de *Lactobacillus* es complejo debido a la variación de la concentración de bilis y el tiempo de pasaje dentro de las diferentes partes del sistema gastrointestinal. Ha sido estimado que algunas cepas sobreviven a concentraciones de sales biliares mayores a las fisiológicas (De Smet y col., 1995). Todas las cepas en estudio crecieron en todas las concentraciones de bilis evaluadas por lo que se puede inferir que todas muestran resistencia a la bilis. Además, este estudio permitió diferenciar claramente a aquellas que mejor crecimiento presentaron, que fueron las BAL del grupo 3. Estas cepas tienen mayores posibilidades de crecer en aquellas porciones del intestino que mayor cantidad de sales biliares presenten (yeyuno). La resistencia a bilis de algunas cepas está relacionada a la actividad enzimática específica de la hidrolasa de sales biliares (HSB) la cual ayuda a hidrolizar la bilis conjugada, reduciendo los efectos tóxicos. La actividad de esta enzima ha sido observada en algunas cepas asociadas al tracto gastrointestinal, de diferentes especies de *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, etc. (Du Toit y col., 1998).

Algunos autores relacionan la presencia de HSB con la capacidad de la cepa para reducir el colesterol al interferir en el ciclo enterohepático (Du Toit y col., 1998). La pérdida de sales biliares con la materia fecal induce el requerimiento de colesterol como precursor de la síntesis de nuevas sales biliares, lo que podría reducir los niveles de colesterol (de Rodas y col., 1996).

Cuando se prueban los probióticos *in vitro*, generalmente se hacen crecer en medios de laboratorio. Las características de las cepas crecidas en contenido intestinal varían respecto a las características de las mismas crecidas en tales medios. Por ello, utilizando medios de cultivo que tengan nutrientes similares a los que se hallan en el contenido intestinal, se puede tener una idea más acabada de la acción de los probióticos *in vivo* (Tuomola y col., 2001).

Los resultados permitieron determinar cuáles eran los mejores exponentes con más chances de llegar al sitio de acción y ejercer su efecto y se seleccionó a *Lactobacillus plantarum* DSPV 354T para evaluar su efecto probiótico en una experiencia *in vivo*.

### **5.3. Conservación en condiciones de refrigeración y congelación**

Es necesario que el inóculo cuente con una cantidad satisfactoria de microorganismos en el momento de ser administrado al animal para posibilitar la expresión de sus efectos probióticos. Esto tiene especial importancia, además, cuando se pretende industrializar el inóculo, aplicando algún proceso de conservación, debido a la necesidad de contar con una cantidad de microorganismos suficientes como para compensar la disminución del número de células causada por el propio proceso tecnológico y durante la etapa de almacenamiento. Se ha mencionado que  $10^6$  UFC/ml es el NMR de bacterias aplicables para producir los efectos probióticos (Vinderola y col., 2000). Por otra parte, se ha verificado que la inoculación de  $10^9$  UFC/kg de peso vivo fue suficiente para mostrar un efecto de colonización y permanencia, representado por los altos niveles del inóculo presentes en el tracto intestinal de terneros criados en sistemas intensivos (Frizzo y col., 2007; Frizzo y col., 2010). En algunos casos de productos probióticos veterinarios comerciales se detallan las cepas componentes del inóculo, pero no dan información acerca de la concentración celular que contienen. Otros productos especifican estos valores que superan el NMR, pero contienen hasta 8

especies distintas y no detallan la cantidad de cada una de ellas. Por otro lado, en algunos casos tampoco se informa la dosis recomendada de tales inóculos (tabla 1).

En cuanto a las diferentes condiciones de almacenamiento se pudo observar que la refrigeración resultó adecuada, sólo en el corto plazo, mientras que para la conservación a largo plazo sería necesario congelar el inóculo. Esto estaría demostrando que durante el almacenamiento en condiciones de refrigeración el efecto del estrés celular afecta directamente su viabilidad (Gilliland y Lara, 1988).

Se puede afirmar que la leche resultó ser el medio que mejor conservó las cepas estudiadas, tanto en condiciones de refrigeración como de congelación. Éstos resultados están mostrando una importante ventaja del medio leche por sobre el medio específico (MRS), que estaría dada por el efecto crioprotector que le ha sido atribuido a la leche (De Antoni y col., 1989).

Los resultados obtenidos permitieron observar una respuesta diferente de cada una de las cepas frente a los medios de cultivo y las condiciones de almacenamiento estudiadas siendo *L. casei* DSPV 318T la cepa que resultó más sensible al efecto del frío. Estos resultados coinciden con lo indicado por Juárez Tomás y col. (2004), quienes informaron que el comportamiento diferencial entre cepas podría estar relacionado con los distintos tipos y proporciones de ácidos grasos de la fracción lipídica. En el caso de *P. acidilactici* DSPV 006T, se mantuvo un alto porcentaje de viabilidad durante 360 días, resultado que coincide con las observaciones de Perez Guerra y col. (2007), quienes determinaron una escasa pérdida de viabilidad (0,22 Log UFC/ml) para *P. acidilactici* NRRL B-5627 almacenado durante 3 meses en leche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Por su parte, *L. casei* DSPV 318T en medio leche y condiciones de congelación, si bien disminuyó su porcentaje de viabilidad, mantuvo el NMR hasta el final del estudio, concordando con lo informado por Juárez Tomás y col. (2004) para *L. paracasei* CRL 1251 y *L. paracasei* CRL 1289 que mantuvieron altos recuentos durante un año.

El almacenamiento en condiciones de congelación es usado comúnmente para preservar la viabilidad de BAL durante un largo período de tiempo manteniendo sus propiedades tecnológicas (actividad acidificante, propiedades organolépticas, etc.) (Fonseca y col., 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron determinar que la congelación es un método muy efectivo para el mantenimiento del inóculo durante un año. Saxelin y col. (1999) informaron que con temperaturas inferiores a  $-35$

°C se obtienen altos recuentos celulares por 12 meses, no obstante en este trabajo la viabilidad se mantuvo en valores elevados conservando las células a -20 °C. Si consideramos que durante el período de congelación el metabolismo de los microorganismos está reducido al mínimo, el mayor aporte de nutrientes que puede ofrecer el MRS como medio específico para las BAL pierde importancia relativa frente al beneficio del efecto crioprotector que brinda la matriz láctea (Juárez Tomás y col., 2004). Esto justificaría que los mejores resultados se obtuvieran con el medio leche y en condiciones de congelación.

La adición de diferentes crioprotectores a la leche (extracto de levadura, sacarosa, etc.), para mejorar la supervivencia de los microorganismos ha sido documentada (Østlie y col., 2003; Juárez Tomás y col., 2004). Los resultados anteriormente expuestos tienen mayor valor si se considera que fueron obtenidos sin el agregado de crioprotectores. Esto deja, además, planteada la posibilidad de verificar potenciales mejoras mediante la realización de nuevos estudios con la suplementación de dichas sustancias.

El principal interés industrial para conservar probióticos en condiciones de refrigeración está relacionado con la fabricación de alimentos refrigerados destinados a la alimentación humana, en especial yogures. En estas matrices los microorganismos presentan poca estabilidad y generalmente no mantienen el NMR dentro del tiempo de vencimiento (Schillinger, 1999), situación que difiere a lo observado en las leches acidificadas (Vinderola y col., 2000). En este estudio, en el cual las características de la matriz correspondieron a una leche acidificada, el NMR se mantuvo al menos hasta los 84 días (*L. casei* DSPV 318T) y hasta el año en el caso de *L. salivarius* DSPV 315T y *P. acidilactici* DSPV 006T.

La habilidad de las cepas probióticas para sobrevivir al pasaje a través del tracto gastrointestinal puede ser atribuida, principalmente, a su tolerancia al ácido y a la bilis. Esta es una característica de las cepas que puede ser mejorada por la acción de los alimentos transportadores (Charalampopoulos y col., 2003). De esta forma, la leche actuaría como medio de desarrollo microbiano, matriz de conservación y medio protector que impida la pérdida de viabilidad *in vivo* a la hora de su administración oral.

La preparación del inóculo en medio leche y su almacenamiento en refrigeración o congelación, evita el costo añadido de la separación de los microorganismos del

medio de cultivo (centrifugación, filtración, etc.) y el agregado de medios nuevos para almacenarlos. La desventaja es que los concentrados líquidos, mantenidos mediante el uso del frío, tienen altos costos de transporte y almacenamiento (Mattila-Sandholm y col., 2002), motivo por el cual se justifica la realización de nuevos estudios que permitan evaluar otras formas de conservación (microencapsulación, liofilización, etc.) o formulaciones farmacéuticas para productos veterinarios (tabla 1) y comparar los costos de las distintas tecnologías. En todos estos casos se debe realizar el estudio de la estabilidad microbiológica, para cada una de las técnicas evaluadas y verificar las posibilidades reales de administrar el inóculo a los terneros en el campo.

#### **5.4. Suplementación de leche con hidrolizados proteicos como medio de crecimiento de BAL**

El crecimiento de los microorganismos que formaron parte de este trabajo mostró diferencias para cada una de las cepas y para cada medio de cultivo estudiado. Esto está en relación, por un lado, con los requerimientos propios de cada microorganismo y, por otra parte, con la oferta de nutrientes que le fue suministrada. Las BAL son capaces de crecer en leche, pero ésta no es un medio óptimo de desarrollo (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 1998). En algunos casos se debe enriquecer con fuentes de energía, precursores para la división y el desarrollo celular y con sustancias estimulantes del crecimiento (Elli y col., 1999), en especial para poder compensar las diferentes habilidades que tienen las bacterias probióticas para metabolizar la lactosa y las proteínas de la leche (Østlie y col., 2003). Algunos ejemplos de estos casos han sido puestos en evidencia; por ejemplo, *L. rhamnosus* GG fue incapaz de fermentar lactosa, y *Bifidobacterium animalis* BB12 y *L. reuteri* SD 2112 no crecieron bien en leche sin la adición de triptona (Østlie y col., 2003). En otros casos fue necesario adicionar sustancias químicas indefinidas para que las cepas de *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. amylovorus* y *L. gallinarum* pudieran crecer en leche descremada al 10% p/v y en leche UHT (Elli y col., 1999). A pesar de estos antecedentes y considerando que el crecimiento fue mejor en el medio de cultivo específico estudiado (MRS), las cepas utilizadas en este trabajo fueron capaces de crecer en el medio leche.

El enriquecimiento de los medios de cultivos con los hidrolizados proteicos puede tener 2 finalidades, uno es el aporte de aminoácidos y el otro es la acción de los péptidos bioactivos generados bajo el tratamiento de hidrólisis.

Sólo algunos hidrolizados de plasma han aportado beneficios al crecimiento bacteriano. Incluso, algunos han disminuido el desarrollo de las células respecto al medio leche sin suplementar. La hidrólisis del plasma, fue muy incompleta, por lo que se podrían haber generado menor cantidad de aminoácidos libres y mayor cantidad de péptidos, algunos de los cuales pueden haber tenido actividad antimicrobiana (Dziuba y Darewicz, 2007).

Algunos péptidos bioactivos han sido identificados dentro de la secuencia aminoacídica de las proteínas nativas de la leche (Clare y Swaisgood, 2000). Una gran proporción de estos péptidos tiene actividad antimicrobiana y muchos de ellos son derivados de la acción de enzimas digestivas. En nuestro estudio, los péptidos derivados de la leche, bajo determinadas condiciones de hidrólisis, no produjeron inhibición para ninguna de las cepas evaluadas. Tampoco se observó dicho efecto en los hidrolizados de gluten.

En un proceso industrial, la utilización de extracto de levaduras puede ser prohibitiva debido al costo (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 1997). Los hidrolizados de gluten y de caseína poseen altos ITCA, por lo que gran parte de la proteína está disponible para las bacterias como aminoácidos libres. Debido a lo dicho anteriormente y al menor costo en relación al extracto de levaduras, estos hidrolizados son una fuente aminoacídica útil para el desarrollo bacteriano de este inóculo en base leche.

#### **5.5. Conservación de *L. casei* DSPV 318T por encapsulación en perlas de alginato de calcio y almidón**

El gran tamaño de las cápsulas tiene una ventaja con respecto de las microcápsulas, que es la mayor resistencia a las condiciones gástricas, lo cual está en relación con la barrera física y el incremento de la distancia de las bacterias con el medio (Lee y Heo, 2000; Muthukumarasamy y col., 2006).

Por otro lado, la encapsulación permitió obtener un producto final con un recuento celular mayor a los obtenidos en los cultivos libres, por lo que resulta de interés para la producción de un suplemento probiótico con altas cargas microbianas.

La producción de cápsulas de alginato con la adición de almidón presentó una serie de ventajas. Por un lado, la constitución de la perla permite una mayor concentración celular dentro de la misma. Esto puede deberse a que la cápsula queda menos compacta y los poros serían capaces de contener mayor cantidad de células. Esto está en relación con la mayor concentración celular encontrada en las perlas con menor concentración de alginato (tabla 16). La búsqueda de la concentración óptima de los polímeros que forman la matriz de la cápsula debe equilibrar una concentración bacteriana adecuada y una conformación resistente. El reemplazo de la mitad del alginato por el almidón, mejoró la concentración celular y además no se observaron diferencias macroscópicas en cuanto a la consistencia. Por otro lado, se disminuye el costo de producción, debido a que el almidón es mucho más económico que el alginato.

Estas 2 formulaciones evaluadas, han sido las que mejor resistieron a las condiciones gástricas estudiadas por Muthukumarasamy y col. (2006) en comparación con otros polímeros, lo cual se le atribuye a la naturaleza protectora de las redes generadas con polímeros durante la encapsulación. Este autor también observó que las cápsulas producidas por el método de extrusión fueron más resistentes a los jugos gástricos y a la bilis que las producidas por la técnica de emulsión.

La incubación de las perlas en medio nutritivo, además de aumentar la concentración bacteriana, produce una activación celular que protege a los microorganismos durante el proceso de secado. Este mismo proceso mantuvo mayor viabilidad de las células atrapadas en el trabajo realizado por Turker y Hamamci (1998) en comparación con el secado de las cápsulas sin incubación previo al secado, las cuales no presentaron actividad post secado. Este resultado, también estuvo relacionado con la carga microbiológica que aumenta durante la activación de las cápsulas. Este proceso supone el llenado de los poros con las células, lo cual afecta la porosidad de la perla, y por lo tanto el secado. El volumen de las perlas secas previamente activadas es mucho mayor a las no activadas, por lo cual, el tiempo de secado es mayor (Turker y Hamamci, 1998).

Al estudiar la concentración de microorganismos presentes en las perlas secas, se comprobó que las mismas poseían recuentos celulares superiores a las húmedas. Esto se puede deber a que la pérdida de agua disminuye el volumen de la cápsula provocando un aumento de la cantidad de células por g de perla.

Las perlas poseen una especie de “piel” periférica que se ve incrementada con los materiales de cobertura (Krasaekoopt y col., 2004). Este aumento en el grosor externo de las perlas, permitió que las cápsulas que tuvieron ese tratamiento mantuvieran mayor viabilidad celular que las no recubiertas posiblemente, debido a una mayor protección de las bacterias frente a los factores ambientales perjudiciales.

La sensibilidad al ambiente de muchas cepas probióticas a menudo limita su uso práctico en alimentos no refrigerados y suplementos farmacéuticos. La tecnología de encapsulación puede mejorar la viabilidad de las cepas durante el almacenamiento (Crittenden y col., 2006). Las cápsulas recubiertas y secas, mantuvieron el NMR por 21 días a temperatura ambiente. Por lo tanto, las cápsulas podrían ser adicionadas al balanceado, conservando la viabilidad necesaria para ejercer su efecto probiótico durante dicho periodo.

La otra posibilidad es mantener las cápsulas probióticas separadamente del balanceado, en refrigeración. De esta manera, los probióticos tendrían un tiempo de vencimiento mayor (por lo menos 2 meses), y serían mezclados con el balanceado al momento de ser consumidos por los terneros. Esta opción deja abierta la posibilidad de adicionar las perlas al sustituto lácteo o a la leche, para aquellos terneros que no consumen balanceado.

Los métodos de secado por liofilización o secado spray para la preservación de probióticos adicionados a alimentos no es la mejor opción porque el contacto directo con el producto disminuye su viabilidad, lo cual requiere de la inoculación de mayor número de microorganismos para alcanzar los beneficios deseados. La encapsulación es una alternativa para la solución de este problema (Muthukumarasamy y col., 2006). Esta técnica tiene una ventaja adicional relacionada con la protección que ejerce la cápsula a las condiciones gástricas (Picot y Lacroix, 2004).

La utilización de leche en reemplazo de los medios comerciales disponibles para el crecimiento de *Lactobacillus* y la sustitución de un porcentaje de alginato por almidón, disminuyó considerablemente los costos de producción. Esto se verá reflejado en un producto final de alta concentración probiótica accesible para la crianza artificial de terneros, con un periodo de vencimiento suficientemente prolongado y un tamaño similar al balanceado, por lo que podrá ser mezclado homogéneamente con el mismo y administrado al animal de este modo (Havenaar y col., 1992).

### **5.6. Desafío experimental frente a *Salmonella dublin* DSPV 595T en terneros lactantes inoculados con lactosa y BAL conservadas por congelación**

La disminución de peso durante la primera parte del experimento es considerada normal durante las primeras semanas de vida de los animales, y se puede deber al estrés del transporte (Adams y col., 2008) y a la adaptación al nuevo sitio de crianza. El aumento de peso en el GP fue mayor al GC en los animales que sobrevivieron a la salmonelosis. A pesar de ello la diferencia entre ambos grupos no fue significativa, posiblemente debido a la disminución del número de individuos al final del experimento.

La ausencia de signos clínicos durante los primeros 10 días del experimento puso en evidencia el buen estado de salud de los terneros antes de la infección experimental. Luego de la administración del patógeno, todos los animales mostraron al menos 1 signo de enfermedad. La presencia de dicha signología fue más frecuente durante los primeros 10 días post inoculación de *Salmonella*. La dosis infectiva de *S. dublin* DSPV 595T utilizada en este trabajo correspondió a la DL<sub>50</sub>; la mitad de los terneros de cada uno de los grupos murieron entre de los 3 y 13 días post infección. Los animales que lograron sobrevivir demostraron estar en una etapa de reversión de la enfermedad. Estos animales, si bien podrían liberar *Salmonella* en forma esporádica por materia fecal o presentar lesiones características de haber sufrido la infección ya no presentaban signos de enfermedad. Paulin y col. (2002) utilizaron una dosis de *S. dublin* menor a la utilizada en este trabajo (6 Log UFC). Esto provocó que solamente la mitad de los terneros manifestaran signos de enfermedad y se produjera en ellos la muerte espontánea debido a la acción del patógeno. La cantidad de *Salmonella* utilizada en este ensayo fue adecuada debido a que el objetivo era evaluar el efecto probiótico del inóculo administrado, por lo que todos los animales debían enfermar. Los signos clínicos aportaron a este trabajo la evidencia de la enfermedad, pero estos parámetros no lograron probar de manera significativa si el tratamiento con BAL producía en el hospedador una respuesta diferente del GC.

La propagación de las BAL en leche y su conservación por congelación resultó adecuada para una efectiva administración, ya que el inóculo fue encontrado en altas cargas en la materia fecal de los terneros. Esta metodología de crecimiento en leche también fue utilizada por Abu-Tarboush y col. (1996) para la cepa *L. acidophilus* 27SC,

pero con una conservación en refrigeración por un periodo no mayor a 1 semana. En este trabajo se utilizó lactosa junto a la administración del inóculo probiótico debido que ha sido corroborado en estudios anteriores que la combinación de ambas herramientas aumenta el recuento de *Lactobacillus* por lo que puede contribuir a mejorar el estado sanitario en la crianza de los terneros (Frizzo y col. 2006a).

Anadón y col. (2006) proponen que la población de *Lactobacillus* en intestino está entre  $10^7$  y  $10^8$  UFC/g. En el GP los *Lactobacillus* no disminuyeron de 6 Log UFC/g, aún después de la infección. En cambio, dicha población en el GC disminuyó, por debajo de los valores propuestos aún antes de la infección con *Salmonella*. Es decir, que los terneros en un sistema de crianza artificial, alimentados con sustituto lácteo, fueron disminuyendo la población de *Lactobacillus* a medida que crecieron. Ozawa y col. (1983) observaron que la población de *Lactobacillus* disminuye con la utilización de una dieta que contiene antibióticos y que la administración periódica de BAL conlleva a la estabilización de esta población en los terneros.

El aumento de las poblaciones de coliformes puede ser debido al estrés que sufren los terneros al cambio de sitio, lo cual se vio reflejado en la disminución del peso. Esta condición se revirtió en el día 10, cuando los animales ya se adaptaron a tales condiciones.

La relación *Lactobacillus*/coliformes presentó diferencias entre ambos grupos y, además, la relación para el GP fue mayor a 1 y para GC menor que 1 en esos días. Abu-Tarboush y col. (1996) relaciona este índice con la presencia/ausencia de diarrea; los animales que presentan diarrea tienen un índice menor a 1 y los sanos presentan un índice mayor a 1. En este trabajo, la frecuencia de diarrea fue similar en ambos grupos, pero en el GC la característica de la misma mostró niveles más severos. Si esta relación se mantuvo mayor a 1 en los animales tratados con probióticos, aún después del padecimiento de una salmonelosis, es de esperar que en condiciones normales, los coliformes presentes en el intestino no desencadenen diarreas debido a la gran cantidad de *Lactobacillus* presentes.

La población de levaduras se modificó debido a la administración del probiótico. Ozawa y col. (1983) observaron que la administración de BAL produjo una disminución de la población de levaduras, contrariamente a lo que sucedió en nuestro estudio. La suplementación con levaduras vivas ha demostrado ser útil para mejorar la resistencia a

enfermedades y la eficacia productiva (Cole y col., 1992). Esta población podría tener un efecto sobre las otras poblaciones, debido a componentes de pared de la levadura (mananos) o a un efecto directo de la levadura viva evitando el establecimiento de bacterias patógenas y los efectos de los metabolitos tóxicos producidos por ellas (Frizzo, 2007).

La administración del inóculo probiótico produjo una relación *Lactobacillus/Enterococcus* en la microbiota de estos animales mayor a la misma relación en el GC. El género *Enterococcus*, presente en el tracto intestinal de los animales puede resultar problemático por la presencia de resistencia transmisible a antibióticos (Anadón y col., 2006). Por otra parte, microorganismos de este mismo género han sido utilizados como suplemento probiótico en varias especies (Szabó y col., 2009; Taras y col., 2006).

Un efecto claro de la administración de probióticos se vio reflejado en la respuesta inmune entre ambos grupos. La respuesta específica de los animales del GP se vio incrementada luego de la infección, a la vez que la respuesta innata en dicho grupo disminuyó. Este comportamiento se vio reflejado en el recuento de leucocitos y más específicamente en el de neutrófilos. Al final del experimento, cuando los animales ya demostraban haber superado la infección, los valores de linfocitos volvieron a la normalidad. En cambio el GC no demostró diferencias en las respuestas inmunológicas a lo largo de la experiencia a pesar de la infección. Los valores de la serie leucocítica estuvieron dentro de los niveles normales, a excepción de los neutrófilos, durante la primera parte del experimento, siendo superiores a los valores de referencia para adultos durante los primeros 30 días de vida del ternero (Knowles y col., 2000).

El descenso general en la producción de IgA en materia fecal para los terneros a medida que pasa el tiempo está soportado por investigaciones anteriores (Heinrichs y col., 2009). En este estudio, los animales del GC mostraron una tendencia a dicho comportamiento, disminuyendo la producción de anticuerpos en el yeyuno luego de la infección. En cambio, los animales del GP mantuvieron los mismos valores una vez superada la enfermedad. Esto podría deberse a una constante estimulación del sistema inmune por parte de las bacterias administradas, ya que las reacciones del centro germinal de las placas de Peyer que preferentemente genera IgA y células B específicas

de antígeno, depende de la estimulación por parte de los antígenos bacterianos entéricos (Shroff y col., 1995).

Los valores de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito permanecieron dentro de los valores normales en los 2 grupos a lo largo de toda la experiencia, pero se pudo observar que luego de la infección con *Salmonella*, los 3 parámetros comenzaron a disminuir con respecto a los valores encontrados antes de la infección experimental.

La enzima AST evidenció el daño hepático producido por la infección arrojando valores más altos luego de la infección con el patógeno. En cambio, la GGT presentó un comportamiento normal y característico de los terneros jóvenes. Esta enzima estaba por encima de los rangos normales al inicio del experimento, debido a que la misma se incorpora a través del calostro (Kurz y Willett, 1991; Weaver, 2000). Luego, los valores de la enzima se normalizaron y no se vieron modificados a causa de la infección. La urea permaneció dentro de los rangos normales durante todo el tiempo, aún después de la infección. De todas maneras, la concentración de urea presentó un pico en el día 20. El inóculo probiótico no ejerció ningún efecto detectable a través de estas enzimas y de la urea.

En el día 15 de la experiencia, se detectó *Salmonella* en materia fecal sólo en algunos de los animales. Con este resultado, se podría pensar que no todos los terneros estaban infectados, sin embargo, todos los animales mostraban al menos un signo clínico de infección. Esto se debe a que la bacteria no es eliminada en forma continua, por lo que, es posible, que un animal que muestre signos típicos de salmonelosis, no resulte positivo en la búsqueda bacteriológica del microorganismo a partir de las heces (Forbes y col., 1977). La no detección de *Salmonella* en sangre, tampoco denota la ausencia real de la misma en el animal. Algunos de los individuos que presentaban ausencia de *Salmonella* en sangre y heces, luego murieron a causa de la infección y la bacteria fue encontrada en el medio interno del ternero. La colonización por parte de *S. dublin* DSPV 595T se produjo en todos los órganos estudiados y se encontró en alta frecuencia en los animales que murieron espontáneamente en ambos grupos. Estos resultados corroboran la alta virulencia que presenta esta especie de *Salmonella* (Paulin y col., 2002). Esta translocación fue similar en ambos grupos, por lo que se puede concluir que el inóculo probiótico no afectó la translocación del patógeno. A su vez, se

encontró *Salmonella* en algunos órganos de algunos animales que sobrevivieron a la infección y que aún eran portadores de la misma.

El ingreso de *Salmonella* por vía oral, la proliferación en el intestino delgado y su rápida penetración en la lámina propia provoca edema, proliferación de macrófagos, reclutamiento de linfocitos y PMN con dilatación del quilífero central de las vellosidades. Esto genera una caída pronunciada de los enterocitos apicales y a una reacción proliferativa en el fondo de las criptas (enteritis regenerativa). El ciclo se descompensa rápidamente, provocando una atrofia y fusión de las vellosidades. La bacteria invade los nódulos linfáticos regionales con reclutamiento de macrófagos y PMN. Lo mismo acontece en las venas de la submucosa produciendo flebitis y tromboembolias. Los trastornos circulatorios llevan a una lesión irreversible apical de las vellosidades con necrosis, hemorragias y exudación de fibrina (enteritis fibrinonecrótica). La diseminación bacteriana por la vía hemolinfática provoca la etapa de septicemia o bacteriemia transitoria con compromiso de los nódulos linfáticos mesentéricos, el hígado y el bazo (Jubb y col., 1988; Tizard, 1996; Robbins, 2000).

Los animales que murieron espontáneamente a causa de la infección, presentaron mayor cantidad de lesiones y de mayor severidad que los animales sacrificados al final de la experiencia. A su vez, las lesiones características de *Salmonella* fueron observadas con mayor frecuencia y mayor nivel de severidad en los órganos diana. Las lesiones producidas en el bazo del GC, de los animales que murieron espontáneamente, presentaron mayor severidad que las del GP. Este resultado fue corroborado por la observación tanto macroscópica como microscópica. A su vez, la lesión patognomónica de *Salmonella*, los nódulos paratifoideos, estuvieron presentes en el bazo de los animales del GC con mayor frecuencia que en el GP. Este proceso es consecuencia de la bacteremia y del reclutamiento de macrófagos y PMN en la pulpa roja del órgano. Por lo dicho anteriormente, se pudo determinar que el inóculo probiótico tuvo una incidencia sobre este órgano que estaría relacionada con una respuesta distinta de los animales referida a la protección de los mismos ante el patógeno. Los pulmones de los animales inoculados con el probiótico también mostraron lesiones menos graves, según lo observado macroscópicamente, pero esto no fue corroborado por el análisis microscópico por lo que no es factible llegar a una

conclusión definitiva sobre el efecto del tratamiento en cuanto a la protección de este órgano.

Las lesiones encontradas en los animales que lograron revertir la enfermedad fueron menos graves en general, lo cual denota tanto, el paso del patógeno como la gradual recuperación de los animales. Las diferencias encontradas en las lesiones de estos animales no corresponden a los órganos diana.

Ha sido demostrado por otros autores (Abe y col., 1995, Timmerman y col., 2005) que la administración de probióticos protege contra la diarrea causada por bacterias patógenas. En este caso, la administración de bacterias patógenas en una cantidad elevada, no permitió que el probiótico ejerza su efecto al punto de disminuir la translocación de *Salmonella* y el consecuente desarrollo de la enfermedad y muerte. Pero la modificación de la microbiota intestinal, la mayor respuesta inmune específica, y la protección de ciertos órganos a las lesiones características de *Salmonella* en el GP denota un efecto benéfico en el hospedador. Estos resultados, hacen suponer la posibilidad de que la administración del inóculo probiótico sea efectiva como herramienta profiláctica en el control de los patógenos. Esto fue observado por Ozawa y col. (1983) que vieron disminuida la cantidad de *Salmonella* que estaba presente normalmente en el intestino por la adición de *S. faecalis* BIO-4R.

### **5.7. Evaluación de la performance de terneros suplementados con 2 inóculos probióticos conservados por congelación**

El sistema de alimentación utilizado en este ensayo presentó la problemática de que los tanques que contienen la leche no son refrigerados. Por tal motivo, la leche permanecía durante 12 h en el tanque, y luego se descartaba la leche restante. Posteriormente, se lavaba el recipiente y se volvía a llenar con leche fresca. Esta metodología, no solamente produce una pérdida económica por la leche descartada, sino que además, puede provocar una disminución en los rendimientos de producción por las diarreas y muertes producidas debido al consumo de este alimento no seguro. La leche almacenada de esta forma se convierte en un medio de cultivo óptimo para muchos microorganismos, incluyendo patógenos. Este problema se acrecienta sobremanera durante los meses cálidos de primavera-verano en donde la leche debe ser reemplazada

con mayor frecuencia o deben, necesariamente, incorporarse inhibidores del crecimiento microbiano.

En este trabajo, la adición de BAL en la leche, produjo la fermentación de la misma, evidenciada con la disminución del pH. Este aumento de la acidez del medio, disminuyó los riesgos del crecimiento de cepas alterantes ó patógenas, convirtiéndolo en un alimento más seguro. Como consecuencia, tampoco fue necesario descartar la leche, debido a que la misma podía ser mantenida en el tanque hasta que fuera consumida en su totalidad, evitando pérdidas económicas.

La acidez de la leche, no modificó la palatabilidad de la misma, sino que por el contrario, la leche fermentada fue consumida en mayor cantidad que la fresca. Keith y col., (1983) evaluaron la influencia sobre la palatabilidad de leche de descarte fermentada y leche de descarte fermentada con el agregado de bicarbonato de sodio para neutralizar la acidez. Estos autores observaron que no hubo diferencias en el consumo de ambos tipos de leche. Además, según Netke y col., (1962) la alimentación de terneros con leche ácida no influye negativamente en el contenido de materia seca de las heces, en la excreción fecal diaria o en la incidencia de diarreas.

Los terneros alimentados con la leche suplementada con probióticos presentaron un mayor consumo, tanto de leche como de balanceado. Esta estimulación del consumo puede ser atribuida en parte a la acidez ocasionada por la fermentación de la leche. Este aumento del consumo debido al bajo pH del alimento líquido fue observado por Davis y Drackley (2001), en cuyo trabajo, los terneros alimentados con sustituto lácteo acidificado consumieron más materia seca y tuvieron una mayor ganancia de peso que los terneros alimentados en forma convencional.

El desarrollo del rumen abarca una serie de procesos que deben comenzar en la primera etapa de vida del ternero si se pretende realizar un destete precoz con alimento sólido a una edad temprana (4-6 semanas). Los procesos del desarrollo comienzan con cambios anatómicos y fisiológicos de los tejidos del rumen (Davis y Drackley, 2001). Los cambios iniciales dependen únicamente del consumo de alimento seco, junto con la fermentación microbiana de la materia orgánica en ácidos grasos volátiles. Los ácidos butírico y propiónico son los que brindan el mayor estímulo para el crecimiento y desarrollo del tejido epitelial del rumen. El desarrollo de los preestómagos y de las papilas absortivas responde más al consumo de granos, por lo que se debe estimular el

consumo de alimento seco a una edad temprana (Davis y Drackley, 2001). Estos autores proponen que el destete se realice cuando el ternero consume entre 0,7 y 0,9 kg de balanceado. Por lo tanto, cuanto antes llegue el animal a consumir esta cantidad, antes será realizado el destete, con los consecuentes beneficios económicos.

La acidez del alimento, influye en el pH del abomaso. Woodford y col. (1987) evaluaron el efecto sobre el pH del abomaso de terneros alimentados con sustituto lácteo común y sustituto lácteo acidificado, encontrando una diferencia significativa entre ambos grupos. El efecto de los ácidos orgánicos en el abomaso tiene una influencia directa sobre la microbiota. A su vez, el establecimiento de la población microbiana del rumen parece seguir un patrón relacionado con los sustratos disponibles y el pH ruminal. A medida que aumenta el consumo de alimento seco, el ácido láctico se transforma en el principal producto de la fermentación lo que provoca una caída del pH ruminal (Davis y Drackley, 2001).

Es evidente que, además del efecto beneficioso producido por la leche acidificada, los microorganismos administrados, seleccionados por sus efectos probióticos, tuvieron un rol fundamental en la estimulación del consumo. Así, las cepas utilizadas en este trabajo, aportaron los beneficios buscados para el rápido desarrollo del rumen del ternero. Lo contrario sucedió en el trabajo de Morril y col. (1977) quienes observaron que la suplementación de leche cultivada con *L. acidophilus* y *L. lactis*, no estimuló el consumo de alimento seco.

La estimulación del consumo, fue evidenciada por los dos grupos probióticos, pero sólo los terneros del grupo B tuvieron un peso significativamente mayor al grupo control. El grupo A, que mostró un consumo de alimento líquido y seco similar al del grupo B, no logró diferenciarse del grupo control en cuanto al peso de los terneros, pero tampoco fue diferente al grupo B. Debido a que en la semana 3, el aumento de peso fue significativamente superior al de las semanas anteriores, hace suponer la posibilidad de que el aumento de peso podría haber sido significativamente diferenciable en las semanas posteriores.

La ausencia de diferencias en los recuentos de *Lactobacillus* en materia fecal entre los grupos suplementados con probióticos y el control, podría deberse a la presencia de *Lactobacillus* ambientales multiplicados en la leche de los tanques sin refrigeración con el que cuenta el sistema de crianza mencionado precedentemente. Si

bien la cantidad de *Lactobacillus* en la leche del grupo control fue menor ( $P < 0,05$ ) a la cantidad de *Lactobacillus* en los grupos probióticos, hubo un consumo constante de este género en los animales controles.

Existió una diferencia en la relación inóculos/*Lactobacillus*. El grupo B tuvo una mayor relación que el grupo A, y este último fue disminuyendo en el tiempo, mientras que el grupo B se mantuvo constante. Esta diferencia, podría explicar por qué el aumento de peso del grupo A, a pesar de ser mayor al del grupo control, no pudo ser diferenciado estadísticamente, a la vez que tampoco fue diferente al grupo B. En el grupo B la mayoría de los *Lactobacillus* fueron reemplazados por *L. plantarum* DSPV 354T y esta modificación en la microbiota podría considerarse como una de las responsables de la mejora en la performance de crecimiento de los animales tratados con dicho inóculo.

El resto de las poblaciones evaluadas presentaron comportamientos similares a través del tiempo en los diferentes grupos. La población de levaduras disminuyó a lo largo de las semanas, lo cual puede estar relacionado con que la población total de microorganismos aeróbicos y facultativos disminuye durante las 4-6 semanas de edad, posiblemente, debido a los cambios del tipo de sustrato disponibles (Davis y Drackley, 2001).

La mayor relación entre los *Lactobacillus* y el resto de las poblaciones estudiadas en los grupos probióticos, demuestra la influencia de la administración de los inóculos sobre el ecosistema microbiano presente en el intestino, especialmente en el grupo B.

Además del beneficio propio de la conservación de la leche que ejerció la disminución del pH, esta característica estimuló el consumo, tanto de alimento líquido como sólido, lo cual aceleraría el destete de los animales. Por otro lado, la cantidad de *Lactobacillus* presentes en el tracto gastrointestinal es un factor importante, pero en este trabajo se determinó que el reemplazo de la población de los lactobacilos indígenas, por las cepas probióticas seleccionadas y conservadas, tuvo un efecto benéfico sobre los terneros. En el grupo control, las cepas indígenas del intestino, provenientes del medio ambiente, no produjeron los mismos efectos. De este resultado se desprende la importancia de la selección de las cepas con las mejores características probióticas, para que ejerzan los efectos deseados. Estos inóculos podrían ser utilizados para el

mejoramiento del crecimiento de los terneros, lo que aceleraría el pasaje de lactante a rumiante (Adams y col., 2008) y produciría una disminución en los costos de producción. Por otro lado se propone que la cepa *L. plantarum* DSPV 345T sea adicionada al inóculo conformado por *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T para potenciar los efectos probióticos de este inóculo multiespecie.

## **6. CONCLUSIONES**

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis y su discusión con los aportes de otros autores se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

- Este estudio permitió determinar que la técnica de ARDRA, mediante la utilización de las enzimas *Hae* III, *Msp* I y *Hinf* I, posibilitó la distinción entre especies de *Enterococcus* y *Lactobacillus* altamente relacionadas y pertenecientes al mismo grupo filogenético. También se determinó que *L. salivarius* fue la especie predominante en el tracto gastrointestinal de los terneros estudiados. Esta especie fue encontrada en el ciego de todos los individuos y en algunos de los animales resultó ser la única especie aislada.
- La evaluación *in vitro* de las propiedades probióticas, así como la resistencia a las condiciones gastrointestinales de las cepas aisladas, corrobora y extiende los datos de la literatura, demostrando que las características probióticas son específicas de cepa. Los estudios desarrollados permitieron determinar cuáles eran los mejores exponentes. *Lactobacillus plantarum* DSPV 354T fue seleccionado por considerarlo la cepa con más chances de llegar al sitio de acción para ejercer su efecto probiótico, el cuál fue demostrado en el estudio *in vivo*.
- El inóculo conformado por las cepas *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T puede ser almacenado en leche, manteniendo valores superiores al NMR durante 84 días en condiciones de refrigeración y hasta 360 días en condiciones de congelación. Todo ello permitirá una adecuada conservación a través del tiempo y posibilitará que el suplemento probiótico pueda ser administrado en condiciones de campo en las guacheras del tambo.
- El enriquecimiento de la leche con algunos hidrolizados proteicos de diferente naturaleza aumentó el desarrollo microbiológico de las cepas *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T. Este estudio permitió determinar que el grado de hidrólisis depende de la naturaleza de la fuente proteica, la enzima utilizada y el tiempo de hidrólisis empleado. A su vez, cada uno de estos hidrolizados tuvo un efecto

diferente sobre el crecimiento de cada cepa en particular. Por ello, se seleccionó y utilizó un hidrolizado de caseína con un ITCA del 54% para mejorar el desarrollo de la biomasa del inóculo en estudio.

- Se desarrolló una metodología de producción de macrocápsulas de un volumen de 2 ml como transportadores de las bacterias probióticas. Las perlas están compuestas de alginato de calcio y almidón y poseen un recubrimiento de quitosano. Estas perlas pueden ser conservadas a temperatura de refrigeración durante un periodo de 2 meses. Dicha metodología facilitará la administración del suplemento probiótico a terneros en el campo pudiendo incorporarse tanto en un alimento líquido como en uno sólido.
- La metodología de conservación por congelación en matriz láctea resultó ser una metodología adecuada para administrar el inóculo en las condiciones de campo. Tanto el inóculo conformado por las cepas *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T, como el conformado por *Lactobacillus plantarum* DSPV 354T, mantuvieron la viabilidad celular, lo cual se evidenció en las altas cargas de los microorganismos probióticos encontrados en la materia fecal de los terneros.
- Aunque el inóculo probiótico (*Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T) no fue capaz de disminuir la translocación de *S. dublin* DSPV 595T y el consecuente desarrollo de la enfermedad y muerte de los animales el mismo ejerció un profundo efecto sobre la microbiota intestinal el cual tuvo consecuencias sobre la respuesta inmune específica de los animales.
- La suplementación de la leche para terneros con el inóculo probiótico conformado por *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T, y el conformado por *Lactobacillus plantarum* DSPV 354T incrementó el consumo precoz de balanceado, lo cual facilitaría un rápido desarrollo ruminal. Todo ello permitiría

un destete anticipado de los animales y mejoraría los índices de producción de la guachera.

- La cepa *Lactobacillus plantarum* DSPV 354T demostró su efecto probiótico en los estudios *in vivo* mejorando la performance de los terneros. Esta cepa podría ser adicionada al inóculo conformado por *Lactobacillus casei* DSPV 318T, *Lactobacillus salivarius* DSPV 315T y *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T para potenciar los efectos probióticos en un inóculo multiespecie.

## **7. RESUMEN**

El objetivo general de este trabajo fue determinar las mejores condiciones de conservación de un inóculo, conformado por bacterias ácido lácticas indígenas con capacidades probióticas, para que al ser administrado en el campo a terneros lactantes criados en condiciones artificiales les brinde protección frente a las bacterias patógenas productoras de diarrea. Para ello, en primer lugar se realizó un aislamiento de lactobacilos a partir de la mucosa de ciego y yeyuno de terneros jóvenes criados en condiciones intensivas. Luego se realizó la identificación de los aislamientos por la metodología de ARDRA y secuenciación del gen 16S ARNr. Las cepas pertenecían a las especies *L. plantarum*, *P. acidilactici*, *W. paramesenteroides*, *L. salivarius*, *L. ruminis*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. mucosae* y *E. hirae*. La especie encontrada con más frecuencia fue *L. salivarius*.

Luego las cepas fueron evaluadas en cuanto a sus propiedades probióticas, realizando las pruebas de agregación, coagregación con patógenos y producción de sustancias inhibitoras. Aquellas que presentaron alguna de las características probióticas fueron sometidas a las pruebas de resistencia a las condiciones gástricas y a la bilis. Para ello se evaluó el crecimiento de las cepas en pH 6,5; 5; 4; 3 y 2 y en 1; 2; 3; 4; 5; 6; y 7% de bilis. Los resultados permitieron seleccionar los mejores exponentes y *Lactobacillus plantarum* DSPV 354T fue seleccionado por considerarlo la cepa con mas chances de llegar al sitio de acción para ejercer su efecto probiótico, el cuál fue demostrado en el estudio *in vivo*.

Por otro lado se evaluó la suplementación de leche con hidrolizados proteicos como medio de crecimiento de BAL, con el objetivo de estimular el desarrollo de un inóculo probiótico de origen bovino compuesto por *L.casei* DSPV 318T, *P. acidilactici* DSPV 006T y *L. salivarius* DSPV 315T. Para ello se evaluó el grado de hidrólisis de diferentes fuentes proteicas: caseína, gluten y plasma por medio de la utilización de distintas proteasas (alcalasa, neutrasa y acidasa). Se obtuvieron 13 hidrolizados con diferentes grados de hidrólisis, y cada uno tuvo un efecto diferente. Se seleccionó, un hidrolizado de caseína con un ITCA del 54% para mejorar el desarrollo de la biomasa del inóculo en estudio.

Además se estudiaron diferentes metodologías de conservación. Por un lado se evaluó la viabilidad del inóculo probiótico en matriz láctea almacenados en condiciones de refrigeración (4 °C) y congelación (-20 °C), y se realizaron recuentos bacterianos cada 21 días durante un período de 3 meses y a los 6, 9 y 12 meses (180, 270 y 360

días). La conservación de este inóculo con recuentos bacterianos superiores al nivel mínimo recomendado ( $10^6$  UFC/ml), en la leche, fue posible durante 84 días en condiciones de refrigeración y 360 días en congelación.

Otra metodología de conservación evaluada fue la encapsulación. Para este estudio se utilizó una de las cepas componentes del inóculo antes mencionado (*L. casei* DSPV 318T). El objetivo puntual de esta parte del estudio fue desarrollar una metodología de producción de cápsulas grandes, del tamaño del balanceado suministrado a los terneros, con el fin de poder adicionar el probiótico en el alimento seco. Para la conformación de las perlas se evaluaron diferentes medios de propagación de la biomasa, distintas formulaciones para la conformación de la matriz de cápsula, crecimiento de la biomasa dentro de la cápsula por incubación de la misma en un medio de cultivo y viabilidad de las células en perlas recubiertas con un polímero y no recubiertas, secas y húmedas y almacenadas en diferentes temperaturas. De estos estudios se obtuvo un protocolo de producción de macrocápsulas de un volumen de 2 ml compuestas de alginato de calcio y almidón y poseen un recubrimiento de quitosano. Estas perlas pueden ser conservadas secas a temperatura de refrigeración durante un periodo 2 meses.

Se realizaron 2 estudios *in vivo* en terneros para la evaluación de las propiedades probióticas de las BAL conservadas en matriz láctea en congelación. En el primer estudio se estudió el efecto de la suplementación del inóculos probióticos (*L. casei* DSPV 318T, *P. acidilactici* DSPV 006T y *L. salivarius* DSPV 315T) y lactosa, frente a un desafío con *Salmonella dublin* DSPV 595T. En el segundo ensayo se evaluó el efecto sobre la performance de los terneros del inóculo anteriormente descrito y de la cepa *L. plantarum* DSPV 354T. La metodología de conservación por congelación en matriz láctea, resultó ser adecuada para administrar el inóculo en las condiciones de campo de ambos inóculos debido a que mantuvieron la viabilidad celular, lo cual se evidenció en las altas cargas de los microorganismos probióticos encontrados en la materia fecal de los terneros.

En el primer ensayo se determinó: peso de los animales, signos clínicos que evidencien la infección, variación de la microbiota intestinal, perfil bioquímico y leucograma, presencia de *Salmonella* en materia fecal, sangre y translocación en órganos del medio interno, índice del peso esplénico, lesiones micro y macroscópicas en órganos y producción de IgA en yeyuno. La dosis de *Salmonella* administrada fue la  $DL_{50}$ . No se encontraron diferencias entre el GC y GP en cuanto a la morbilidad y

mortalidad de los terneros. Todos los animales manifestaron signos de infección y murieron espontáneamente el 53% de los animales de cada grupo. Los animales que sobrevivieron a la infección fueron sacrificados al final del experimento.

Aunque el inóculo probiótico no fue capaz de disminuir la translocación del patógeno y el consecuente desarrollo de la enfermedad y muerte de los animales el mismo ejerció un profundo efecto sobre la microbiota intestinal el cual tuvo consecuencias sobre la respuesta inmune específica de los animales. Estos resultados, hacen suponer la posibilidad de que la administración del inóculo probiótico sea efectiva como herramienta profiláctica en el control de los patógenos.

En el segundo ensayo se evaluó el peso de los terneros, el consumo de leche y balanceado y la modificación de la microbiota intestinal. Se determinó que la alimentación de los animales con leche suplementada con ambos inóculos probióticos estimulaba el consumo tanto de alimento líquido como seco, lo cual facilitaría un rápido desarrollo ruminal y permitiría un destete anticipado de los animales mejorando los índices de producción de la guachera. Por otro lado se determinó que los animales inoculados con *L. plantarum* DSPV 354T tenían un peso mayor al grupo control luego de 3 semanas de la administración del inóculo. La cepa *L. plantarum* DSPV 354T demostró su efecto probiótico en los estudios *in vivo* mejorando la performance de los terneros. Esta cepa podría ser adicionada al inóculo conformado por *L. casei* DSPV 318T, *L. salivarius* DSPV 315T y *P. acidilactici* DSPV 006T para potenciar los efectos probióticos en un inóculo multicepa.

Palabras clave: probióticos, conservación, terneros jóvenes, bacterias ácido lácticas.

## **8. ABSTRACT**

The general aim of this study was to determine the best conditions of conservation of an inoculum, consisting of indigenous lactic acid bacteria with probiotic capabilities, so that when administered in the field of nursing calves reared in artificial conditions to protect them against pathogenic bacteria producing of diarrhea. To do this, first conducted a lactobacilli isolation from the mucosa of cecum and jejunum of calves reared in intensive conditions. Later, the identification of isolates was made by the methodology of ARDRA and 16S rRNA gene sequencing. The strains belonged to the species *P. acidilactici*, *W. paramesenteroides*, *L. salivarius*, *L. ruminis*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. mucosae* y *E. hirae*. The species most commonly found was *L. salivarius*.

Then, the strains were evaluated for their probiotic properties, making aggregation tests, co-aggregation with pathogens and production of inhibitory substances. Those who showed any of the probiotic properties were subjected to tests for resistance to gastric and bile conditions. This was assessed using media with pH 6.5, 5, 4, 3 and 2 and 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7% of bile for the growth of strains. This was assessed using culture media with pH 6.5, 5, 4, 3 and 2 and 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7% of bile for the growth of strains. The results allowed to select the best exponents, *Lactobacillus plantarum* DSPV 354T was selected by considering the strain with more chances to reach the target site to exert their probiotic effects, which was demonstrated in an *in vivo* study.

On the other hand was evaluated supplementation of milk with protein hydrolysates as a growing medium of lactic acid bacteria, with the aim of stimulating the development of a bovine probiotic inoculum composed of *L.casei* DSPV 318T, *P. acidilactici* DSPV 006T y *L. salivarius* DSPV 315T. It was assessed the degree of hydrolysis of different protein sources: casein, gluten and plasma through the utilization of different proteases (alcalase, neutrase and acidase). Thirteen hydrolysates were obtained with different degrees of hydrolysis, and each had a different effect. Was selected, a casein hydrolyzate with an TCAI of 54% to improve the development of biomass of inoculum in the study. Also different methods of conservation were studied. On one hand, was assessed the viability of probiotic inoculum in milk matrix stored under refrigeration (4 °C) and freezing (-20 °C), and bacterial counts were performed every 21 days during a period of 3 months and at 6, 9 and 12 months (180, 270 and 360 days). The conservation of this inoculum with bacterial counts above the recommended

minimum level ( $10^6$  CFU/ml) in milk, it was possible for 84 days under refrigeration and for 360 days under freezing conditions.

Another method of preservation evaluated was encapsulation. For this study, a component of the inoculum strains mentioned above was used (*L. casei* DSPV 318T). The specific aim of this part of the study was to develop a methodology for producing large capsules, of the size of the balanced feed for calves, in order to add the probiotic in the dry food. For the formation of the pearls were evaluated different media of biomass growth, different formulations for the formation of the capsule matrix, biomass growth within the capsule by incubating it in a culture medium, and viability of cells in beads coated with a polycation and uncoated, dry and wet and stored at different temperatures. From these studies we obtained a protocol for production of macrocapsules of a volume of 2 ml using calcium alginate and starch and with a coating of chitosan. These pearls can be stored dry at refrigeration temperature for a period of 2 months.

2 studies *in vivo* were performed in calves to evaluate the probiotic properties of LAB preserved in frozen milk matrix. In the first study was explored the effect of supplementation of probiotic inocula (*L. casei* DSPV 318T, *P. acidilactici* DSPV 006T y *L. salivarius* DSPV 315T) and lactose, face a challenge with *Salmonella dublin* DSPV 595T. In the second trial, the effect on performance of calves of the inoculum described above and the strain *L. plantarum* DSPV 354T was evaluated. The methodology of conservation by freezing milk matrix, proved to be adequate to manage the inoculum in field conditions because both inocula maintained cell viability, which was evidenced at high loads of probiotic microorganisms found in the stool calves.

In the first trial was determined: weight of the animals, clinical signs which demonstrate the infection, variation of the intestinal microbiota, biochemical profile and white blood cell count, presence of *Salmonella* in feces, blood, and translocation in organs of the internal environment, spleen weight index, macro- and microscopic lesions in organs and IgA production in the jejunum. The dose of *Salmonella* administered was the LD<sub>50</sub>. No differences were found between the GC and GP in terms of morbidity and mortality of calves. All animals showed signs of infection and died spontaneously the 53% of the animals in each group. The animals that survived the infection were sacrificed at the end of the experiment.

Although the probiotic inoculum was not able to decrease the translocation of the pathogen and the consequent development of the illness and death of the animals, it

had a profound effect on the intestinal microbiota which had an impact on the specific immune response in animals. These results, suggest the possibility that the administration of the probiotic inoculum is effective as a prophylactic tool in controlling pathogens.

In the second trial the weight of calves, milk and starter consumption, and modification of the intestinal microbiota, were evaluated. It was found that feeding animals with milk supplemented with two probiotic inocula stimulated consumption of both liquid and dry food, which would facilitate rapid rumen development and early weaning of animal allowing to improve production rates of calf rearing. In addition it was found that animals inoculated with *L. plantarum* DSPV 354T had a greater weight to the control group after 3 weeks of administration of the inoculum. The strain *L. plantarum* DSPV 354T showed probiotic effects in the *in vivo* study improving the performance of calves. This strain could be added to the inoculum composed by *L. casei* DSPV 318T, *L. salivarius* DSPV 315T and *P. acidilactici* DSPV 006T to enhance the probiotic effects in a multicepa inoculum.

Keywords: probiotics, conservation, young calves, lactic acid bacteria.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

- Abe, F.; Ishibashi, N. y Shimamura, S. 1995. Effect of administration of *Bifidobacteria* and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.*, 78: 2838-2846.
- Abu-Tarboush, H.; Al-Saiady, M. y Keir El-Din, A. 1996. Evaluation of diet containing Lactobacilli on performance, fecal coliform, and lactobacilli of dairy calves. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 57: 39-49.
- Adams, M.C.; Luo, J.; Rayward, D.; King, S.; Gibson, R. y Moghaddam, G.H. 2008. Selection of a novel direct-fed microbial to enhance weight gain in intensively reared calves. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 145: 41-52.
- Al-Zenki, S; Al-Nasser, A.Y.; Al-Saffar A.; Abdullah, F.; Al-Bahouh, M.; Al-Haddad, A., Alomirah, H. y Mashaly, M. 2009. Effects of using a chicken-origin competitive exclusion culture and probiotic cultures on reducing *Salmonella* in broilers. *Appl. Poult., Res.* 18: 223-29.
- Anadón, A; Martínez-Larrañaga, M.R y Aranzazu Martínez, M. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45: 91-95.
- Annan, N.T; Borza, A.D. y Truelstrup Hansen L. 2008. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res. Int.*, 41: 184–193.
- Aso, Y.; Akaza, H. y Kotake, T. 1992. Prophylactic effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. *Oral Int.*, 49: 125-129.

- Bajpai S.K y Sharma, S. 2004. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *React. Funct. Polym.*, 59: 129-140.
- Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J; Ostell, J.; Rapp, B.A. y Wheeler, D.L. 2000. GenBank. *Nucl. Acids Res.*, 28: 15-18.
- Berge, A.C.B; Lindeque, P.; Moore, D.A. y Sischo, W.M. 2005. A Clinical Trial Evaluating Prophylactic and Therapeutic Antibiotic Use on Health and Performance of Preweaned Calves. *J. Dairy Sci.*, 88: 2166 - 2177.
- Blaiotta, G.; Fusco, V.; Ercolini, D.; Aponte, M.; Pepe, O. y Villani, F. 2008. *Lactobacillus* Strain Diversity Based on Partial *hsp60* Gene Sequences and Design of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assays for Species Identification and Differentiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 208-215.
- Blood, D.C.; S.A. Henderson y Radostits, O.M. 1986. *Medicina Veterinaria*. 6a. ed., Ed. Interamericana, México. pp. 58.
- Boris, S.; Suarez, J.E. y Barbes, C. 1997. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 413-420.
- Britti, M.S.; Roselli, M.; Finamore, A.; Merendino, N. y Mengheri, E. 2006. Regulation of immune response at intestinal and peripheral sites by probiotics. *Biologia*, 61: 735-740.
- Bujnakova, D. y Kmet, V. 2002. Aggregation of Animal Lactobacilli with O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Med. Vet.*, 49: 152-154.
- Callaway, T.R.; Anderson, R.C.; Edrington, T.S.; Elder, R.O.; Genovese, K.J.; Bischoff, K.M.; Poole, T.L.; Jung, Y.S.; Harvey, R.B. y Nisbet, D.J. 2002. Preslaughter

- intervention strategies to reduce food-borne pathogens in food animals. *J. Anim. Sci.*, 81: 17-23.
- Callaway, T.R.; Anderson, R.C.; Edrington, T.S.; Genovese, K.J.; Bischoff, K.M.; Poole, T.L.; Jung, Y.S.; Harvey, R.B. y Nisbet, D.J. 2004. What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *J. Anim. Sci.*, 82: E93-99.
- Canny, G.O. y McCormick, B.A. 2008. Bacteria in the Intestine, Helpful Residents or Enemies from Within? *Infect. Immun.*, 76: 3360 - 3373.
- Cebra, J.J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am. J. Clinical Nutrition*; 69: 1046S - 1051S.
- Cesena, C.; Morelli, L.; Alander, M.; Siljander, T.; Tuomola, E.; Salminen, S.; Mattila-Sandholm, T.; Vilpponen-Salmela, T. y von Wright, A. 2001. *Lactobacillus crispatus* and its Nonaggregating Mutant in Human Colonization Trials. *J. Dairy Sci.*, 84: 1001–1010.
- Champagne, C.; Mondou, F.; Raymond, Y. y Roy, D. 1996. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Res. Int.*, 29: 555-562.
- Champagne, C.P.; Gardner, N.J.; Soullignac, L. y Innocent, J.P. 2000. The production of freeze-dried immobilized cultures of *Streptococcus thermophilus* and their acidification properties in milk medium. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 124–131.
- Champagne, C.P. y Gardner, N.J. 2001. The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze-drying. *Electronic J. Biotechnol.*, 3: 146-152.

- Chandramouli, V.; Kailasapathy, K, Peiris, P. y Jones, M. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *J. Microbiol. Meth.*, 56: 27- 35.
- Charalampopoulos, D.; Pandiella, S.S. y Webb, C. 2003. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 82: 133-141.
- Clare, D. y Swaisgood, H. 2000. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *J. Dairy Sci.*, 83: 1187-1195.
- Cleveland, J.; Montville, T.J.; Nes, I.F. y Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 1-20.
- Cole, N.A.; Purdy, C.W. y Hutchesont, D.P. 1992. Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *J. Anim. Sci.*, 70: 1682-1690.
- Corr, S.; Li, Y.; Riedel, C., O'Toole, P.; Hill, C. y Gahan, C. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Microbiol.*, 104: 7617-7621.
- Crittenden, R.; Weerakkody, R.; Sanguansri, L. y Augustin, M. 2006. Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 2280-2282.
- Darwin, K.H. y Miller, V.L. 1999. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 405-428.
- Davis, C.L. y Drackley, J.K. 2001. Desarrollo, nutrición y manejo del ternero joven. Intermédica, Buenos Aires.

- De Antoni, G.L.; Perez, P.; Abraham, A. y Añon, M.C. 1989. Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*. *Cryobiology*, 26: 149-153.
- De Boever, P.; Deplancke, B. y Verstraete, W. 2000. Fermentation by Gut Microbiota Cultured in a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem Is Improved by Supplementing a Soygerm Powder. *J. Nutr.*, 130: 2599-2606.
- De Man, J.D.; Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A médium for the cultivation of lactobacilli. *L. Appl. Bacteriol.*, 23: 130-135.
- De Rodas, B.Z.; Gilliland, S.E. y Maxwell, C.V. 1996. Hypocholesterolemic Action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and Calcium in Swine with Hypercholesterolemia Induced by Diet. *J. Dairy Sci.*, 79: 2121-2128.
- De Smet, I., van Hoorde, L., van de Woestyne, M.; Christiaens, H. y Verstraete, W. 1995. Significance of bile-salt hydrolitic activities of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 79: 292-301.
- Delfederico, L.; Hollmann, A.; Martínez, M.; Iglesias, N.G.; De Antoni, G. y Semorile, L. 2005. Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *J. Dairy Res.*, 72: 1-8.
- Dembezynski, R. y Jankowski, T. 2002. Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. *Enzyme Microb. Tech.*, 31: 111-115.
- Demecková, V.; Kelly, D.; Coutts, A.G.P.; Brooks, P.H. y Campbell, A. 2002. The effect of fermented liquid feeding on the faecal microbiology and colostrums quality of farrowing sows. *Int. J. Food Microbiol.*, 79: 85-97.
- Desmond, C.; Ross, R.P.; O'Callaghan, E.; Fitzgerald, G. y Stanton, C. 2002. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J. Appl. Microbiol.*, 93: 1003-1011.

- Doleyres, Y. y Lacroix, C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *Int. Dairy J.*, 15: 973-988.
- Draget, K.I.; Smidsrod, O.; Skjak-Braek, G. 2005. Alginates from algae. En: Steinbuchel, A. y Rhee, S.K. (eds). *Polysaccharids and polyamides in the Food Industry. Properties, production and patents.*
- Du Toit, M.; Franz, C.M.A.P.; Dicks, L.M.T.; Schillinger, U., Haberer, P.; Warlies, B.; Ahrens, F. y Holzapfel, W.H. 1998. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *I. J. Food Microbiol.*, 40: 93-104.
- Duffy, G.; Whiting, R.C. y Sheridan, J.J. 1999. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.*, 16: 299-307.
- Dunne, C.; O'Mahony, L.; Murphy, L.; Thornton, G.; Morrissey, D.; O'Halloran, S.; Feeney, M; Flynn, S.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; C O'Sullivan, G.; Shanahan, F. y Collins, J.K. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(suppl): 386S-92S.
- Dziuba, M. y Darewicz, M. 2007. Food Proteins as Precursors of Bioactive Peptides \_ Classification Into Families. *Food Sci. Tech. Int.*, 13: 393-403.
- Elli, M.; Zink, R.; Reniero, R. y Morelli, L. 1999. Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk medium. *Int. Dairy J.*, 9: 507-513.

- Ewaschuk, J.B.; Naylor, J.M.; Chririno-Trejo, M. y Zello, G.A. 2004. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Can. J. Vet. Res.*, 68: 249-253.
- FAO/WHO. 2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Expert consultation report: Córdoba, Argentina: Food and agriculture organization of the United Nations and World Health Organization, 1-4 October.
- FASS (Federation of Animal Science Societies). 1998. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. First rev. ed. Savoy IL: Federation of Animal Science Societies.
- Fonseca, F.; Béal, C. y Corrieu, G. 2001. Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*, 43: 189-198.
- Fonseca, F.; Béal, C.; Mihoub, F.; Marin, M. y Corrieu, G. 2003. Improvement of cryopreservation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 with additives displaying different protective effects. *Int. Dairy J.*, 13: 917-926.
- Forbes, D; Oakley, G y Mackenzie, J. 1977. Experimental *Salmonella dublin* infection in calves. *Vet. Rec.*, 101: 220 -224.
- Frizzo, L.S.; Peralta, C.; Zbrun, V.; Bertozzi, E.; Soto, L.; Marti, E.; Dalla Santina, R.; Sequeira, G. & Rosmini, M.R. 2005. Respuesta de ratones inoculados con bacterias lácticas de origen bovino a un desafío con *Salmonella dublin*. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias* 4: 41-53.
- Frizzo, L.S.; Soto, L.P.; Bertozzi, E.; Sequeira, G.; Marti, L.E. & Rosmini, M.R. 2006. Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *FAVE-Ciencias Veterinarias* 5: 61-72.

- Frizzo, L.S.; Soto, L.P.; Bertozzi, E.; Mayr, M.; Bonazza, J.C.; Sequeira, G.; Martí, L.E.; Rodríguez Armesto, R. & Rosmini, M.R. 2006a. Modificación en la población de *Lactobacillus* y Coliformes en la materia fecal de terneros suplementados con bacterias lácticas y lactosa. II Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. Primer encuentro Red BAL Argentina, San Miguel de Tucumán, 11 al 13 de octubre. p. 168.
- Frizzo, L.S. 2007. Utilización de microorganismos probióticos, seleccionados a partir de la microbiota indígena de bovinos lecheros, en animales de experimentación. Tesis de Maestría. Departamento de Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.
- Frizzo, L.S.; Zbrun, M.V.; Bertozzi, E.; Soto, L.P.; Sequeira, G.; Martí E.; Lajmanovich, R. y Rosmini, M.R. 2007. *Lactobacillus casei* DSPV 318T capacity to colonize and remain in mouse gastrointestinal tract. J. Anim. Vet. Adv., 6: 1158-1166.
- Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Soto, L.P.; Zbrun; M.V.; Sequeira, G.; Dalla Santina, R.; Rodríguez Armesto, R. & Rosmini, M.R. 2008. The effect of supplementation with three lactic acid bacteria from bovine origin on growth performance and health status of young calves. J. Anim. Vet. Adv. 7: 400-408.
- Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Soto, L.P.; Sequeira, G.; Rodríguez Armesto, R. y Rosmini, M.R. 2010. Studies of translocation, acute oral toxicity and intestinal colonization of potentially probiotic lactic acid bacteria administered during calf breeding. Livestock Sci. En prensa.
- Gaudreau, H.; Champagne, C.P.; Jelen, P. 2005. The use of crude cellular extracts of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 to stimulate growth of a probiotic *Lactobacillus rhamnosus* culture in milk medium. Enzyme Microb. Technol., 36: 83-90.

- Gill, H.S y Guarner, F. 2004. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad. Med. J.*, 80: 516-526.
- Gilliland, S.E.; Staley, T.E. y Bush, L.J. 1984. Importance of Bile Tolerance of *Lactobacillus acidophilus* Used as a Dietary Adjunct. *J. Dairy Sci.*, 67:3045-3051.
- Gilliland, S.E. y Lara, R.C. 1988. Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on 3-galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 898-902.
- Gomes, A.M.P, Malcata, F.X. y Klaver, F.A.M. 1998. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. *J. Dairy Sci.*, 81: 2817-2825.
- Gotcheva, V.; Hristozova, E.; Hristozova, T.; Guo, M.; Roshkova, Z. y Angelov, A. 2002. Assessment of Potential probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria and Yeast Strains. *Food Biotech.*, 16: 211-225.
- Grauke, L.J.; Kudva, I.T.; Yoon, J.W.; Hunt, C.W.; Williams, C.J.; y Hovde, C.J. 2002. Gastrointestinal Tract Location of *Escherichia coli* O157:H7 in Ruminants. *Appl. Envir. Microbiol.*, 68: 2269-2277.
- Guan, L.; Hagen, K.; Tannock, G.; Korver, D.; Fasenko, G. y Allison, G. 2003. Detection and Identification of *Lactobacillus* Species in Crops of Broilers of Different Ages by Using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 6750-6757.
- Gusils, C.; Bujazha, M y González, S. 2002. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. *Interciencia*, 27: 409-413.

- Hall, V., Lewis-Evans, T. y Duerden, B.I. 2001. Identification of Actinomyces, Propionibacteria, Lactobacilli and Bifidobacteria by Amplified 16S rDNA Restriction Analysis. *Anaerobe*, 7: 55-57.
- Hartemink, R.; Domenech, V.R. y Rombouts, F.M. 1997. LAMVAB-A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *J. Microbiol. Meth.*, 29: 77-84.
- Havenaar, R.; Ten Brink, B. y Huis in't Velt, J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotic use. En Fuller, R. (Ed.) *Probiotics, The Scientific Basis*. London, Chapman & Hall, p. 209-224.
- Heilig, H.; Zoetendal, E.; Vaughan, E.; Marteau, P.; Akkermans, A y de Vos, W. 2002. Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 114-123.
- Heinrichs, A.J.; Heinrichs, B.S.; Harel, O.; Rogers, G.W. y Place, N.T. 1995. A Prospective Study of Calf Factors Affecting Age, Body Size, and Body Condition Score at First Calving of Holstein Dairy Heifers. *J. Dairy Sci.*, 88: 2828-2835.
- Heinrichs, A.J.; Jones, C.M.; Elizondo-Salazar, J.A. y Terrill S.J. 2009 Effects of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. *Livest. Sci.*, 125: 149-154.
- Heller, K.J. 2001. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73: 374S-379S.
- Heyman, M. y Ménard, S. 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59: 1151-1165.

- Higginbotham, G.E.; Robison, J.D.; Atwill, E.R.; Das Gracas, M. y Pereira, C. 1998. Effect of a Direct-Fed Microbial Product on Calf Performance and Fecal Flora. *Professional Animal Scientists*, 14: 108-113.
- Higgins, S.E.; Higgins, J.P.; Wolfenden, A.D.; Henderson, S.N.; Torres-Rodriguez, A.; Tellez, G. y Hargis, B. 2007. Evaluation of a *Lactobacillus*-Based Probiotic Culture for the Reduction of *Salmonella* Enteritidis in Neonatal Broiler Chicks. *Poult. Sci.*, 86: 2315-2321.
- Hofvendahl, K. y Hahn-Hägerdal, B. 1997. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme Microb. Technol.*, 20: 301-307.
- Homayouni, A.; Azizi, A.; Ehsani, M.R.; Yarmand, M.S. y Razovi, S.H. 2008. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111: 50-55.
- Humblot, C.; Combourieu, B.; Väisänen, M.L.; Furet, J.P.; Delort, A.M. y Rabot, S. 2005. 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy-Based Studies of the Metabolism of Food-Borne Carcinogen 2-Amino-3-Methylimidazo[4,5-f]Quinoline by Human Intestinal Microbiota. *Appl. Envir. Microbiol.*, 71: 5116 - 5123.
- Hyun, C.K y Shin, H.K. 1998. Utilization of Bovine Blood Plasma Obtained from Slaughterhouse for Economic Production of Probiotics. *J. Ferment. Bioeng.*, 86: 34-37.
- Ingrassia, I.; Leplingard, A. y Darfeuille-Michaud, A. 2005. *Lactobacillus casei* DN-114 001 Inhibits the Ability of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Isolated from Crohn's Disease Patients To Adhere to and To Invade Intestinal Epithelial Cells. *Appl. Envir. Microbiol.*, 71: 2880-2887.

- Jenny, B.F.; Vandijk, H.J y Collins, A. 1991. Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. *J. Dairy Sci.*, 74: 1968-1973.
- Jones, G.M. y Seymour, E.H. 1988. Cowside Antibiotic Residue Testing. *J. Dairy Sci.*, 71: 1691-1699.
- Juárez Tomás, M.S., Ocaña, V.S. y Nader-Macías, M.E. 2004. Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage. *Anaerobe*, 10: 1-5.
- Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C. y Palmer, N. 1988. *Patología de los animales domésticos*. 3e. Montevideo, Hemisferio Sur.
- Keith, E.; Windle, L.; Keith, N & Gough, R. 1983. Feeding value of fermented waste milk with or without sodium bicarbonate for dairy calves. *J. Dairy Sci.*, 66: 833-839.
- Kim, M y Chun, J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int. J. Food Microbiol.*, 103: 91-96
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.*, 70: 337-349.
- Kolenbrander, P.E. 1988. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annu. Rev. Microbiol.*, 42: 627-656.
- Knowles, T.G; Edwards, J.E; Bazeley, K.J.; Brown, S.N; Butterworth, A y Warris, P.D. 2000. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Vet. Rec.* 147: 593-498.
- Krasaekoopt, W.; Bhandari, B. y Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.*, 13: 3-13.

- Krasaekoopt, W.; Bhandari, B. y Deeth, H. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, 14: 737-743.
- Krasaekoopt, W.; Bhandari, B. y Deeth, H.C. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT*, 39: 177-183.
- Kurz, M.M. y Willett, L.B. 1991. Carbohydrate, enzyme, and hematology dynamics in newborn calves. *J. Dairy Sci.*, 74: 2109-2118.
- Kurzak, P., Ehrmann, M.A. y Vogel, R. 1998. Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *System. Appl. Microbiol.*, 21: 588-592.
- Kurzak, P. 2000. Development of pathogen suppressive poultry feed supplements containing lactic acid bacteria from ducks. Ph.D. thesis. Technische Universität München.
- Kwon, S.; Lee, P.C.; Lee, E.G.; Chang, Y.K. y Chang, N. 2000. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hidrolisate. *Enzyme Microb. Technol.*, 26: 209-215.
- Langford, F.M.; Weary, D.M. y Fisher, L. 2003. Antibiotic Resistance in Gut Bacteria from Dairy Calves: A Dose Response to the Level of Antibiotics Fed in Milk. *J. Dairy Sci.*, 86: 3963-3966.
- Lee, D.J.; Drongowski, R.A.; Coran, A.G. y Harmon, C.M. 2000 Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. *Pediatr. Surg. Int.* 16: 237-242.
- Lee, K. y Heo, T. 2000. Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 869-873.

- Lee, Y.J., Yu, W.K., y Heo, T.R. 2003. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21: 340-346.
- Lian, W.; Hsiao, H. y Chou, C. 2003. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *J. Food Microbiol.*, 86: 293-301.
- Liong, M.T. y Shah, N.P. 2005. Optimization of Cholesterol Removal by Probiotics in the Presence of Prebiotics by Using a Response Surface Method. *Appl. Envir. Microbiol.*, 71: 1745-1753.
- Lu, L. y Walker, W.A. 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(suppl): 1124S-30S.
- Luyer, M.D.; Buurman, W.A.; Hadfoune, M.; Speelmans, G.; Knol, J.; Jacobs, J.A.; Dejong, C.H.C; Vriesema, A.J.M. y Greve, J.W.M. 2005. Strain-Specific Effects of Probiotics on Gut Barrier Integrity following Hemorrhagic Shock. *Infect. Immun.*, 73: 3686-3692.
- Mäyrä-Mäkinen, A. y Bigret, M. 1998. Industrial use and production of Lactic Acid Bacteria. En: Salminen, S.; von Wright, A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Funcional Aspects*, second ed. Marcel Dekker Inc., New York, p. 73-102.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 13: 208-218.
- Marteau, P; Minecus, M., Havenaar, R y Huis in't Veld, J.H.J. 1997. Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the Effects of Bile. *J. Dairy Sci.*, 80: 1031-1037.

- McCartney, A.L. 2002. Application of Molecular Biological Methods for Studing Probiotics and the Gut Flora. *Br. J. Nutrit.*, 88(Suppl. 1): S29-S37.
- Meyer, P.M.; Vaz Pires, A.; Vagadlo, A.R.; Correia De Simas, J.M. y Susin, I. 2001. Adição de probiótico ao leite integral ou sucedâneo e desempenho de bezerros da raça holandesa. *Scientia Agricola* 58: 215-221.
- Meyer, D.J. y Harvey, J.W. 2007 *Medicina laboratorial veterinaria interpretación y dignosis*. Ed. Gráfica IN-Multimédica S.A. p 424.
- Mishra, V. y Prasad, D.N. 2005. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 103: 109-115.
- Mohri, M.; Sharifi, K y Eidi, S. 2007. Hematology and serum biochemistry of holstein dairy calves: Age Related changes and comparison with blood composition in adults. *Res. Vet. Sci.*, 83: 30-39.
- Monticello, S.A. y Rusoff, L.L. 1961. Effect of a New Antibiotic, Spiramycin, on Young Dairy Calves. *J. Dairy Sci.*, 44: 1316-1321.
- Morrill, J.L.; Dayton, A.D. y Mickelsen, R. 1977. Cultured Milk and Antibiotics for Young Calves. *J. Dairy Sci.*, 60, 1105-1109.
- Morris, C.; Bardin, M.; Berge, O.; Frey-Klett, P.; Fromin, N.; Girardin, H.; Guinebretiere, M.; Lebaron, P.; Thiery, J. y Troussellier, M. 2002. Microbial Biodiversity: Approaches to experimental desin and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66: 592-616.
- Mustapha, A.; Jiang,T. y Savaiano, D.A. 1997. Improvement of Lactose Digestion by Humans Following Ingestion of Unfermented Acidophilus Milk: Influence of

- Bile Sensitivity, Lactose Transport and Acid Tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, 80:1537-1545.
- Muthukumarasamy, P.; Wojtas P. A. y Holley R. A. 2006. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *J. Food Sci.*, 71: 20-24.
- Naylor, S.W.; Nart, P.; Sales, J.; Flockhart, A.; Gally, D.L. y Low, J.C. 2007. Impact of the Direct Application of Therapeutic Agents to the Terminal Recta of Experimentally Colonized Calves on *Escherichia coli* O157:H7 Shedding. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 1493-1500.
- Netke, S.; Gardner, K y Kendall, K. 1962. Effect of diet pH on fecal consistency of young calves. *J. Dairy Sci.*, 45: 105-108.
- Nielsen, J.W.; Dickson, J.S. y Crouse, J.D. 1990. Use of a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici* To Inhibit *Listeria monocytogenes* Associated with Fresh Meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2142-2145.
- Østlie, H.M; Helland, H.M. y Narvhus, J.A. 2003. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk medium. *Int. J. Food Microbiol.*, 87: 17-27.
- Østlie, H.M.; Treimo, J. y Narvhus, J.A. 2004. Effect of the temperature on growth of probiotic bacteria in milk. *Int. Dairy J.*, 15: 989-997.
- Ozawa, K.; Yabu-Uchi, K.; Yamanaka, K.; Yamashita, Y; Nomura, S. y Oku, I. 1983. Effect of *Streptococcus faecalis* BIO-4R on intestinal flora of weanling piglets and calves. *Int. J. Food Microbiol.*, 45: 1513-1518.
- Pascual, M.; Hugas, M.; Badiola, J.I.; Monfort, J.M. y Garriga, M. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* Colonization in Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 4981-4986.

- Paulin, S.M.; Watson, P.R.; Benmore, A.R.; Stevens, M.P.; Jones, P.W.; Villarreal-Ramos, B. y Wallis, T.S. 2002. Analysis of *Salmonella enterica* Serotype-Host Specificity in Calves: Avirulence of *S. enterica* Serotype Gallinarum Correlates with Bacterial Dissemination from Mesenteric Lymph Nodes and Persistence *In Vivo*. *Infect. Immun.*, 70: 6788-6797.
- Pereira, D.; McCartney, A. y Gibson, G. 2003. An *In Vitro* Study of the Probiotic Potential of a Bile-Salt-Hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* Strain, and Determination of Its Cholesterol-Lowering Properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4743-4752.
- Pérez Guerra, N.; Fajardo Bernárdez, P.; Méndez, J.; Cachaldora, P. & Pastrana Castro, L. 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 134: 89-107.
- Picot, A. y Lacroix, C. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. Dairy J.*, 14: 505-515.
- Poncelet, D.; Babak, V.; Dulieu, C. y Picot, A. 1999 A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 79: 213-228.
- Quigley, J.D.; Drewry, J.J.; Murray, L.M. y Ivey, S.J. 1997. Body Weight Gain, Feed Efficiency, and Fecal Scores of Dairy Calves in Response to Galactosyl-Lactose or Antibiotics in Milk Replacers. *J. Dairy Sci.*; 80: 1751-1754.
- Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazzi, V. y Morelli, L. 1992. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *J. Gen. Microbiol.*, 138: 763-768.

- Rhee, K.J.; Sethupathi, P.; Driks, A.; Lanning, D.K. y Knight, K.L. 2004. Role of Commensal Bacteria in Development of Gut-Associated Lymphoid Tissues and Preimmun Antibody Repertoire. *J. Immunol.*, 172: 1118-1124.
- Rickard, A.; Gilbert, P.; High, N.; Kolenbrander, P. y Handley, P. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiol.*, 11: 94-100.
- Robbins 2000. *Patología funcional y estructural*. 6e. Madrid, McGraw Hill-Interamericana.
- Rodrigues, L.R.; Teixeira, J.A. y Oliveira, R. 2006. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochem. Eng. J.*, 32: 135-142.
- Roos, S.; Karner, F.; Axelsson, L. y Jonsson, H. 2000. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with *in vitro* mucus-binding activity isolated from pig intestine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 251-258.
- Rosmini, M.R.; Sequeira, G.J.; Guerrero-Legarreta, I.; Martí, L.E.; Dalla-Santina, R.; Frizzo, L. y Bonazza, J.C. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3: 187-197.
- Roy, D., Sirois, S. y Vincent, D. 2001. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Curr. Microbiol.*, 42(4) :282-9.
- Salminen, S. y von Wright, A. 1998. *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2<sup>nd</sup> edn., Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

- Salveti, N.R.; Gimeno, E.J.; Lorente, J.A.; Ortega, H.H. 2004. Expression of cytoskeletal proteins in the follicular wall of induced ovarian cysts. *Cells Tissues Organs*, 178: 117-125.
- Salveti, N.R.; Muller, L.A.; Acosta, J.C.; Gimeno, J.E.; Ortega, H.H. 2007. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and progesterone receptors in ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Vet. Pathol.*, 44: 373-378.
- Sánchez Jiménez, M.M. y Cardona Castro, N.M. 2003. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio*, 7: 22-29.
- Saxelin, M.; Grenov, B.; Svensson, U.; Fondén, R.; Reniero, R. y Mattila-Sandholm, T. 1999. The technology of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 10: 387-392.
- Schachtsiek, M.; Hammes, W. y Hertel, C. 2004. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001<sup>T</sup> surface Protein Cpf Mediating Coaggregation with and Aggregation among pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 7078-7085.
- Schillinger, U., 1999. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 79-87.
- Schneider, R.; Rosmini, M.R.; Ehrmann, M. y Vogel, R. 2004. Identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales. *FAVE - Ciencias Veterinarias*, 3: 7-15.
- Servin A. y Coconnier, M. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 17: 741-754.
- Seymour, E.H.; Jones, G.M. y McGilliard, M.L. 1988. Persistence of Residues in Milk Following Antibiotic Treatment of Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.*, 71: 2292-2296.

- Shroff, K.E.; Meslin, K. y Cebra, J.J. 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect. Immun.*, 63: 3904-3913.
- Silvi, S.; Verdenelli, M.C.; Orpianesi, C.; Cresci, A. 2003. EU Project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy ageing. Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for possible probiotic use in functional foods. *J. Food Eng.*, 56: 195-200.
- Sodini, I.; Lucas, A.; Oliveira, M.; Remeuf, F. y Corrieu, G. 2002. Effect of Milk Base and Starter Culture on Acidification, Texture, and Probiotic Cell Counts in Fermented Milk Processing. *J. Dairy Sci.*, 85: 2479-2488.
- Soriano, D.; Abu ElAnouar, A. y Smith, D. 1984. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactose-deficient individuals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 40: 1219-1223.
- Soto, L.; Frizzo, L.; Diaz, A.; Bertozzi, E.; Bonazza, J.; Sequeira, G. y Rosmini, M. 2006. La leche como medio de propagación y conservación de bacterias probióticas para terneros. Tercer Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 8 al 10 de noviembre.
- Soto, L.P.; Frizzo, L.S.; Bertozzi, E.; Diaz A.; Martí, L.E.; Dalla Santina, R.; Sequeira, G.J. y Rosmini, M.R. 2009. Milk evaluation as growth and cold preservation medium of a probiotic inoculum for young calves. *J. Anim. Vet. Adv.*, 8: 1353-1360.
- Statgraphics Plus Software®, 1997. Statgraphics Plus for Windows v. 3.0. Serial number: 3872170. Copyright© Statistical Graphics Corp.

- Szabó, I.; Wieler, L.H.; Tedin, K.; Scharek-Tedin, L.; Taras, D.; Hensel, A.; Appel, B. y Nöckler, K. 2009. Influence of a Probiotic Strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Infection in a Porcine Animal Infection Model. *Appl. Envir. Microbiol.*, 75: 2621 – 2628.
- Tannock, G. 2001. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(suppl): 410S-4S.
- Tappenden, K.A. y Deutsch, A.S. 2007. The Physiological Relevance of the Intestinal Microbiota - Contributions to Human Health. *J. Am. Coll. Nutr.*, 26: 679S - 683S.
- Taras, D.; Vahjen, W.; Macha, M. y Simon, O. 2006. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *J. Anim. Sci.*, 84: 608-617.
- Thanantong, N., Edwards, S., Sparagano, O. 2006. Part II. Trends in the Study of Disease Agents. Characterization of Lactic Acid Bacteria and Other Gut Bacteria in Pigs by a Macroarraying Method. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1081: 276-279.
- Timmerman, H.M.; Mulder, L.; Everts, H.; van Espen, D.C.; van der Wal, E.; Klaassen, G.; Rouwers, S.M.G.; Hartemink, R.; Rombouts, F.M. y A.C. Beynen, 2005. Health and growth of veal calves fed milk medium replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.*, 88: 2154-2165.
- Tizard, I.R. 1996. *Inmunología Veterinaria*. México, McGraw Hill-Interamericana.
- Tuomola, E.; Crittenden, R.; Playne, M.; Isolauri, E. y Salminen, S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr.*, 73(suppl):393S–8S.
- Turker, N. y Hamamci, H. 1998. Storage behaviour of immobilized dried microorganisms. *Food Microbiol.*, 15: 3-11.

- Truelstrup Hansen, L.; Allan-Woj, P.M.; Jin, Y.L. y Paulson, A.T. 2002. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol.*, 19: 35-45.
- Van Diemen, P.M.; Dziva, F.; Stevens, M.P. y Wallis, T.S. 2005. Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H7 Genes Required for Intestinal Colonization in Calves. *Infection and Immunity*, 73: 1735–1743.
- Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K. y Swings, J. 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.
- Ventura, M.; Elli, M.; Reniero, R. y Zink, R. 2001. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 36: 113-121.
- Ventura, M.; Jankovic, I.; Walker, D.; Pridmore, R. y Zink, R. 2002. Identification and Characterization of Novel Surface Proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 6172-6181.
- Vincze, T.; Posfai, J. y Roberts, R. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nuc. Acids Res.*, 31: 3688–3691.
- Vinderola, C.G.; Bailo, N.; Reinheimer, J.A. 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinian yogurths during refrigerated storage. *Food Res. Int.*, 33:97-102.
- Weaver, D.M.; Tyler, J.W.; VanMetre, D.C.; Hostetler, D.E y Barrington, G.M. 2000. Passive Transfer of colostral immunoglobulins in calves. *J. Vet. Intern. Med.*, 14: 569-577.

- Woodford, S.T.; Whetstone, H.D.; Murphy, M.R. y Davis, C.L. 1987. Abomasal pH, nutrient digestibility, and growth of Holstein Bull calves fed acidified milk replacer. *J. Dairy Sci.*, 70: 888-891.
- Woods, A. y Ellis, C.R. 1994. *Laboratory Histopathology. A Complete Reference.* Longman Group Limited. Londres.
- Yanes, M.; Durán, L. y Costell, E. 2002. Effect of hydrocolloid type and concentration on flow behaviour and sensory properties of milk beverages model systems. *Food Hydrocol.*, 16: 605-611.
- Ziemer, C.; Cotta, M. y Whitehead, T. 2004. Application of group specific amplified rDNA restriction analysis to characterize swine fecal and manure storage pit samples. *Anaerobe* 10: 217-227.