



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
LITORAL**
***FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS***

Maestría en Ciencias Veterinarias
Mención: Protección de alimentos

**SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS
INDÍGENAS MEDIANTE PRUEBAS *IN VITRO*,
PARA MEJORAR EL ESTADO SANITARIO Y LA
PERFORMANCE DE CRECIMIENTO DURANTE
LA CRIANZA INTENSIVA DE CERDOS**

Veterinario Ezequiel BERTOZZI

**Tesis para optar al grado de
MASTER SCIENTIAE EN CIENCIAS
VETERINARIAS**

Esperanza - agosto de 2012



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Maestría en Ciencias Veterinarias
Mención: Protección de alimentos

**SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS INDÍGENAS
MEDIANTE PRUEBAS *IN VITRO*, PARA MEJORAR EL
ESTADO SANITARIO Y LA PERFORMANCE DE
CRECIMIENTO DURANTE LA CRIANZA INTENSIVA
DE CERDOS**

Autor: Vet. Ezequiel BERTOZZI

Director: Dr. Laureano S. FRIZZO

Codirector: M. Sc. M. V. Luis E. MARTÍ

Miembros del jurado:

Dr. Celso Gabriel VINDEROLA

Dr. Luis CALVINHO

Dra. Silvia GONZÁLEZ

**Tesis para optar al grado de
Master Scientiae en Ciencias Veterinarias**

Esperanza - agosto de 2012

AGRADECIMIENTOS

A Laureano FRIZZO por enseñarme el camino y verter sus conocimientos con paciencia y altruismo.

A Lorena SOTO por compartir parte del camino y colaborar en esta tarea.

A los Profesores Gabriel SEQUEIRA, Rodolfo DALLA SANTINA, Marcelo ROSMINI y Enrique MARTÍ por brindarme todo aquello que necesite para la ejecución de la tesis.

Al Departamento de Salud Pública Veterinaria y a la Universidad Nacional del Litoral por darme la posibilidad de acceder a un estudio de postgrado.

A mis padres Alicia y Geppo por su apoyo constante para sortear los obstáculos y permitirme alcanzar las metas.

A todos los que han luchado por la educación pública y gratuita.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Utilización de antimicrobianos en la producción animal.....	2
I.2. Los probióticos.....	4
I.3. Objetivos establecidos.....	7
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
II.1. La situación legislativa de los ATM y oportunidades locales de producción porcina.....	9
II.2. Características generales del crecimiento bacteriano.....	11
II.3. Mecanismo de acción de los probióticos y su aplicación en la producción porcina.....	14
II.4. Características deseables de las cepas probióticas y su evaluación <i>in vitro</i>	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
III.1. Toma de muestras y aislamiento.....	31
III.1.1. Obtención de muestras.....	31
III.1.2. Aislamiento de los microorganismos.....	31
III.1.3. Características fenotípicas de los aislamientos.....	32
III.1.4. Conservación de los aislamientos.....	32
III.2. Pruebas <i>in vitro</i>	33
III.2.1. Autoagregación.....	33
III.2.2. Coagregación con patógenos.....	34
III.2.2.1. Preparación de los aislamientos.....	34
III.2.2.2. Ensayo <i>in vitro</i>	35
III.2.3. Producción de sustancias inhibidoras.....	36

III.2.4. Crecimiento en bilis.....	37
III.2.5. Crecimiento en medio ácido.....	38
III.3. Identificación de los microorganismos.....	39
III.3.1. Aislamiento del ADN bacteriano.....	39
III.3.2. Amplificación de secuencias específicas de ADN.....	40
III.3.3. Secuenciación, identificación y registro de las secuencias.....	40
III.4. Análisis estadístico.....	41
IV. RESULTADOS.....	42
IV.1. Aislamientos obtenidos y características fenotípicas básicas.....	43
IV.2. Identificación de los microorganismos.....	43
IV.2.1. Secuenciación y determinación de las especies.....	43
IV.3. Pruebas <i>in vitro</i>	45
IV.3.1. Autoagregación.....	46
IV.3.2. Coagregación con patógenos.....	46
IV.3.3. Producción de sustancias inhibidoras.....	46
IV.3.4. Crecimiento en bilis.....	47
IV.3.4.1. Tiempo utilizado para alcanzar 0,3 de DO.....	47
IV.3.4.2. Diferencias de DO en un medio con y sin bilis.....	49
IV.3.4.3. Estudio de parámetros de crecimiento.....	51
IV.3.4.3.1. Crecimiento máximo (N-Max).....	51
IV.3.4.3.2. Tasa de crecimiento (Mumax).....	53
IV.3.4.3.3. Tiempo de latencia (t-lag).....	57
IV.3.5. Crecimiento en ácido.....	58
IV.3.5.1. Crecimiento máximo (N-Max).....	61
IV.3.5.2. Tasa de crecimiento (Mumax).....	62

IV.3.5.3. Tiempo de latencia (t-lag).....	63
IV.3.6. Evaluación del crecimiento en condiciones óptimas.....	64
IV.3.6.1. Crecimiento máximo (N-Max).....	64
IV.3.6.2. Tasa de crecimiento (Mumax).....	65
IV.3.6.3 Tiempo de latencia (t-lag).....	65
V. DISCUSIÓN.....	67
VI. CONCLUSIONES.....	88
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	91

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Tiempo requerido por las cepas lácticas para alcanzar una DO de 0,3 en ausencia de bilis.....	48
Gráfico 2: Diferencias de DO respecto al control de las cepas lácticas que crecieron entre el 1% al 7% de bilis.....	50
Gráfico 3: Crecimiento máximo de los lactobacilos expuestos a bilis entre el 0% y el 7%.....	52
Gráfico 4: Tasa de crecimiento máximo de las cepas expuestas a concentraciones de 0% y 7% de bilis (grupo1).....	53
Gráfico 5: Tasa de crecimiento máximo de las cepas expuestas a concentraciones de 0% a 7% de bilis (grupo 2).....	54
Gráfico 6: Tasa de crecimiento máximo de las cepas expuestas a concentraciones de 0% a 7% de bilis (grupo 3).....	55
Gráfico 7: Duración de la fase lag de las cepas aisladas para las distintas concentraciones de bilis	57
Gráfico 8: Comparación del tiempo de latencia de las cepas de las cepas de <i>L. johnsonii</i> aisladas en comparación con <i>L. ruminis</i> DSPV006C para las concentraciones de bilis más bajas.....	58
Gráfico 9: Lactobacilos que crecieron modificando $< 0,9$ la densidad óptica a pH 6,5.....	59
Gráfico 10: Lactobacilos que crecieron modificando $> 0,9$ la densidad óptica a pH 6,5.....	60
Gráfico 11: Crecimiento máximo de los lactobacilos expuestos a diferentes pHs.....	61
Gráfico 12: Tasa de crecimiento máximo de los lactobacilos expuestos a diferentes pHs.....	62
Gráfico 13: Tiempo de latencia de los lactobacilos expuestos a diferentes pHs...	63
Gráfico 14: Crecimiento máximo de los lactobacilos en MRS.....	64
Gráfico 15: Tasa de crecimiento máximo de los lactobacilos en MRS.....	65
Gráfico 16: Tiempo de la fase lag de los lactobacilos en MRS.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Especies de bacterias ácido lácticas aisladas desde el intestino de cerdos.....	44
Tabla 2: Ensayos de autoagregación, coagregación y producción de sustancias inhibidoras.....	45
Tabla 3: Tiempo requerido por las cepas para alcanzar una DO de 0,3 a una longitud de onda de 650 nm.....	47
Tabla 4: Tasa de crecimiento (\log_{10} UFC/hora) de los lactobacilos estudiados.....	56

RESUMEN

Los probióticos representan una de las alternativas en la producción porcina para disminuir el uso desmedido de antimicrobianos y reducir la presencia de patógenos bacterianos y xenobióticos de uso veterinario en los alimentos. El objetivo de este trabajo fue seleccionar un inóculo microbiano con capacidades probióticas mediante pruebas *in vitro*, integrado por bacterias indígenas de la microbiota intestinal de cerdos, para mejorar el estado sanitario y la performance de crecimiento durante su crianza intensiva.

Los microorganismos fueron aislados, identificados y seleccionados a través de pruebas de agregación, coagregación, producción de sustancias inhibitoras, crecimiento en bilis y pHs bajos y su evaluación de crecimiento en condiciones óptimas.

Los lactobacilos identificados fueron 13 y pertenecieron a las especies *L. jonhsonii*, *L. reuteri*, *L. agilis*, *L. salivarius*, *L. ruminis* y *L. fermentum*. Las BAL mostraron diferencias en su comportamiento durante los ensayos, tanto entre especies como entre cepas de la misma especie. Los microorganismos *L. reuteri* DSPV 002C, *L. agilis* DSPV 009C y *L. ruminis* DSPV 006C fueron los que mostraron la mejor performance en las pruebas realizadas y poseen características que justificarían ser incorporadas en un inóculo probiótico multicepa y evaluarlo en un ensayo *in vivo*.

Palabras clave: Lactobacilos - Probióticos - Producción porcina - Pruebas *in vitro* - Salud Pública.

SUMMARY

***In vitro* selection test of indigenous microorganisms to improve health status and growth performance in intensive rearing pigs**

Probiotics represent one of the alternatives in swine production to reduce overuse of antibiotics and the presence of bacterial pathogens and xenobiotic veterinary products in food. The objective of this study was to select a microbial inoculum with probiotic capabilities by testing *in vitro*, consisting of indigenous bacteria of the intestinal microbiota of pigs, to improve the health and growth performance during their intensive farming. The organisms were isolated, identified and selected through different tests: aggregation, co-aggregation, production of inhibitory substances, growth in bile and low pH and growth evaluation in optimal conditions. A total of 13 lactobacilli were identified belonging to the species *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. agilis*, *L. salivarius*, *L. ruminis* y *L. fermentum*. The lactic acid bacteria (LAB) showed differences in their behavior during testing, both between species and between strains of the same species. Microorganisms *L. reuteri* 002C DSPV, *L. agilis* 009C and *L. ruminis* DSPV DSPV 006C showed the best performance on tests. It would justify being incorporated in a multi-strain probiotic inoculum and evaluated *in vivo* assay.

Key words: Lactobacilli - Probiotics – Pig production – In vitro tests – Public health.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Utilización de antimicrobianos en la producción animal y su impacto en la salud Pública

El uso de antimicrobianos (ATM) en la salud humana y animal adquirió gran importancia en los últimos 50 años, aplicándose en tratamientos frente a patógenos microbianos y como aditivos en los alimentos de animales para mejorar la conversión alimenticia y la ganancia de peso (McEwen & Fedorka-Cray, 2002), especialmente en la crianza intensiva de animales para la obtención de carne (Gesche & Emilfork, 1998).

La cantidad total de ATM utilizados en la alimentación animal no es conocida con precisión, pero en el año 2000 se estimaba que la mitad de los ATM producidos en el mundo se empleaban en la agricultura y la ganadería, en particular en la producción de cerdos y aves de corral (Stöhr, 2000). La utilización desmedida de estas sustancias ha causado la aparición de cepas bacterianas resistentes, proceso que se vio potenciado por la capacidad de transferencia de dicha resistencia entre bacterias (Saarela *et al.*, 2000), las cuales, pueden ser patógenas para el humano.

Las bacterias resistentes a los ATM pueden transmitirse, principalmente de los animales al hombre, a través del contacto directo y el consumo de alimentos provenientes de ellos (Stöhr, 2000). La contaminación de flora fecal (resistente) en las reses que serán consumidas permite la transmisión (Van den Bogaard *et al.*, 2000), si bien la cocción adecuada de la carne elimina este riesgo.

La resistencia cruzada entre dos antimicrobianos como la avoparcina y la vancomicina (pertenecientes a los glucopéptidos) ha sido demostrada (Bates *et al.*, 1994; Bager *et al.*, 1997; Wegener *et al.*, 1999). Ambos poseen una molécula similar,

tienen los mismos mecanismos de acción y generan en los microorganismos una resistencia cruzada entre ellos. El primero es utilizado como promotor del crecimiento en la alimentación animal y el segundo en el tratamiento de infecciones ocasionadas por *Enterococcus*. Los microorganismos de este género pueden comportarse como patógenos intrahospitalarios en pacientes inmunodeprimidos y la vancomicina es la única droga disponible para su tratamiento efectivo.

Los enterococos resistentes a los glucopéptidos pueden aislarse a partir de la carne cruda de animales que consumieron alimentos suplementados con avoparcina antes del sacrificio (Chadwick *et al.*, 1996). Esto ocasionó la prohibición del uso de la avoparcina en los animales de Europa (Errecalde, 2004). La medida causó el descenso de enterococos vancomicina-resistentes en animales y alimentos, particularmente en carne de aves de corral (Stöhr, 2000).

Los ATM usados en dosis subterapéuticas en las raciones para los animales provocan otro tipo de perjuicio como la presencia de residuos en los alimentos (Vassalo *et al.*, 1997) producidos por esos animales. El consumo de ellos, ocasiona diversos inconvenientes en Salud Pública, destacándose las alergias y trastornos gastrointestinales debido a la alteración de la microbiota intestinal. La consecuencia de estas situaciones que ponen en riesgo la salud de la población, es el aumento de la presión de consumidores y entes reguladores para que el sector de la producción de alimentos no utilice algunos ATM.

I.2. Los probióticos

El término probiótico deriva del griego y se define como a aquellos “microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos al hospedador” (FAO/OMS, 2002).

Los primeros conocimientos sobre probióticos surgen de la mano de Metchnikoff a principios del siglo pasado, pero es recién en la década del 50 cuando se empiezan a dedicar mayores recursos para su estudio. En ese momento, se intensificó la búsqueda de conocimientos que fundamentaran el efecto benéfico de determinados gérmenes para la salud del hombre y de los animales y su posible capacidad probiótica (Fuller, 1992).

Dentro de los beneficios ocasionados por el consumo de estos microorganismos en humanos, es posible destacar los efectos frente a la intolerancia primaria y secundaria a la lactosa, infecciones intestinales, diarreas asociadas a antibióticos, gastroenteritis (Marteau, 2001), efectos sobre el colesterol sanguíneo, efecto anticanceroso, antiestreñimiento, estimulación del sistema inmune, afecciones gástricas, efectos nutricionales (Fooks *et al.*, 1999), como moduladores de la inmunidad, en tratamientos de artritis reumatoidea, y previniendo o reduciendo los efectos de la dermatitis atópica, en la enfermedad de Crohn, en la diarrea y en las infecciones del tracto urinario (Reid, 1999).

En la producción animal la utilización de los probióticos está dirigida a prevenir enfermedades e incrementar la productividad (Fuller, 1992). Se han reportado efectos beneficiosos en bovinos, cerdos y pollos incluyendo mejoras en la salud general, eficiente utilización del alimento, rápida tasa de crecimiento y mayor producción de leche y huevos (Hyronimus *et al.*, 2000).

En el animal sano, cada porción del intestino es colonizada por una microbiota típica, la cual se adapta y desarrolla en una simbiosis benéfica con el hospedador (Kurzak *et al.*, 1998). En los animales criados en sistemas de producción naturales (extensivos) o en forma salvaje, la colonización del aparato digestivo se da en forma espontánea y natural, adquiriendo la microbiota del entorno que lo rodea, siendo fundamental en los primeros días de vida el contacto con la madre, ya que ésta le abastece parte de su microbiota. En las crías de animales, en especial cuando las crías son separadas de sus madres y alojadas en sistemas intensivos, la posibilidad de adquirir la flora autóctona natural se ve fuertemente disminuida y el intestino está más vulnerable a ser colonizado por patógenos.

Los efectos de la microbiota y sus actividades metabólicas requieren especial atención en el contexto de la producción porcina en la cual la eficiencia del crecimiento de los animales tiene una importancia primordial (Collier *et al.*, 2003). Una fuente para mejorar la colonización intestinal con microorganismos benéficos en los primeros días de vida es a través de un aditivo alimentario como el que representan los probióticos.

En el mercado existen numerosos productos que contienen microorganismos probióticos con una eficacia variable y en algunos casos sin la adecuada validación científica (De Angelis *et al.*, 2007). Para una mayor posibilidad de eficacia deben ser obtenidos de la misma especie animal, del mismo sitio donde actuarán y desde una microbiota a la cual se encuentren adaptados.

Los *Lactobacillus* son componentes habituales de la flora intestinal normal del hombre y de los animales (Raibaud, 1992; Smoragiewicz *et al.*, 1993). Estos fueron identificados como responsables de controlar diarreas infantiles (Isolauri *et al.*, 1991) y tener efectos sobre gérmenes patógenos como *Salmonella* spp. (Collins & Carter, 1978;

Hudault *et al.*, 1997; Gill *et al.*, 2000; Frizzo *et al.*, 2005) y *Escherichia coli* (Asahara *et al.*, 2001; Shu & Gill, 2002; Johnson-Henry *et al.*, 2008).

En el caso de las afecciones gastrointestinales de los animales jóvenes criados en condiciones artificiales, la utilización de probióticos provenientes de la microbiota indígena podría prevenir la colonización del tubo digestivo por patógenos, estimular el desarrollo del sistema inmunológico y contrarrestar el efecto negativo de dichas enfermedades (Rosmini *et al.*, 2004).

Los cerdos pueden albergar salmonelas en su intestino sin manifestar la enfermedad (portadores crónicos) contaminando a las reses durante la faena (Casey *et al.*, 2004). Por lo tanto, el mantenimiento del estado de salud de los animales es de importancia no solo para la obtención de buenos resultados productivos, sino para lograr la inocuidad del producto.

En países donde el inicio de la prohibición del uso de ATM como promotores del crecimiento generó bajas en la producción en explotaciones de cerdos y aves, se están utilizando estos microorganismos como preventivos de enfermedades infecciosas y surgen como una alternativa de sustitución a los antibióticos (Reid & Friendship, 2002). Según Laine *et al.* (2004) es posible producir cerdos con éxito sin el uso de ATM (como promotores de crecimiento) de acuerdo a la experiencia vista en Finlandia, donde a partir de su prohibición hubo una disminución en la producción y una posterior recuperación.

Resulta de interés el estudio de los gérmenes indígenas componentes de la microbiota intestinal del cerdo y la evaluación de su capacidad probiótica como alternativa de complementación a la dieta animal. Es de gran utilidad, tanto en producción animal como en Salud Pública, el empleo de especies microbianas extraídas

del intestino de cerdos de la región para reducir la incidencia de enfermedades infecciosas, mejorar la ganancia de peso y la conversión alimenticia con el objetivo de incrementar la productividad de las explotaciones porcinas y lograr un óptimo desarrollo económico.

I.3 Objetivos establecidos

I.3.1 Objetivo general:

1. Seleccionar un inóculo microbiano con capacidades probióticas mediante pruebas “*in vitro*”, integrado por bacterias lácticas indígenas de la microbiota intestinal de cerdos, para mejorar el estado sanitario y la performance de crecimiento durante su crianza intensiva.

I.3.2 Objetivos específicos:

1. Aislar microorganismos desde la microbiota indígena de cerdos para evaluar su potencial probiótico.
2. Estudiar las capacidades probióticas “*in vitro*” de los aislamientos comprendiendo los principios básicos de las mismas.
3. Seleccionar los mejores exponentes en base a su potencial “*in vitro*” haciendo hincapié en la inhibición de patógenos intestinales.
4. Conformar un inóculo probiótico integrado por especies bacterianas ácido lácticas, que pueda ser utilizado en posteriores pruebas “*in vivo*”.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. La situación legislativa de los ATM y oportunidades locales para la producción porcina

La Comunidad Económica Europea (CEE) ha sido la más restrictiva frente a los problemas ocasionados por el uso desmedido de ATM. En 1970 publicó la Directiva 70/524 sobre aditivos en la alimentación animal en la cual establecía que sólo podían ser empleados como promotores de crecimiento aquellos antibióticos que tuvieran un efecto demostrado sobre el crecimiento animal, que fueran activos frente a bacterias gram-positivas y no presentaran absorción intestinal para prevenir la presencia de residuos en la carne (Torres & Zarazaga, 2002).

En el año 1998 la CEE prohibió mediante la Directiva 2821/98 (CEE, 1998) todos los ATM utilizados en la medicina humana para el uso subterapéutico en alimentos suministrados al ganado (bacitracina-cinc, espiramicina, virginamicina y fosfato de tilosina), con el objetivo de reducir la prevalencia de microorganismos resistentes a antibióticos en humanos (White *et al.*, 2002). A partir del 1 de enero de 2006 se prohibieron el resto de los ATM utilizados en la alimentación animal como promotores de crecimiento, incluyendo al flavofosfolipol, avilamicina, bambermicina, monensina y salinomicina (CEE, 2003). Sólo están autorizados para administrar en las dietas los ATM que actúan como coccidiostáticos e histomonóstatos. Por lo tanto, la monensina y salinomicina pueden utilizarse con este fin aunque se está revisando esta posibilidad.

En países como Dinamarca, el retiro de los ATM de la alimentación animal ocasionó una importante disminución de las tasas de resistencia de ATM en cepas de *Enterococcus* procedentes de aves y cerdos (Aarestrup *et al.*, 2001). Dinamarca,

Noruega y Suecia fueron los primeros en adoptar estas restricciones en forma voluntaria y por decisión de la industria; esta medida produjo un descenso marcado de la utilización de estas sustancias en terapéutica animal (Grave *et al.*, 2006).

La actual situación legislativa de la CEE, que prohíbe la utilización de antibióticos como promotores de crecimiento, y los problemas generados en la salud humana por los ATM, ha dado un fuerte empuje a la investigación de estrategias nutricionales y aditivos alternativos naturales como ácidos (Mroz, 2005), probióticos, prebióticos (Patterson & Burkholder, 2003), enzimas y fitoquímicos (Manzanilla *et al.*, 2004), entre otros.

En este contexto, surge la necesidad de producir alimentos con métodos que garanticen inocuidad para el consumidor, adaptándose a nuevas legislaciones y que aumenten la producción para satisfacer la demanda creciente de alimentos a nivel mundial. La alta productividad, muchas veces, genera problemas en Salud Pública (Fedalto *et al.*, 2002) y deben desarrollarse una serie de aditivos alimentarios que traten de mejorar la producción, así como los problemas sanitarios, en reemplazo de los ATM.

La Federación Europea de Sanidad Animal, en un memorando de 1995 sobre el uso responsable de los ATM para el control de enfermedades en animales domésticos, recalca que éstos no pueden ser un sustitutivo de la mala gestión agropecuaria. Algunos consideran que los antibióticos promotores del crecimiento se utilizan para apuntalar una gestión deficiente de la producción pecuaria (Soulsby, 1999).

El marco regulatorio de la CEE sobre el uso de ATM como promotores del crecimiento está basado en el principio precautorio (Cervantes, 2009), el cual no es compartido por diversos autores, ocasionando una larga discusión con defensores y detractores donde los intereses económicos muchas veces influyen en ambas posiciones. Es bien conocido que todas aquellas medidas tomadas en dirección de

mejorar la salud de la población tienen un sustento económico sobrado y son piedras fundamentales para el desarrollo de toda la comunidad.

El hecho de ir reemplazando los antiguos promotores del crecimiento, que aun hoy siguen siendo utilizados en nuestro país, contribuirá a la disminución de los riesgos para la salud humana y mejorará la calidad de vida de la población. Además, nuestro país estará preparando ante aumento de las exigencias de los países que importan carne.

La provincia de Santa Fe posee alrededor de 430.000 cerdos, lo que significa un 19,5% del total de Argentina (Censo Nacional Agropecuario, 2002) y la ubica como tercera provincia a nivel país en cuanto a existencia de cerdos. Estos datos nos hablan de la importancia que tiene esta actividad en la zona y la necesidad de generar herramientas para mejorarla.

La Argentina fue reconocida en mayo de 2005 como país libre de Peste Porcina Clásica, la cual significaba una barrera sanitaria y comercial de importancia. Esta situación posiciona a la producción porcina como una alternativa comercial atrayente y un desafío para toda la cadena agroalimentaria, ante la posibilidad de acceso a los mercados de exportación (Papotto, 2006).

II.2. Características generales del crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano puede ser entendido como el aumento del número de células, en donde una célula madre (previo aumento de tamaño) se divide en dos por fisión binaria y las nuevas células alcanzarán el mismo tamaño que la célula original. El desarrollo microbiano se logra cuando están en adecuada cantidad los elementos nutricionales necesarios para la síntesis biológica e incluyen carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, elementos trazas y vitaminas, junto a los factores físicos apropiados como

temperatura, pH, concentración de oxígeno, humedad, entre otros (Junco Díaz & Rodríguez Pérez, 2001).

Los organismos unicelulares en condiciones ideales de crecimiento se dividen continuamente, por lo cual modificarán el medio de crecimiento utilizando nutrientes y produciendo desechos. Las moléculas nutritivas serán una limitante si no se agregan a lo largo del desarrollo del cultivo o bien, se afectarán las células vegetativas por la toxicidad de los productos de desecho, enlenteciendo o deteniendo el crecimiento. Cuando los niveles de desecho se encuentran sobre valores críticos para la vida del microorganismo o cuando las necesidades nutritivas son insatisfechas, sobreviene la muerte celular. Ambas suceden paralelamente (Carter, 1989).

En medios de cultivos líquidos y en condiciones adecuadas, cuando un pequeño número de células procedentes de un cultivo puro son inoculadas, las células presentan

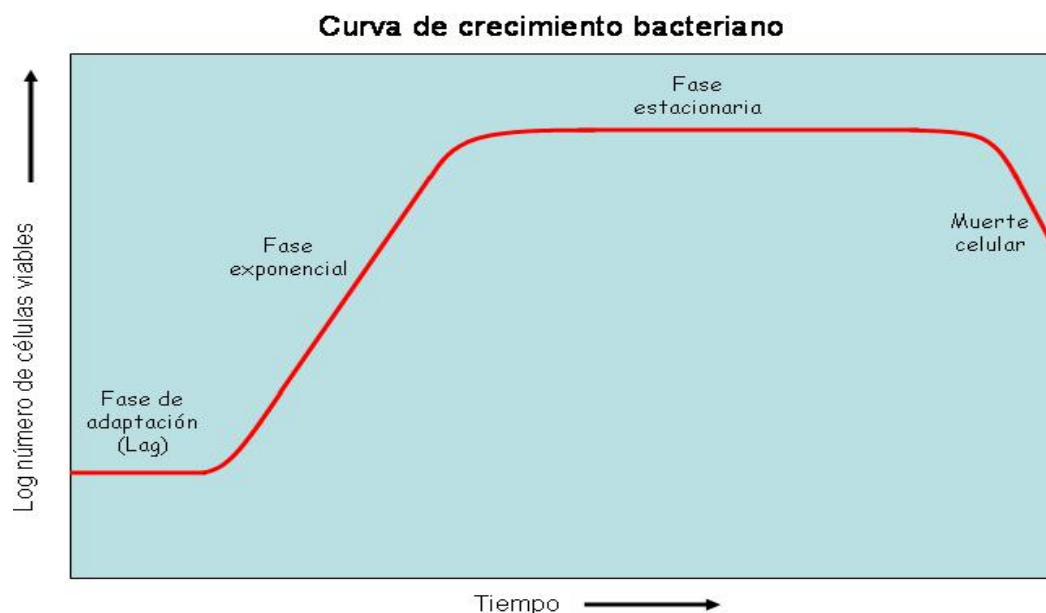


Figura 1: Las cuatro fases típicas del crecimiento bacteriano.

una curva de crecimiento típica que puede descomponerse en cuatro fases (Figura 1).

La fase lag es el período de adaptación metabólica de las células para crecer en un nuevo medio. Esta etapa puede ser insignificante en caso de provenir del mismo medio en el cual estaban en la fase de crecimiento exponencial. Sin embargo, si el inóculo se toma desde un cultivo viejo (fase estacionaria) generalmente se presenta una fase lag mas prolongada. Esto se debe a que las células agotan ciertos constituyentes celulares y se requiere cierto tiempo para la formación de enzimas y metabolitos intermediarios necesarios para recomenzar el crecimiento (Junco Díaz & Rodríguez Pérez, 2001). El estado metabólico de las bacterias y el medio de cultivo del que proceden son los factores importantes que influyen la duración de esta fase. Así, mientras mayores sean las diferencias en las condiciones de crecimiento en el nuevo medio, mayor será el tiempo empleado para adaptar su maquinaria biosintética para crecer.

En la fase de crecimiento exponencial la división celular tiene lugar a una tasa máxima de acuerdo a las condiciones aportadas por el medio y la capacidad genética de las células para desarrollar vías catabólicas y anabólicas, siendo esta tasa de crecimiento típica para cada cultivo microbiano (Carter, 1989). Cuando la cantidad de células se grafica en coordenadas aritméticas en función del tiempo transcurrido, se observa una curva que aumenta constantemente su pendiente. El examen de las líneas curvas no es adecuado y los resultados poblacionales generalmente se transforman tomando el logaritmo de cada punto de los datos obtenidos (Brock *et al.*, 1987). El logaritmo del número de células aumenta linealmente en el tiempo en esta etapa. Sin embargo, la multiplicación bacteriana no continúa en forma indefinida. Los recipientes con el medio de cultivo contienen un número limitado de nutrientes que se van agotando, los productos de desecho van alcanzando niveles deletéreos para las células y la densidad

de la población actúa como competencia. La tasa de crecimiento se verá influenciada, tardando cada célula mayor tiempo en duplicarse y comenzará la siguiente etapa.

La fase estacionaria no posee un aumento o descenso del número de células, se enlentece la división y se produce la muerte celular manteniendo relativamente estable la cantidad de células viables. Finalmente, en la cuarta etapa, llamada de muerte celular, se produce un descenso de bacterias viables, lo cual no significa que hayan perdido por completo su capacidad metabólica o de influenciar en el medio (Carter, 1989). En algunos casos la muerte celular se acompaña de lisis, dando lugar a la disminución del recuento microbiano (Brock *et al.*, 1987).

Los parámetros de crecimiento mencionados son de importancia para conocer la capacidad de desarrollo del microorganismo, sobre todo cuando se debe realizar a escala industrial. Aquellos que son capaces de generar mayor cantidad de biomasa por unidad de tiempo y con menores requerimientos nutricionales son los que reúnen ventajas competitivas frente a otros porque podrán obtenerse a un menor costo (Frizzo, 2007).

II.3. Mecanismo de acción de los probióticos y su aplicación en la producción porcina

El tracto gastrointestinal (TGI) de los animales está protegido en forma natural por la flora autóctona que lo coloniza a partir del momento de su nacimiento, se adapta a ese ambiente y dificulta la colonización del lumen por otros microorganismos, en especial por patógenos (Ziemer & Gibson, 1998). Los animales libres de gérmenes comparados con aquellos criados en forma convencional demuestran claramente que la microbiota intestinal tiene una considerable influencia en la bioquímica, fisiología,

inmunología y por lo tanto en el nivel de resistencia a las infecciones del hospedador (Gordon & Pesti, 1971).

Las enfermedades gastrointestinales están ocasionadas generalmente por desbalances que se producen en el complejo ecosistema bacteriano que habita el tracto gastrointestinal de los animales de granja. Los antimicrobianos se utilizan habitualmente en el tratamiento de animales enfermos y también de manera profiláctica durante períodos de alto riesgo de enfermedades infecciosas (McEwen & Fedorka-Cray, 2002). Sin embargo, las terapias con antimicrobianos, en especial las administradas por vía oral, si bien controlan los patógenos a los que están dirigidos también afectan a muchos microorganismos benéficos produciendo trastornos en el equilibrio de la microbiota gastrointestinal (Salminen *et al.*, 1998).

Algunos mecanismos intentan explicar el efecto protector de los microorganismos probióticos como la exclusión competitiva y la inmunomodulación del hospedador. En el primero habría competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión y la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas por parte de éstos estaría dificultada. El segundo induciría un aumento de la producción de inmunoglobulinas como lo verifica Fukushima *et al.* (1999) en el caso de las Ig A séricas totales y fecales y activaría los monocitos y linfocitos (Fuller, 1989).

Los miembros de la microbiota afectan las funciones intestinales por medio de interacciones con las células epiteliales. Por ejemplo, la microbiota intraluminal influencia la liberación de péptidos biológicamente activos y contribuye a regular las células endocrinas gastrointestinales y la estructura epitelial (Uribe *et al.*, 1994). La colonización de ratones libres de gérmenes por *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482, un componente de su microbiota normal, ha revelado que esta bacteria comensal

modula la expresión de genes involucrados en importantes funciones intestinales, incluyendo absorción de nutrientes, fortificación de la barrera mucosa, metabolismo de xenobióticos, angiogénesis y maduración intestinal posnatal (Hooper & Gordon, 2001; Hopper *et al.*, 2001).

Las sustancias antibacterianas específicas como las bacteriocinas (nisina y reuterina) son otros de los factores benéficos del uso de probióticos (Klaenhammer, 1988; Daeschel, 1989; Schillinger & Lucke, 1989). Existen cepas de bacterias lácticas que tienen la capacidad de sintetizar estas sustancias, como las del género *Lactobacillus*, que se encuentran en el tracto gastrointestinal sano del hombre y los animales; entre ellos *Lactobacillus reuteri*, el cual produce reuterina, un inhibidor de diferentes bacterias indeseables, incluyendo patógenos entéricos (Rodríguez *et al.*, 2003).

Los probióticos pueden producir otras sustancias que actúan sobre la microbiota patógena como son el peróxido de hidrógeno y diversos ácidos orgánicos (Marteau, 2001). Dentro de estos últimos encontramos principalmente el ácido láctico (producto final distintivo del grupo de las bacterias ácido lácticas) y el acético, los cuales tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (Jin *et al.*, 2000) entre otros patógenos. Además, las BAL pueden actuar modificando el potencial redox del ambiente intestinal (Dunne *et al.*, 1999) para limitar el desarrollo de patógenos.

Dentro de los géneros bacterianos utilizados como probióticos en producción porcina podemos encontrar a *Lactobacillus* (Pascual *et al.*, 1999; Bogovis Matijasić *et al.*, 2004; De Angelis *et al.*, 2007), *Bifidobacterium* (Abe *et al.*, 1995), *Bacillus* (Zani *et al.*, 1998; Taras *et al.*, 2007) y *Enterococcus* (Vassalo *et al.*, 1997; Broom *et al.*, 2006). Los mismos se han usado como aditivos alimentarios básicamente en dos campos de investigación y desarrollo: producción y sanidad animal.

En la producción animal se emplean fundamentalmente como promotores del crecimiento en las etapas de recría y engorde (Dilworth & Day, 1978; Miles *et al.*, 1981; Mordenti, 1986). Vassalo *et al.* (1997) observaron en lechones que recibían probióticos una ganancia de peso mayor que el grupo que consumía un antimicrobiano como aditivo. Los lactobacilos y las levaduras administrados en la dieta han demostrado que mejoran la performance de crecimiento en lechones destetados (Pollman *et al.*, 1980; Lessard & Brisson, 1987; Kornegay *et al.*, 1995).

En sanidad animal el uso está enfocado principalmente a la prevención de enfermedades infecciosas, especialmente aquellas que causan diarreas en la etapa de cría y destete (Alexopoulos *et al.*, 2004), las cuales tienen un fuerte impacto sobre la performance de crecimiento de los animales.

El estrés que sufren a temprana edad los cerdos en los sistemas de crianza intensiva, causa un desbalance entre la presencia de bacterias patógenas y no patógenas que colonizan el intestino (Fox, 1988), afectando directamente el rendimiento de los animales de granja (Kurzak *et al.*, 1998). En el período de crecimiento de los cerdos la microbiota intestinal normal puede ser afectada por cambios en la ración alimenticia, alteraciones de la temperatura y humedad relativa del ambiente, cantidad de animales por unidad de superficie, grado de ventilación y diversas variaciones de las condiciones ambientales como las resultantes de la aplicación de productos medicamentosos, lo que puede ocasionar desequilibrio y proliferación de la microbiota patógena (Marutas, 1993).

El período de destete es cuando los lechones sufren cambios bruscos (separación de su madre y mezcla con cerdos de otras camadas, cambios en la dieta y en el ambiente) en un momento en donde la inmunidad lactacional llega a su fin (Kyriakis *et*

al., 1999). De esta forma, se ve facilitado el ingreso y multiplicación de *Escherichia coli* K88 y *Salmonella* spp., reconocidos agentes etiológicos de diarreas en neonatos y cerdos destetados (Sharon, 1986; Bertschinger *et al.*, 1992; Wilcock & Schwartz, 1992).

Las bacterias patógenas invaden la mucosa intestinal y pueden producir enterotoxinas que causan diarrea y muerte de los cerdos (Bertschinger *et al.*, 1992). En el proceso de infección el primer paso es la adhesión de la bacteria al epitelio mediante lectinas ubicadas en su superficie, las cuales intervienen en este proceso de unión de las bacterias a las mucosas (Sharon, 1987). La forma en que los probióticos evitan esta adhesión es por competición de los sitios de unión a través de lectinas de estructura similar a las del patógeno (Meng *et al.*, 1998) y así mejoran el balance de la microbiota intestinal en lechones luego de la ingestión de BAL, en particular disminuyendo las enterobacterias en las heces de los cerdos (De Angelis *et al.*, 2007).

II.4. Características deseables de las cepas probióticas y su evaluación *in vitro*

La comunidad científica ha consensuado la manera de seleccionar bacterias potencialmente probióticas, debiéndose realizar en forma obligatoria una evaluación preliminar *in vitro* y posteriormente la validación en pruebas *in vivo* (FAO/OMS, 2002).

Los microorganismos deben ser aislados desde animales de la misma especie donde serán utilizados (Gilliland *et al.*, 1980) y en especial del mismo lugar donde actuará en el huésped (sitio específico del tracto gastrointestinal) (Havenaar *et al.*, 1992). Esto permite aprovechar el efecto conocido como de especificidad de hospedador (“host-specific effect”) (Fuller, 1997). La existencia de sitios específicos en el tubo digestivo tiene fundamento en la capacidad de las cepas de adherirse a las células del epitelio intestinal (Fuller, 1989)

Este principio es utilizado para asegurar que las BAL aisladas persistan en el tracto gastrointestinal cuando sean utilizadas como probióticas, aunque naturalmente la microbiota intestinal está conformada por microorganismos autóctonos y alóctonos. Los primeros son aquellos que ocupan un nicho en el intestino cumpliendo una función en la compleja ecología microbiana, mientras que los segundos ingresan con el agua y los alimentos (Berg, 1996) siendo residentes temporarios. Las cepas autóctonas poseen una fuerte asociación con el hospedador y son una población estable en una región particular del intestino. En caso de no existir el nicho para un microorganismo dado es muy difícil que este pueda permanecer, razón por la cual los niveles de población y especies de la microbiota indígena gastrointestinal son muy estables.

La consideración de que las cepas sean utilizadas en la misma especie que se aisló está comenzando a ser revisada por algunos autores (Morelli, 2007), debido a la dificultad de determinar si un microorganismo es verdaderamente autóctono. Un indicio de su adaptación a ese ambiente, es la capacidad de permanecer en el tubo digestivo por un periodo de tiempo prolongado. *L. reuteri* y *L. johnsonii* son especies autóctonas en los cerdos según diversos autores (Leser *et al.*, 2002, Walter, 2008) y poseen diferentes factores, que han sido identificados por biología molecular, que les permiten persistir en el tracto gastrointestinal. Algunos de ellos son proteínas de superficie para adherirse a células epiteliales, exopolisacáridos para la formación de biofilms y proteasas para protegerse de la acción de las IgA (Walter, 2008).

El desempeño de los microorganismos probióticos puede variar en individuos de la misma especie, por lo que resulta adecuado que el inóculo a utilizar este formado por varias cepas (Gardiner *et al.*, 2004) para que sea más efectivo (Timmerman *et al.*, 2004). La ventaja de los inóculos multicepa es que tienen la posibilidad de

complementar sus efectos y es más probable que logren la colonización del complejo ecosistema gastrointestinal (Frizzo, 2007).

La búsqueda de los mejores exponentes de la microbiota debe considerar la capacidad de lograr un efecto benéfico en el hospedador, resistir la bilis y bajo pH (barreras naturales del tracto intestinal), poseer capacidad de adhesión a las mucosas digestivas, ser seguro para su uso en el alimento y/o con funciones terapéuticas, no ser patógeno, poseer buenas propiedades tecnológicas y sobrevivir en condiciones de almacenamiento (Fuller, 1989; Ziemer & Gibson, 1998; Ouwehand *et al.*, 1999). Todo ello se debe hacer prestando especial atención al origen ecológico de las bacterias, su tolerancia a las condiciones hostiles del estómago y el intestino delgado y su capacidad de adherirse a las superficies intestinales (Morelli, 2007) para realizar una adecuada selección.

Los microorganismos utilizados en los inóculos probióticos son comúnmente suministrados en el alimento (Chou & Weimer, 1999) y por vía oral llegan a su principal sitio de acción: el intestino. Para alcanzar este sitio, deben atravesar barreras naturales del organismo, resistiendo las condiciones adversas del estómago e intestino delgado para llegar viables en un número de 10^6 - 10^7 UFC/g de alimento y así ejercer su efecto beneficioso.

El estómago es un importante componente del tracto gastrointestinal que actúa como obstáculo en la colonización de microorganismos patógenos y bacterias beneficiosas, debido a la secreción ácida (Lallès *et al.*, 2007). La evaluación de la tolerancia al ácido es un criterio general que es aplicado durante la selección de potenciales cepas probióticas para garantizar su viabilidad y funcionalidad (FAO/OMS,

2001) y por lo tanto una propiedad deseable de los microorganismos (Corcoran *et al.*, 2005).

El pH luminal del estómago de los cerdos está influenciado por diversos factores, los más importantes son el tipo de alimento, el momento de la alimentación y la edad. En términos generales el pH gástrico en lechones pre y post destete estaría entre 3 y 4,9 (Jonsson & Conway, 1992). Lawrence (1970) demostró en cerdos con diferentes dietas un pH máximo de 3,8 a 4,8 a los 30 min. Luego de la alimentación va descendiendo gradualmente hasta llegar a 2 a las 7,5 horas.

Si bien los lactobacilos son intrínsecamente resistentes al bajo pH (Tannock, 2004) ocasionado por la presencia de ácido láctico el cual es producto de su metabolismo, es necesario conocer en qué grado lo son para seleccionar las cepas más aptas. La tolerancia a la acidez depende no sólo de la cepa, sino también de la fuente de energía disponible en el medio. La glucosa en condiciones de acidez puede mejorar la sobrevivencia de los probióticos proveyendo el ATP requerido para la exclusión de los hidrogeniones (H⁺) (Corcoran *et al.*, 2005) hacia afuera de las células. En las bacterias patógenas la tolerancia al bajo pH puede ser considerado un factor de virulencia, ya que les permite resistir la acidez en el estómago y en los fagosomas de los macrófagos facilitando la infección (Cotter & Hill, 2003).

Los ácidos débiles (como los producidos por el metabolismo de las BAL) tienen una potente actividad antimicrobiana. Esto es debido a que pasan libremente a través de las membranas celulares por no estar disociados en las condiciones intestinales (Cotter & Hill, 2003). En el pH citoplasmático de los patógenos que generalmente es más alto que el del medio, al pasar estos ácidos se disocian liberando protones y acidificando el interior celular.

Existe una combinación de estrategias constitutivas e inducibles por los microorganismos para resistir a la acidez, como eliminar protones del citoplasma, alcalinizar el ambiente externo, cambiar la composición de la envoltura celular, producir proteínas de shock y chaperonas y expresar reguladores transcripcionales que pueden contribuir a la supervivencia (Cotter & Hill, 2003).

Los mecanismos que colaboran a la resistencia a la acidez son esenciales para la funcionalidad y producción de cultivos probióticos (Azcarate-Peril *et al.*, 2004). En las BAL los mecanismos principales para tolerar el bajo pH involucran una bomba de protones dependiente de ATP (F_1F_0 -ATPasa) (Corcoran *et al.*, 2005), el sistema de arginina deaminasa (ADI) y la glutamato descarboxilasa (GAD) (Cotter & Hill, 2003). El sistema GAD funciona incorporando un aminoácido al citoplasma bacteriano, el cual es descarboxilado y el producto resultante es eliminado fuera de la célula. En esta reacción se consume un protón, aumentando el pH intracelular. En el sistema ADI una enzima transforma por desaminación la arginina en ornitina la cual es eliminada fuera de la bacteria; producto de esta reacción la célula incorpora amoníaco (NH_3) el cual toma un protón y se convierte en amonio (NH_4^+) (Curran *et al.*, 1995).

La habilidad de los microorganismos de resistir un stress (usualmente letal) puede ser mejorado por exposición previa a condiciones subletales (Maus & Ingham, 2003). La pre-exposición puede ser con un stress diferente al que se quiere inducir mayor resistencia, a lo que se denomina adaptación cruzada. En los lactobacilos esta propiedad ha sido demostrada, por ej. en la exposición a bilis se provee protección a las altas temperaturas y pre-exponiendo a NaCl se suministra tolerancia a la bilis y a las altas temperaturas.

La respuesta a la tolerancia al ácido involucra la inducción de genes del shock ácido y depende de diversos sistemas de regulación (Azcarate-Peril *et al.*, 2004) que pueden solaparse en estos casos, ya que muchos injuriantes tienen efecto similar en la fisiología celular y pueden causar la inducción de un mismo paquete de proteínas de stress. Este solapamiento de proteínas puede actuar no sólo en la protección cruzada, sino también en otros mecanismos.

L. acidophilus mejora la capacidad de sobrevivir a las condiciones de acidez (pH 4,0) cuando es pre-expuesto a desafíos menos severos (pH 5,5) con respecto a células que no fueron pre-expuestas (Lorca *et al.*, 2002). Esta capacidad de adaptación podría ser utilizada para mejorar la resistencia en situaciones puntuales como las próximas al procesamiento tecnológico, pero no sería de utilidad para el paso por el tubo digestivo debido a que son proteínas que se expresan por un corto período de tiempo.

Los microorganismos probióticos también deben superar otra barrera natural como la que significa la bilis. Chateau *et al.* (1994) consideraron de vital importancia la resistencia de las cepas a la bilis durante la selección de microorganismos probióticos. El suministro a terneros de cepas de *L. acidophilus* con alta tolerancia a la bilis permite aumentar los recuentos de lactobacilos en la primera parte del intestino delgado, respecto a cepas de baja tolerancia (Gilliland *et al.*, 1984).

La secreción biliar está formada por colesterol, fosfolípidos, pigmentos y ácidos biliares. Estos últimos son los componentes activos principales, sintetizados en el hígado a partir de colesterol y pueden ser secretados como compuestos desconjugados en una fracción minoritaria, o bien conjugados mediante unión peptídica con glicina o taurina (glico y tauroconjugados). La conjugación les proporciona mayor solubilidad en el agua y a pH intestinal se encuentran casi totalmente ionizados. Por lo tanto, se

favorece la formación de sales con cationes (especialmente con sodio) y es por ello que con frecuencia se llamen sales biliares (González Gallego, 1995). La función que ejercen es facilitar la digestión de las grasas de la dieta a través de su acción emulsionante. Estas moléculas anfipáticas tienden a formar micelas cuando se encuentran por encima de una determinada concentración (concentración micelar crítica).

La bilis actúa primariamente sobre las membranas celulares ejerciendo su acción detergente, la cual fue comparada con la realizada por el dodecil sulfato de sodio y sugerido para utilizar en pruebas *in vitro* (Flahaut *et al.*, 1996). Aunque diversos factores determinan el efecto de la bilis sobre las paredes bacterianas, la concentración tiene la mayor importancia (Begley *et al.*, 2005). Los ácidos biliares en alta concentración pueden disolver rápidamente los lípidos de la pared celular causando la disociación de las proteínas integrales de ésta (Coleman *et al.*, 1980). Si bien, no existe consenso sobre la concentración de bilis que deben tolerar las cepas para su selección (Anukam & Koyama., 2007), numerosos trabajos admiten como adecuada la cantidad de 0,3% (Gilliland *et al.*, 1984; Mustapha *et al.*, 1997; Hyronimus *et al.*, 2000).

Las bacterias patógenas pueden ser muy resistentes a la bilis, por ej. la concentración mínima para actuar como bactericida sobre *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Typhi es de 60% y 18% respectivamente (Van Velkinburgh & Gunn, 1999). La capacidad de colonizar canales biliares en portadores crónicos de la enfermedad muestra la gran resistencia que poseen.

La tolerancia a la bilis es un rasgo específico de cada cepa, presentando una gran variabilidad dentro de una misma especie (Chateau *et al.*, 1994; Jacobsen *et al.*, 1999).

Diversos autores observaron que la resistencia cambiaba totalmente al evaluar distintas cepas de una misma especie (Begley *et al.*, 2005).

El tipo y estructura de los ácidos biliares que actúan sobre los microorganismos es otro factor importante (Begley *et al.*, 2005). La bilis bovina, que contiene principalmente sales biliares trihidroxiconjugadas (ácido taurocólico y glicocólico) es menos inhibitoria que la bilis porcina, la cual posee dihidroxiconjugados. Las sales biliares con dihidroconjugados (ácido glico/taurodeoxicólico y glico/tauroquenodeoxicólico) en su composición, pueden traspasar más rápidamente la membrana fosfolípida de las bacterias (Grill *et al.*, 2000).

La arquitectura y composición de la membrana puede jugar un rol clave en la resistencia a la bilis. Las modificaciones en las características de la membrana tales como su carga, hidrofobicidad y fluidez de lípidos pueden tener importantes consecuencias. La temperatura de crecimiento puede afectar a los lípidos de la membrana y por lo tanto la resistencia bacteriana. Daños conformacionales y estructurales de los lipopolisacáridos de las envolturas celulares causados por el congelamiento aumenta la susceptibilidad de *Escherichia coli* a los ácidos biliares. Además, fue observado que lactococos con el agregado de tween 80 en el medio de crecimiento modificaban su membrana y mejoraban su resistencia a la bilis (Kimoto *et al.*, 2002).

El efecto del estrés subletal puede inducir cambios de membrana que proveen protección (Russel *et al.*, 1995). Por ello, el proceso que sufran los microorganismos durante la incorporación al alimento modificará la expresión de determinados genes y las características de membrana tales como permeabilidad, fluidez o carga. Así, el ingreso al intestino y la exposición a bajas concentraciones a la bilis pueden incrementar

su tolerancia a ésta. Pero, como se dijo anteriormente, estas modificaciones en la resistencia de diversos injuriantes bacterianos permanecen por un período acotado en la célula bacteriana.

La presencia de enzimas que hidrolizan sales biliares (actividad BSH) es común en los lactobacilos (De Smet *et al.*, 1995) asociados con el ambiente gastrointestinal y puede ser utilizada como estrategia para resistir la acción biliar. La importancia de la actividad BSH en probióticos es discutida y existen diversas hipótesis (Begley *et al.*, 2006), por lo tanto no hay acuerdo en la comunidad científica sobre su valor real en la resistencia a la bilis (Gilliland *et al.*, 1984; Usman & Hosono, 1999).

La adhesión al epitelio intestinal y su capacidad de formar biofilms son características a tener en cuenta para la selección de microorganismos probióticos. Estas le permitirían cumplir su acción de exclusión frente a los patógenos intestinales (Forestier *et al.*, 2001), establecerse en su lugar de acción y estimular el sistema inmune.

La matriz extracelular (MEC) que se encuentra debajo de las células epiteliales intestinales está compuesta por una estructura estable. Los daños en la mucosa pueden exponer esta matriz y permitir la colonización e infección. La unión a la MEC por parte de los patógenos ha demostrado su importancia en la colonización de los mismos en los tejidos y las BAL pueden actuar uniéndose a esas estructuras para proteger al hospedador frente a la invasión patógena (Westerlund & Korhonen, 1993; Styriak *et al.*, 2003).

En las primeras etapas de adhesión microbiana existe una interacción hidrofóbica entre la célula bacteriana y el sustrato de contacto (Kiely & Olson, 2000). De todas maneras, una baja hidrofobicidad de la superficie celular no indica que la cepa tenga menores posibilidades de adherirse al epitelio intestinal, ya que dominios hidrofílicos

podrían también estar implicados (Savage, 1992). Van coillie *et al.* (2007) no detectaron relación entre la hidrofobicidad de lactobacilos con su capacidad de colonización o la de inhibición de *Salmonella in vivo*. Incluso, el microorganismo con menor hidrofobicidad demostró colonizar al menos tan bien como otras BAL y fue capaz de inhibir mejor a *Salmonella* spp. comparada con las altamente hidrofóbicas, indicando que hay otros factores que tienen efecto sobre la capacidad de adherirse al epitelio.

Los mecanismos de adhesión pueden necesitar de la participación de distintos constituyentes de superficie que interactúan para vencer fuerzas repulsivas (Gusils *et al.*, 2002). Entre ellos son las proteínas de la superficie celular las que le permiten interactuar con el epitelio y otras bacterias. La capacidad de adhesión puede ser evaluada *in vitro* a través de estudios de agregación. Esta última comprende la autoagregación, caracterizada por el agrupamiento de células de la misma cepa (Reniero *et al.*, 1992) y la coagregación cuando están involucradas células genéticamente diferentes (Rickard *et al.*, 2002). Ambos tipos de agregación fueron bien descriptos para lactobacilos. En el mecanismo de autoagregación de lactobacilos intervienen proteínas que se encuentran en el sobrenadante del cultivo (Kmet *et al.* 1995) y proteínas o lipoproteínas presentes en la superficie celular. El sobrenadante de un cultivo puede generar autoagregación del propio microorganismo que lo produjo y de otras BAL (Reniero *et al.*, 1992). La habilidad de las bacterias de coagregar patógenos puede funcionar como un importante mecanismo contra la infección (Reid *et al.*, 1988). Spencer & Chensson (1994) y Roselli *et al.* (2007) observaron que los lactobacilos que coagregan con un patógeno pueden favorecer su remoción e inhibir la adhesión a las paredes intestinales bloqueando el primer paso en la patogénesis. La capacidad de coagregación depende de las especies bacterianas implicadas, siendo específica entre

cepas y afectada por las condiciones ambientales en la que sucede esta interacción. El pH y la concentración salina del medio modifican esta característica, probablemente como consecuencia de la influencia sobre las cargas superficiales de las bacterias; así, el bajo pH y la alta concentración electrolítica la favorece (Vandevoorde *et al.*, 1992). Las proteínas son consideradas los principales mediadores de la adhesión entre bacterias, aunque participarían un conjunto de estructuras complementarias para el reconocimiento de las células implicadas.

Los microorganismos probióticos pueden producir sustancias que mejoran la respuesta del sistema inmune (activando macrófagos) o modulan la función del hospedador inmunocomprometido y ejercen un efecto de inhibición frente a patógenos. La producción de estos inhibidores (ácidos orgánicos y bacteriocinas) por las BAL les provee una ventaja competitiva frente a otros microorganismos durante la colonización del tubo digestivo (Bogoviš-Matijašić *et al.*, 2004).

Los efectos inhibitorios sobre microorganismos indeseables pueden deberse a la producción de ácido láctico, acético y propiónico por las bacterias lácticas hetero y homofermentativas o por formación de peróxido de hidrógeno (Huber, 1997; Nousiainen & Setälä, 1998). Los ácidos orgánicos producidos pueden ejercer su acción sobre patógenos causantes de diarrea en cerdos, como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli in vitro* (Van coillie., 2007 y) e *in vivo*. Alakomi *et al.* (2000) demostraron que el ácido láctico actúa permeabilizando la membrana celular de bacterias Gram negativas y puede resultar como un potenciador de otras sustancias bactericidas.

Los distintos tipos de ácidos producidos por el metabolismo bacteriano dependerán según como utilicen las fuentes de carbono disponibles en el medio (tipo de fermentación) y las condiciones de crecimiento. Además, los grupos bacterianos que

utilizan de la misma forma las fuentes de carbono, tienen un alto grado de variabilidad en la actividad antagónica frente a patógenos, lo que indica que otros factores antimicrobianos no identificados pueden estar actuando (Annuk *et al.*, 2003).

Las bacterias administradas para mejorar la salud y performance de cerdos deben poseer características que permitan o faciliten el procesamiento en la industria. La preparación de tales inóculos requiere la utilización de medios de cultivos que sean económicos y que aseguren condiciones óptimas de crecimiento de las cepas que lo componen (Soto *et al.*, 2006a). La resistencia a factores de stress durante los procesos de obtención del producto final, debe ser considerada, para establecer la aptitud de los microorganismos desde el punto de vista tecnológico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Toma de muestras y aislamiento

III.1.1. Obtención de muestras

Los animales utilizados para la obtención de las muestras fueron 6 cerdos sanos provenientes desde diferentes establecimientos productores de los distritos Rafaela, Humboldt, El Trébol (Pcia. de Santa Fe) y Pozo del Molle (Pcia. de Córdoba).

Las muestras fueron tomadas en la zona limpia de la playa de faena de un frigorífico habilitado. A cada animal se le extrajo una porción de 10 cm de intestino delgado situada a 20 cm de la válvula ileocecal (íleon terminal). Para ello, la porción del intestino a extraer fue identificada, atada mediante hilo de sutura y separada utilizando una tijera.

Una vez obtenidas, las muestras fueron envasadas en recipientes herméticos estériles y transportadas al laboratorio bajo refrigeración (Schneider *et al.*, 2004).

III.1.2. Aislamiento de los microorganismos

En el laboratorio de alimentos del Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV) - F.C.V. - U.N.L., se procedió a realizar raspajes de la mucosa de la porción de intestino extraída.

A partir de los mismos se realizaron diluciones decimales en solución de ringer $\frac{1}{4}$, las cuales fueron sembradas en placas con medios selectivos.

Los medios utilizados para el cultivo fueron LAMVAB para *Lactobacillus* (Hartemink *et al.*, 1997), Beerens para *Bifidobacterium* (Beerens, 1990) y agar selectivo

para *Enterococcus* (Slanetz & Bartley, 1957). Las placas fueron sembradas en superficie con espátula de Drigalsky e incubadas 48 h en anaerobiosis a 37 °C.

A partir de las placas que evidenciaron crecimiento, se recuperaron colonias teniendo en cuenta la selección de representantes de las distintas morfologías presentes. Cada colonia se repicó mediante dos pasajes sucesivos en caldo MRS (Britania) y un pasaje por agar MRS (Britania) para garantizar un correcto aislamiento de cada microorganismo.

III.1.3. Características fenotípicas de los aislamientos

Mediante las técnicas tradicionales, con el fin de obtener información básica inicial y antes de su conservación, se realizó la coloración de Gram, la prueba de la catalasa y por observación microscópica se determinó la morfología (cocos y bacilos) y la disposición espacial (cadenas, racimos, etc.) de los aislamientos.

III.1.4. Conservación de los aislamientos

Los aislados fueron conservados en un freezer a -80°C en crioviales con un 35% de glicerol como crioprotector. Todos los microorganismos fueron incorporados al cepario del DSPV.

III.2. Pruebas *in vitro*

III.2.1. Autoagregación

La prueba de autoagregación se realizó utilizando la técnica descrita por Reniero *et al.* (1992) con algunas modificaciones. Todos los aislamientos fueron cultivados 2 veces sucesivas en caldo MRS (Britania) en aerobiosis a 37 °C durante 24 h. De cada cultivo en crecimiento fueron tomadas alícuotas de 2 ml que fueron centrifugadas a 7000 X g durante 5 min. Desde estas, se obtuvo el sedimento bacteriano (pellet) en la parte inferior de los tubos y el sobrenadante (extracto libre de células), en la parte superior, el cual fue separado del pellet y almacenado. Los pellets fueron lavados 2 veces con 2 ml de solución Ringer ¼ estéril y resuspendidos en un volumen igual al original con la misma solución empleada anteriormente. Luego, se colocaron en microtubos estériles 900 µl de la suspensión bacteriana de cada aislado y 100 µl de su correspondiente extracto libre de células. Como control fue utilizado un tubo que contenía 1 ml de la suspensión bacteriana sin el agregado del sobrenadante. La incubación se realizó a temperatura ambiente y la lectura de los ensayos a tiempos predeterminados (30, 60, 90 y 120 min). El resultado de la prueba fue considerado positivo cuando se visualizó la formación de partículas similares a arena en el fondo del tubo. Estas formaciones fueron causadas por el agrupamiento de las células bacterianas (autoagregación), las cuales fueron descendiendo al fondo del tubo y clarificando la parte superior (Reniero *et al.*, 1992).

III.2.2. Coagregación con patógenos

El ensayo de coagregación se realizó según Kmet *et al.* (2001) a aquellos aislamientos positivos a la autoagregación. La cepa de *Salmonella* Dublin DSPV 595T se utilizó en este ensayo, la cual se obtuvo de un aislamiento realizado en la FCV a partir de órganos bovinos procedentes de una necropsia llevada a cabo en el Hospital de Salud Animal. Este microorganismo se mantuvo a -80 °C en medio BHI con 35% de glicerol y su perfil bioquímico se determinó mediante un ensayo con el sistema API 20 E (bioMérieux, Hazelwood, Mo.). La identificación fue realizada por el Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, dependiente de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (A.N.L.I.S.), “Dr. Carlos G. Malbrán”. La cepa se registró en la base de datos GenBank (número de acceso FJ997268).

Las bacterias que resultaron positivas a la prueba fueron posteriormente enfrentadas a *Escherichia coli* DSPV 247T. Este patógeno es de origen bovino y se obtuvo de un aislamiento realizado en la FCV-UNL a partir de órganos procedentes de una necropsia llevada a cabo en el Hospital de Salud Animal. Este microorganismo se mantuvo a -80 °C en medio BHI con 35% de glicerol. La cepa fue identificada mediante técnicas de biología molecular y registrada en la base de datos GenBank (número de acceso FJ997269).

III.2.2.1. Preparación de los aislamientos

Los aislamientos fueron sembrados en caldo MRS (Britania) e incubados a 37 °C durante 24 h. A partir de cada cultivo se centrifugaron 2 ml a 7000 X g durante 5 min, obteniendo el sedimento bacteriano (pellet) en la parte inferior de los tubos y el

sobrenadante (extracto libre de células), en la parte superior, el cual fue separado del pellet y desechado. Los pellets fueron lavados 2 veces con solución Ringer ¼ estéril. Finalmente fueron resuspendidos en solución Ringer ¼ estéril, en un volumen igual al original (Soto *et al.*, 2008a).

Los patógenos se sembraron en caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI-Britania) a 37 °C y repicados a las 24 h. Los cultivos obtenidos fueron centrifugados para la obtención del pellet, el cual fue lavado dos veces con Ringer ¼ estéril y resuspendido en esta solución con un volumen similar al inicial.

III.2.2.2. Ensayo *in vitro*

Para cada microorganismo se utilizaron dos tubos, el control y el experimental. El primero contenía 0,5 ml de la BAL aislada y 0,5 ml del patógeno y el segundo contenía 0,45 ml de la cepa BAL, 0,45 ml del patógeno y 0,1 ml de extracto libre de células de la bacteria utilizada. Todos los tubos fueron agitados por un lapso de 10 s e incubados a temperatura ambiente, efectuando lecturas a tiempos predeterminados (30, 60, 90 y 120 min).

El resultado de la prueba fue considerado positivo cuando se visualizó la formación de partículas similares a arena formadas por las células bacterianas (Coagregación), las cuales se depositaban en el fondo del tubo clarificando la parte superior.

III.2.3. Producción de sustancias inhibidoras

Las BAL fueron cultivadas en caldo MRS a 37 °C por 24 h. Los cultivos fueron centrifugados y los sobrenadantes obtenidos se esterilizaron por filtración. El extracto libre de células (ELC) estéril de cada microorganismo se sometió a la determinación de la presencia de inhibidores según lo establecido por Klaenhammer (1988). Los ELC de cada aislado fue dividido en partes iguales, una de las cuales se dejó tal como se obtuvo del cultivo (ELC sin neutralizar) y la otra se llevó a pH 6 utilizando Na (OH) 2 M (ELC neutralizado). La prueba fue realizada utilizando como indicadores las cepas de *Salmonella* Dublin DSPV 595T, *Salmonella* Typhimurium DSPV 542T, *Salmonella* Dublin DSPV 559T y *Escherichia coli* DSPV 247T. Los patógenos se incubaron a 37 °C en caldo BHI (Britania) y fueron subcultivados a las 24 h. Posteriormente, 60 µl del cultivo de la cepa indicadora se adicionó a 12 ml de agar BHI fundido (50 °C) contenido en un tubo de ensayo, el cual se agitó y plaqueó. Una vez solidificado el agar fue secado durante 15 min en estufa. Posteriormente se realizaron sendos hoyos de 7 milímetros de diámetro en el agar con un sacabocados estéril. Para cada microorganismo se emplearon 2 hoyos y en uno de ellos se colocó 20 µl de ELC neutralizado y en otro un volumen igual sin neutralizar. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 min para promover la difusión de la potencial sustancia inhibidora y luego se incubaron a 37 °C. La lectura de los resultados se efectuó a las 24 h. La misma consistió en la visualización y medición del diámetro de los halos de inhibición producidos sobre la cepa indicadora (patógeno). Los halos correspondían a zonas donde el patógeno fue inhibido y el agar se mostraba transparente (sin crecimiento).

III.2.4. Crecimiento en bilis

Los aislamientos fueron colocados en caldo MRS (Britania) y expuestos a diferentes concentraciones de bilis para conocer su resistencia y capacidad de desarrollo ante esta situación de stress.

La metodología utilizada fue la empleada por Gilliland & Walker (1990) con algunas modificaciones. Para ello, fueron utilizadas microplacas de ELISA estériles con 96 cavidades provistas de tapa. En cada cavidad se colocaron 240 µl de medio MRS con diferentes concentraciones de bilis (oxgall) de 0% (control), 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6% y 7%. Todos los microorganismos fueron sembrados (3,2 µl de cultivo) por triplicado en cada concentración de bilis, dejándose cavidades sin sembrar para ser utilizados como blancos.

La incubación fue realizada 37 °C durante 12 h y cada 1 h se midió la absorbancia en un lector de ELISA a una longitud de onda de 650 nm.

Los resultados obtenidos se abordaron de diferentes maneras para conocer el comportamiento de las distintas cepas cuando fueron expuestas a esta situación estresante. De esta manera, se analizaron comparando: 1) el tiempo que necesitaron las cepas para alcanzar una determinada densidad óptica (DO) (Gilliland *et al.*, 1984; Chateau, 1994; Hyronimus *et al.*, 2000; Liong & Shah, 2005), 2) las diferencias de DO entre las concentraciones de bilis y los controles de cada cepa estudiada (Mustapha *et al.*, 1997) y 3) tres parámetros de crecimiento (Ahn *et al.*, 2003): el crecimiento máximo (N-Max), la duración de la fase lag (t-lag) y la tasa máxima de crecimiento bacteriano (Mumax). Para cuantificar los resultados de las cepas se empleó un modelo logarítmico de regresión $y=0,6451\ln(x)+8,6336$ (Frizzo, 2007) con el cual se transformaron los

valores de absorbancia a logaritmos de unidades formadoras de colonias por mililitro (\log_{10} UFC/ml). Una vez obtenidos los \log_{10} UFC/ml los resultados fueron procesados utilizando el programa MicroFit[®] v1.0 basado en el modelo de Baranyi & Roberts (1994) para obtener los parámetros estudiados.

A partir de los ensayos en que se utilizó MRS sin bilis, fue evaluado el crecimiento de los microorganismos en condiciones óptimas, para predecir la capacidad de desarrollo y multiplicación a escalas mayores (capacidad de producción a escala) (Gibson & Fuller, 2000). Para ello, el N-Max, la duración de la fase t-lag y la Mumax fueron analizadas de la misma forma descripta anteriormente.

III.2.5. Crecimiento en medio ácido

Los aislamientos fueron expuestos a diferentes valores de pH de acuerdo a lo descrito por Du toit *et al.* (1998). Para ello, se utilizaron microplacas de ELISA estériles con 96 cavidades provistas de tapa.

El medio de cultivo utilizado fue caldo MRS (Britania) cuyo pH fue ajustado a 2, 3, 4, 5 y 6,5 mediante la adición de ácido clorhídrico 2 M.

En las cavidades de cada microplaca se colocaron 240 μ l de caldo MRS con los diferentes valores de pH. Las microplacas fueron precalentadas durante 10 min a 37 °C y la siembra efectuada por triplicado en cada valor de pH con un volumen de 3,2 μ l de cultivo por cavidad. La incubación fue realizada durante 24 h a 37 °C.

El crecimiento se evaluó realizando mediciones de la absorbancia en un lector de ELISA, a una longitud de onda de 650 nm, cada 1 h hasta la hora 10 y a las 12 y 24 h. Los resultados obtenidos por las cepas se cuantificaron empleando un modelo

logarítmico de regresión $y=0,6451\ln(x)+8,6336$ (Frizzo, 2007), con el cual se transformaron los valores de absorbancia en \log_{10} UFC/ml. Posteriormente, los resultados fueron procesados por el programa MicroFit[®] v1.0 basado en el modelo de Baranyi & Roberts (1994) para obtener los parámetros estudiados. Los resultados obtenidos fueron expresados a través de tres parámetros: crecimiento máximo (N-Max), duración de la fase lag (t-lag) y tasa máxima de crecimiento bacteriano (Mumax).

III.3. Identificación de los microorganismos

Los microorganismos seleccionados que poseían características *in vitro* deseables para formar parte de un potencial inóculo probiótico fueron identificados utilizando técnicas moleculares.

III.3.1. Aislamiento del ADN bacteriano

El proceso de obtención de ADN de las células bacterianas se realizó a partir de un cultivo de 24 h en caldo MRS (Britania) de cada microorganismo. Alícuotas de 2 ml de los cultivos fueron tomadas y centrifugadas a 14000 X g durante 5min. El sedimento fue congelado a -20 °C durante 24 h para facilitar la lisis celular (Soto *et al.*, 2008c).

El ADN fue recuperado según la metodología utilizada por Marmur (1961) y modificada por Kurzak *et al.* (1998) y resuspendido en 50 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8).

La pureza del ADN obtenido se evaluó por medición en espectro UV a 260 nm y 280 nm y su integridad fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% p/v, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV.

III.3.2. Amplificación de secuencias de ADN

La amplificación se realizó desde una porción del gen 16S rDNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un termociclador (MJ Research®). Los fragmentos de ADN obtenidos poseían un tamaño de 1,5 kpb y 0,8 kpb, según los primers utilizados. Los primeros fueron obtenidos usando los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Kim & Chun, 2005). En el caso de los fragmentos más pequeños se utilizaron los primers 27F y 609R (5'-GGACTACCAGGGTATCTAATC-3') (Müller *et al.*, 2000).

Cada tubo de PCR contenía 50 µl de una mezcla de reacción conformada por 5 µl de ADN molde, 10 µl 5X PCR buffer para *Taq* polimerasa (Promega®), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (Promega®), 0,4 µM de cada primer, 2U de *Taq* Polimerasa (Promega®) y agua estéril hasta alcanzar los 50 µl.

La programación del termociclador fue la siguiente: 94 °C por 5 min; 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min; y la etapa final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y observados bajo luz UV después de la tinción con bromuro de etidio.

III.3.3. Secuenciación, identificación y registro de las secuencias

Los productos de PCR fueron purificados con el kit Wizard PCR SV Gel & PCR Clean-Up System (Promega®) y luego secuenciados por un servicio especializado.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las registradas en la base de datos GenBank usando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; (Benson *et al.*, 2000) y finalmente depositadas en la Base de datos GenBank mediante la

web-based data submission tool, BankIt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt>, (Benson *et al.*, 2000).

III.4. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA y el test de Duncan para determinar la existencia de diferencias significativas del crecimiento de las cepas al ser expuestas a los diferentes pHs y concentraciones de bilis. Las pruebas estadísticas se realizaron con el Programa SPSS 15.0 para Windows.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. Aislamientos obtenidos y características fenotípicas básicas

Los microorganismos aislados a partir de los raspajes de mucosa intestinal fueron un total de 143, de los cuales se obtuvieron 65 en el medio LAMVAB, 46 en el medio Beerens y 32 en agar selectivo para *Enterococcus*.

Las pruebas para conocer características fenotípicas básicas mostraron que todos los microorganismos fueron Gram positivos y catalasa negativos. La morfología observada de los aislamientos en LAMVAB y Beerens fue en forma de bacilos solos, de a pares o en cadenas y los obtenidos en agar selectivo para *Enterococcus* fueron cocos solos o en cadenas.

IV.2. Identificación de los microorganismos

Las bacterias identificadas fueron solo aquellas que obtuvieron la mejor performance en los ensayos de autoagregación, coagregación y producción de sustancias inhibitoras frente a patógenos. Los microorganismos que reunían tales condiciones provenían del medio de aislamiento LAMVAB.

IV.2.1. Secuenciación y determinación de las especies

Las secuencias obtenidas fueron registradas en la base de datos GenBank. Los resultados y números de acceso se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Especies de bacterias ácido lácticas aisladas desde el intestino de cerdos.

Cepa	Cerdo	Especie	pb	% de identidad	Numero de acceso
DSPV 001C	1	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	1466	99%	GQ231435
DSPV 002C	3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	1471	99%	GQ231436
DSPV 003C	4	<i>Lactobacillus agilis</i>	790	97%	GQ231437
DSPV 004C	5	<i>Lactobacillus reuteri</i>	803	99%	GQ231438
DSPV 005C	1	<i>Lactobacillus agilis</i>	1455	97%	GQ231439
DSPV 006C	2	<i>Lactobacillus ruminis</i>	792	99%	GQ231440
DSPV 008C	4	<i>Lactobacillus reuteri</i>	804	99%	GQ231441
DSPV 009C	4	<i>Lactobacillus agilis</i>	790	97%	GQ231442
DSPV 010C	2	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	799	99%	GQ231443
DSPV 011C	3	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	801	99%	GQ231444
DSPV 012C	3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1468	99%	GQ231445
DSPV 013C	4	<i>Lactobacillus agilis</i>	1457	97%	GQ231446
DSPV 014C	5	<i>Lactobacillus salivarius</i>	790	99%	GQ231447

IV.3. Pruebas *in vitro*

Los resultados obtenidos en las pruebas de autoagregación, coagregación y producción de sustancias inhibitoras se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Ensayos de autoagregación, coagregación y producción de sustancias inhibitoras utilizando sobrenadantes sin neutralizar el pH.

Cepas	Autoagregación ⁽¹⁾	Coagregación ⁽¹⁾		Inhibición ⁽²⁾			
		<i>Sal.monella dublin</i> DSPV 595T	<i>Escherichia coli</i> DSPV 247T	<i>Sal.monella Dublin</i> DSPV 595T	<i>Sal.monella typhim.</i> DSPV 542T	<i>Sal.monella Dublin</i> DSPV 559T	<i>Escherichia coli</i> DSPV 247T
<i>Lactobacillus johnsonii</i> DSPV 001C	30	30	60	3	-	3	3
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 002C	30	120	90	4	3	2	-
<i>Lactobacillus agilis</i> DSPV 003C	60	30	30	5	4	3	2
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 004C	30	60	60	-	-	-	-
<i>Lactobacillus agilis</i> DSPV 005C	30	90	30	3	3	3	4
<i>Lactobacillus ruminis</i> DSPV 006C	60	30	60	4	3	4	4
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 008C	15	60	60	-	2	3	3
<i>Lactobacillus agilis</i> DSPV 009C	30	30	60	5	5	6	5
<i>Lactobacillus johnsonii</i> DSPV 010C	15	30	30	3	4	4	3
<i>Lactobacillus johnsonii</i> DSPV 011C	30	60	60	4	3	2	4
<i>Lactobacillus fermentum</i> DSPV 012C	60	90	30	3	3	5	2
<i>Lactobacillus agilis</i> DSPV 013C	90	60	30	4	4	4	3
<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV 014C	60	30	30	5	5	4	5

⁽¹⁾: En mm que necesitó la cepa para agregar o coagregar.

⁽²⁾: En mm que poseía el halo de inhibición sobre el microorganismo indicador utilizado.

(-): No se observó halo de inhibición.

IV.3.1 Autoagregación

Las cepas fueron capaces de autoagregar en su totalidad a diferentes tiempos (tabla 2). *L. johnsonii* DSPV 010C y *L. reuteri* DSPV 008C lo hicieron rápidamente (15 min), *L. agilis* DSPV 013C empleo el mayor tiempo (90 min) y los microorganismos restantes lo hicieron en tiempos que fueron de 30 a 60 min.

IV.3.2. Coagregación con patógenos

Los 13 Lactobacilos fueron positivos a la prueba de coagregación. *L. reuteri* DSPV 002C, *L. agilis* DSPV 005C y *L. fermentum* DSPV 012C coagregaron entre 90 a 120 min frente, al menos, a uno de los patógenos utilizados (tabla 2), mientras que el resto de las cepas lo hicieron entre los 30 a 60 min.

IV.3.3. Producción de sustancias inhibidoras

Los ELC de todos los microorganismos causaron algún grado de inhibición cuando fueron utilizados sin neutralizar, exceptuando a *L. reuteri* DSPV 004C (tabla 2). Sin embargo, cuando fueron neutralizados no se encontró efecto inhibitorio.

Las cepas que originaron mayores halos fueron *L. agilis* DSPV 009C y *L. salivarius* DSPV 014C y las restantes inhibieron en menor medida a los cuatro patógenos dando halos de inhibición más pequeños (tabla2).

IV.3.4. Crecimiento en bilis

IV.3.4.1. Tiempo utilizado para alcanzar 0,3 de DO

El 38% de las cepas estudiadas (5 de 13) alcanzaron la densidad óptica de 0,3 en las concentraciones del 1% al 4% de bilis en menos de 12 h y ellas fueron *L. johnsonii* DSPV 001C, *L. reuteri* DSPV 002C, *L. reuteri* 004C, *L. ruminis* DSPV 006C y *L. agilis* DSPV 010C. De estas, sólo dos alcanzaron el parámetro de densidad predeterminado entre el 5% al 7% de bilis en menos de 12 horas (tabla 3).

El resto de los microorganismos mostraron ser más vulnerables a la acción de la bilis y necesitarían más de 12 horas para alcanzar el valor 0,3 de DO.

Tabla 3: Tiempo requerido por las cepas para alcanzar una DO de 0,3 a una longitud de onda de 650 nm.

	<i>L. johnsonii</i> DSPV 001C	<i>L. reuteri</i> DSPV 002C	<i>L. reuteri</i> DSPV 004C	<i>L. ruminis</i> DSPV 006C	<i>L. johnsonii</i> DSPV 010C
Control	5,01 ± 0,12 ^{a,b} (a)	4,47 ± 1,63 ^a (a)	6,32 ± 0,23 ^{b,c} (a)	8,16 ± 1,22 ^d (a,b)	7,15 ± 0,06 ^{c,d} (a)
Bilis 1%	7,60 ± 0,04 ^a (b)	7,92 ± 0,37 ^a (b,c)	8,15 ± 0,79 ^a (b)	10,06 ± 1,87 ^b (c)	10,10 ± 0,04 ^b (b)
Bilis 2%	7,33 ± 0,17 ^a (b)	7,33 ± 0,17 ^a (b)	8,44 ± 0,34 ^b (b)	7,43 ± 0,85 ^a (a,b)	10,93 ± 0,62 ^c (c)
Bilis 3%	9,48 ± 0,87 ^{a,b} (c)	9,49 ± 0,87 ^{a,b} (c,d)	10,78 ± 0,92 ^{b,c} (c)	8,28 ± 0,17 ^a (b)	11,07 ± 0,76 ^c (c)
Bilis 4%	10,08 ± 1,32 ^b (c,d)	10,08 ± 1,32 ^b (d)	8,94 ± 0,52 ^b (b)	6,36 ± 0,54 ^a (a)	10,46 ± 0,10 ^b (b,c)
Bilis 5%	9,40 ± 0,10 ^b (c)	> 12	8,99 ± 0,14 ^b (b)	7,38 ± 0,35 ^a (b,c)	10,45 ± 0,26 ^c (b,c)
Bilis 6%	9,82 ± 0,09 ^b (c,d)	> 12	8,90 ± 0,89 ^{a,b} (b)	7,94 ± 0,34 ^a (b,c)	> 12
Bilis 7%	10,71 ± 0,02 ^d	> 12	9,06 ± 0,56 ^b	> 12	> 12

Todos los valores están expresados en horas.

^{a,b,c,d}: Diferencias significativas entre columnas para la misma concentración de bilis.

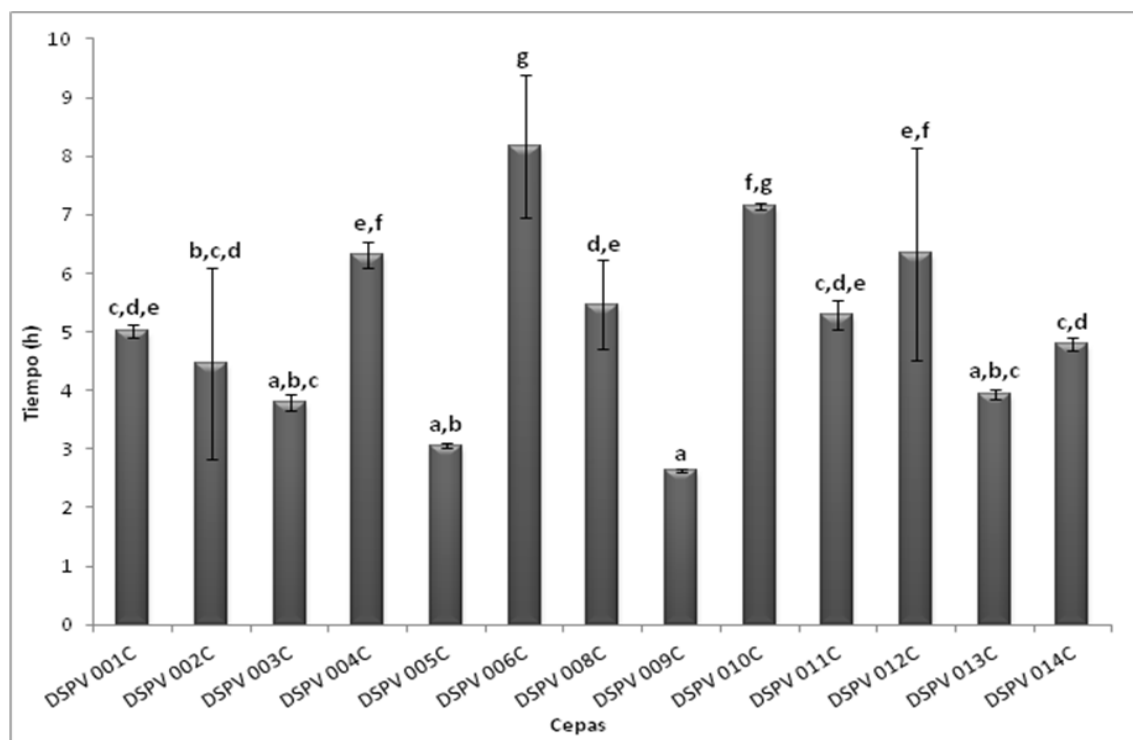
^(a,b,c,d): Diferencias significativas entre filas para la misma cepa.

L. ruminis DSPV 006C expuso una mínima variación en las distintas concentraciones y fue la única cepa que, exceptuando al 1%, no mostró diferencias significativas entre el control y las concentraciones de bilis.

Los lactobacilos restantes prolongaron el tiempo para alcanzar 0,3 de DO a medida que aumentaba la cantidad de la bilis, siendo las diferencias significativas entre el control y el 1% de bilis en todos los casos.

Los controles de todas las cepas evaluadas alcanzaron el valor predeterminado de DO, realizándolo en diferentes tiempos como muestra el gráfico 1. Los microorganismos mostraron valores de 2,63 h (*L. agilis* DSPV 009C) a 8,16 h (*L. ruminis* DSPV 006C).

Gráfico 1: Tiempo requerido por las cepas lácticas para alcanzar una DO de 0,3 en ausencia de bilis.



a,b,c,d,e,f,g: Diferencias significativas entre columnas ($P < 0,05$).

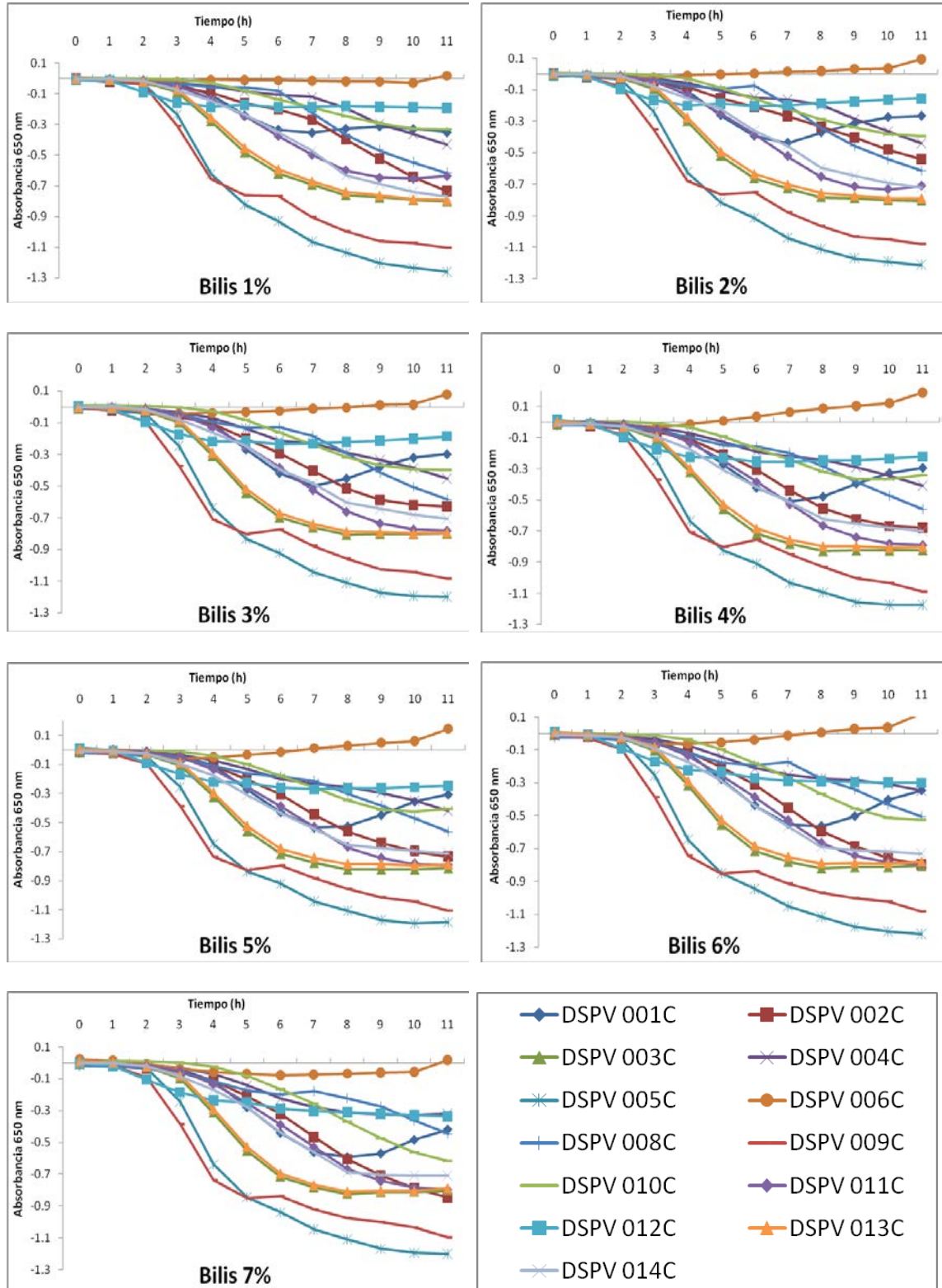
IV.3.4.2. Diferencias de DO en un medio con y sin bilis

Las cepas aumentaron paulatinamente las diferencias de DO a medida que transcurría el tiempo cuando crecían en los medios con bilis respecto al control. Estas fueron pequeñas en las primeras horas y a partir de la hora 4 comenzaron a ampliarse. En ese momento podría establecerse un punto de corte, a partir del cual, la mayoría de los microorganismos mantienen esa tendencia en su crecimiento durante el resto del ensayo.

Las concentraciones de bilis no hicieron variar en gran forma el comportamiento de cada BAL (Gráfico 2). Las mejores performances dependieron del período observado, sin embargo *L. ruminis* DSPV 006C fue la menos afectada a lo largo de todo el ensayo. En el período de 5 h a 7 h *L. reuteri* 004C, *L. reuteri* DSPV 008C y *L. agilis* DSPV 010C, mostraron las mejores condiciones de crecimiento respecto al control, (solamente fueron superadas por *L. ruminis* DSPV 006C) mientras que sobre el final del ensayo (8 h a 11 h) se incorporaron a este grupo *L. fermentum* DSPV 012C y *L. jonhsonii* DSPV 001C quienes mostraron mejor desarrollo (Gráfico 2).

Las cepas que mas disminuyeron el crecimiento en todas las concentraciones de bilis fueron *L. agilis* DSPV 003C, *L. agilis* DSPV 005C, *L. reuteri* DSPV 009C y *L. agilis* DSPV 013C (Gráfico 2).

Gráfico 2: Diferencias de DO respecto al control de las cepas lácticas que crecieron entre el 1% al 7% de bilis.



IV.3.4.3. Estudio de parámetros de crecimiento

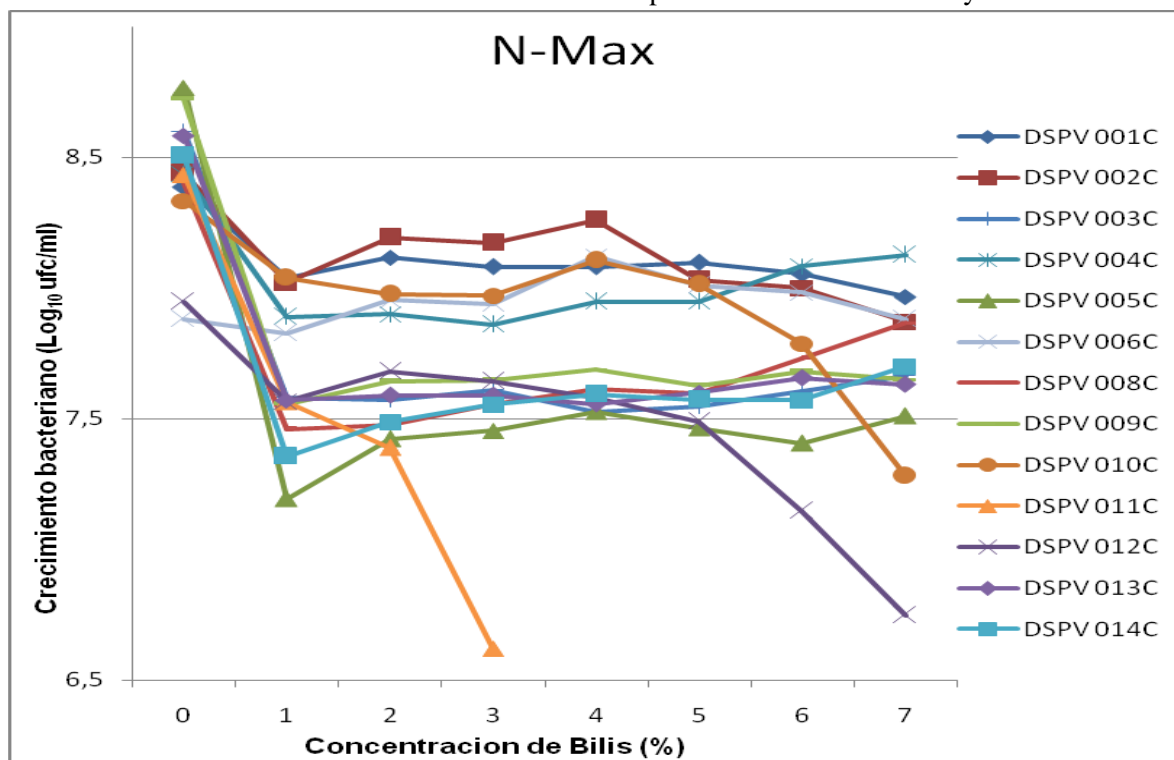
El estudio incluyó 13 cepas de las cuales *L. johnsonii* DSPV 011C sólo pudo analizarse hasta la concentración del 3% de bilis, ya que ante mayores cantidades de bilis, el crecimiento era afectado de forma importante y los datos obtenidos no pudieron ser introducidos al programa utilizado.

IV.3.4.3.1. Crecimiento máximo (N-Max)

Los lactobacilos disminuyeron su N-Max con diferencias significativas en las concentraciones de bilis respecto a sus controles, exceptuando *L. reuteri* DSPV 002C, quien no mostró diferencias entre el control y las concentraciones 1% al 6% de bilis y *L. ruminis* DSPV 006C, que sólo estableció diferencias al 4% y 5% pero con un crecimiento mayor respecto al control (Gráfico 3).

Entre las concentraciones de bilis utilizadas el N-Max de la mayoría de las cepas sufrió leves modificaciones o no mostró cambios. Las excepciones fueron: *L. johnsonii* DSPV 011C que disminuyó con diferencias significativas en todas las concentraciones, *L. agilis* DSPV 010C y *L. fermentum* DSPV 012C que lo hicieron a partir del 5% de bilis (gráfico 3) y finalmente *L. reuteri* DSPV 004C la cual mostró la particularidad de crecer mejor al 6% y 7% de bilis respecto a las restantes concentraciones (excepto al 0%).

La diferencia promedio entre el crecimiento máximo de todos los lactobacilos entre los controles y el 1% de bilis fue de 0,74 log₁₀ UFC/ml, mientras que entre el 1% y el 7% de bilis fue de 0,02 log₁₀ UFC/ml.

Gráfico 3: Crecimiento máximo de los lactobacilos expuestos a bilis entre el 0% y el 7%.

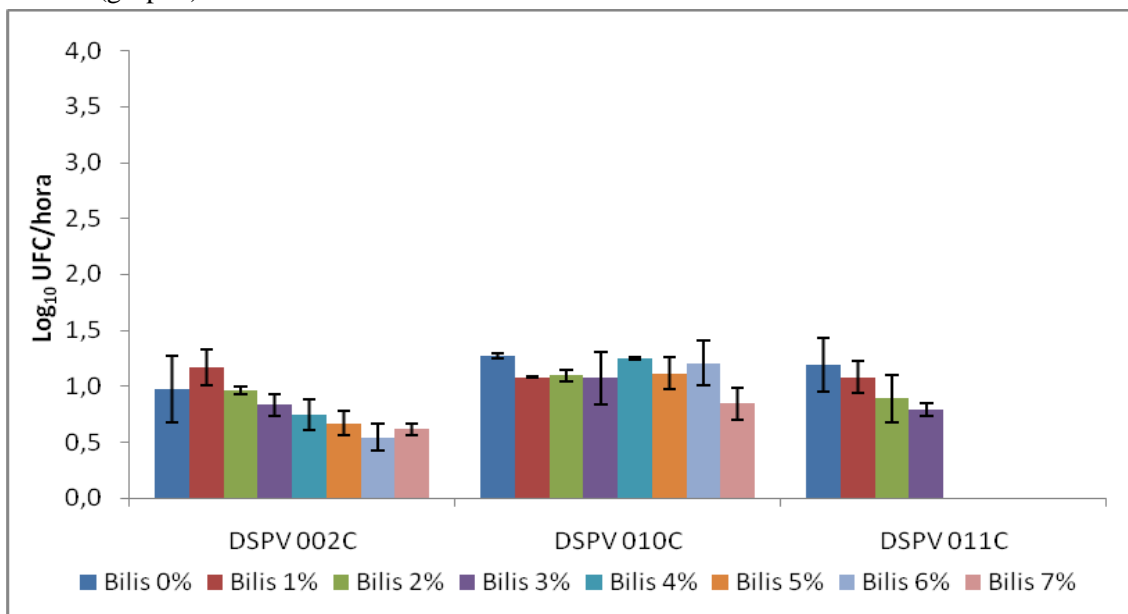
Los microorganismos que alcanzaron valores más altos en la concentración del 1% al 6% fueron *L. johnsonii* DSPV 001C, *L. reuteri* DSPV 002C, *L. reuteri* DSPV 004C, *L. ruminis* DSPV 006C y *L. agilis* DSPV 010C con un crecimiento mayor de 1,5 \log_{10} UFC/ml. Diferencias significativas fueron observadas entre las dos primeras cepas respecto a las tres últimas en las concentraciones del 2 y 3%.

Las cepas con menor N-Max fueron *L. johnsonii* DSPV 011C y *L. agilis* DSPV 005C. Esta última mostró valores bajos en todas las concentraciones y el mayor impacto negativo en su desarrollo fue en la concentración de 1% de bilis, con una disminución respecto al control de 1,57 \log_{10} UFC/ml.

IV.3.4.3.2. Tasa de crecimiento (Mumax)

La Mumax de los lactobacilos estudiados fue afectada por la bilis en forma variable y se los pudo clasificar en tres grupos de acuerdo al tipo de comportamiento que tuvieron las cepas frente a este inhibidor (Gráficos 4, 5 y 6). El primer grupo de cepas conformado por *L. reuteri* DSPV 002C, *L. johnsonii* DSPV 010C y *L. johnsonii* DSPV 011C no mostraron diferencias en sus tasas de crecimiento en las primeras concentraciones de bilis respecto a los controles, para luego descender la Mumax a medida que se incrementaba la cantidad de bilis o mantenerse sin diferencias significativas (Gráfico 4).

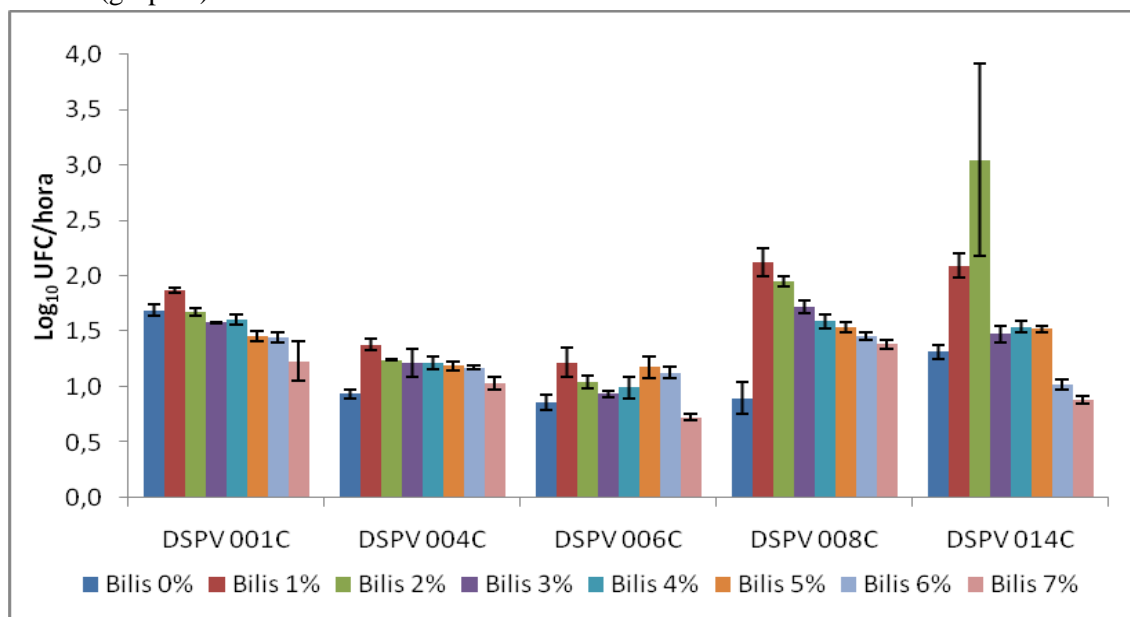
Gráfico 4: Tasa de crecimiento máximo de las cepas expuestas a concentraciones de 0% y 7% de bilis (grupo1).



El segundo grupo estuvo integrado por *L. johnsonii* DSPV 001C, *L. reuteri* DSPV 004C, *L. ruminis* DSPV 006C, *L. reuteri* DSPV 008C y *L. salivarius* DSPV 014C mostraron valores mayores respecto a sus controles. En general, se observó un aumento

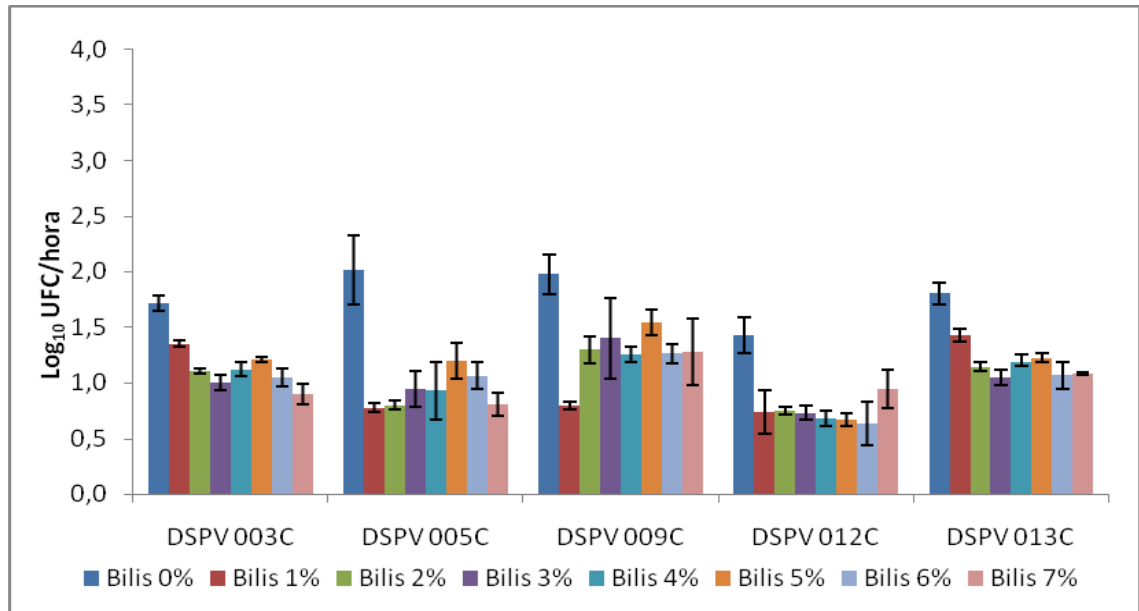
de la tasa de crecimiento en las concentraciones bajas de bilis para luego descender paulatinamente en concentraciones superiores (Gráfico 5).

Gráfico 5: Tasa de crecimiento máximo de las cepas expuestas a concentraciones de 0% a 7% de bilis (grupo 2).



En el tercer grupo la Mumax de los microorganismos fue mayor en los controles respecto a todos los niveles de bilis y a medida que esta aumentaba, los patrones de los comportamientos de las cepas fueron diferentes, ya que en algunos casos la tasa fue mayor en altas concentraciones respecto a las bajas y en otros a la inversa o no hubo grandes variaciones (Gráfico 6).

Gráfico 6: Tasa de crecimiento máximo de las cepas expuestas a concentraciones de 0% a 7% de bilis (grupo 3).



Las cepas que manifestaron una tasa mayor en las concentraciones de bilis fueron *L. johnsonii* DSPV 001C y *L. reuteri* DSPV 008C y el caso inverso sucedió con *L. reuteri* DSPV 002C, *L. agilis* DSPV 005C y *L. fermentum* DSPV 012C como se observa en la tabla 4.

Tabla 4: Tasa de crecimiento (\log_{10} UFC/hora) de los lactobacilos estudiados.

Cepa	Control	Bilis 1%	Bilis 2%	Bilis 3%	Bilis 4%	Bilis 5%	Bilis 6%	Bilis 7%
<i>L. johnsonii</i> DSPV 001C	1.69 ± 0,05 ^{d,e(d)}	1.87 ± 0,03 ^{e(e)}	1.68 ± 0,04 ^{d,e(d)}	1.58 ± 0,01 ^{f,g(c,d)}	1.60 ± 0,05 ^{e(d)}	1.46 ± 0,05 ^{c(c,d)}	1.45 ± 0,04 ^{d,e(b)}	1.23 ± 0,17 ^{e,f,g(a)}
<i>L. reuteri</i> DSPV 002C	0.973 ± 0,29 ^{a,b(c,d)}	1.17 ± 0,16 ^{b(c)}	0.96 ± 0,03 ^{a,b,c(d)}	0.83 ± 0,09 ^{a,b,c(b,c)}	0.75 ± 0,14 ^{a(a,b,c)}	0.67 ± 0,11 ^{a(a,b)}	0.54 ± 0,12 ^{a(a)}	0.62 ± 0,05 ^{a(a,b)}
<i>L. agilis</i> DSPV 003C	1.72 ± 0,06 ^{e,(f)}	1.35 ± 0,03 ^{c,d(e)}	1.10 ± 0,03 ^{a,b,c(b,c,d)}	1 ± 0,07 ^{b,c,d(a,b)}	1.12 ± 0,06 ^{c,d(c,d)}	1.21 ± 0,03 ^{b(d)}	1.05 ± 0,08 ^{b(b,c)}	0.90 ± 0,09 ^{b,c,d(a)}
<i>L. reuteri</i> DSPV 004C	0.94 ± 0,04 ^{a,b(a)}	1.38 ± 0,05 ^{c,d(c)}	1.24 ± 0,01 ^{b,c,d(b)}	1.21 ± 0,13 ^{d,e(b)}	1.22 ± 0,06 ^{d(b)}	1.19 ± 0,04 ^{b(b)}	1.18 ± 0,02 ^{b,c(b)}	1.03 ± 0,06 ^{c,d,e(a)}
<i>L. agilis</i> DSPV 005C	2.01 ± 0,31 ^{f(c)}	0.78 ± 0,04 ^{a(a)}	0.80 ± 0,04 ^{a,b(a)}	0.94 ± 0,16 ^{a,b,c(a,b)}	0.93 ± 0,26 ^{b(a,b)}	1.2 ± 0,16 ^{b(b)}	1.06 ± 0,12 ^{b,c(a,b)}	0.81 ± 0,10 ^{a,b,c(a)}
<i>L. ruminis</i> DSPV 006C	0.86 ± 0,07 ^{a(a,b)}	1.22 ± 0,13 ^{b,c(f)}	1.04 ± 0,06 ^{a,b,c(d,e)}	0.94 ± 0,03 ^{a,b,c(b,c)}	1 ± 0,1 ^{b,c(b,c)}	1.18 ± 0,1 ^{c(e,f)}	1.13 ± 0,05 ^{b,c,d,e,f)}	0.73 ± 0,03 ^{a,b(a)}
<i>L. reuteri</i> DSPV 008C	0.9 ± 0,15 ^{a,b(a)}	2.12 ± 0,13 ^{f(f)}	1.95 ± 0,05 ^{e(e)}	1.72 ± 0,06 ^{g(d)}	1.60 ± 0,06 ^{e(c,d)}	1.54 ± 0,05 ^{c(c)}	1.46 ± 0,03 ^{d,e(b,c)}	1.39 ± 0,04 ^{g(b)}
<i>L. agilis</i> DSPV 009C	1.98 ± 0,18 ^{e,(f)}	0.8 ± 0,04 ^{a(a)}	1.30 ± 0,12 ^{c,d(b)}	1.4 ± 0,36 ^{e,(f)}	1.26 ± 0,07 ^{d(b)}	1.54 ± 0,12 ^{b(b)}	1.26 ± 0,09 ^{c,d(b)}	1.28 ± 0,3 ^{f,g(b)}
<i>L. johnsonii</i> DSPV 010C	1.27 ± 0,02 ^{c(b)}	1.08 ± 0,01 ^{b(a,b)}	1.10 ± 0,05 ^{a,b,c(b)}	1.07 ± 0,24 ^{c,d(a,b)}	1.25 ± 0,01 ^{d(b)}	1.12 ± 0,14 ^{b(b)}	1.21 ± 0,2 ^{b,c(b)}	0.85 ± 0,14 ^{a,b,c,d(a)}
<i>L. johnsonii</i> DSPV 011C	1.19 ± 0,24 ^{b,c(b)}	1.08 ± 0,14 ^{b(a,b)}	0.89 ± 0,21 ^{a,b,c(a,b)}	0.79 ± 0,06 ^{a,b(a)}	Nd	Nd	Nd	Nd
<i>L. fermentum</i> DSPV 012C	1.42 ± 0,16 ^{c,d(c)}	0.74 ± 0,2 ^{a(a,b)}	0.75 ± 0,04 ^{a(a,b)}	0.73 ± 0,06 ^{a(a,b)}	0.68 ± 0,06 ^{a(a)}	0.67 ± 0,06 ^{a(a)}	0.63 ± 0,2 ^{a(a)}	0.94 ± 0,18 ^{b,c,d(b)}
<i>L. agilis</i> DSPV 013C	1.80 ± 0,1 ^{e,(f)}	1.43 ± 0,06 ^{d(d)}	1.15 ± 0,05 ^{a,b,c(a,b,c)}	1.04 ± 0,07 ^{b,c,d(a)}	1.19 ± 0,04 ^{d(b,c)}	1.22 ± 0,04 ^{b(c)}	1.07 ± 0,12 ^{b,c(a,b)}	1.08 ± 0,01 ^{d,e,f(a,b)}
<i>L. salivarius</i> DSPV 014C	1.32 ± 0,07 ^{c(a,b)}	2.09 ± 0,11 ^{f(c)}	3.05 ± 0,86 ^{f(d)}	1.48 ± 0,08 ^{f,g(b)}	1.54 ± 0,05 ^{e(b)}	1.52 ± 0,03 ^{c(b)}	1.02 ± 0,05 ^{b(a,b)}	0.88 ± 0,03 ^{b,c,d(a)}

a,b,c,d,e,f,g: Diferencias significativas entre microorganismos para la misma concentración de bilis ($P < 0,05$).

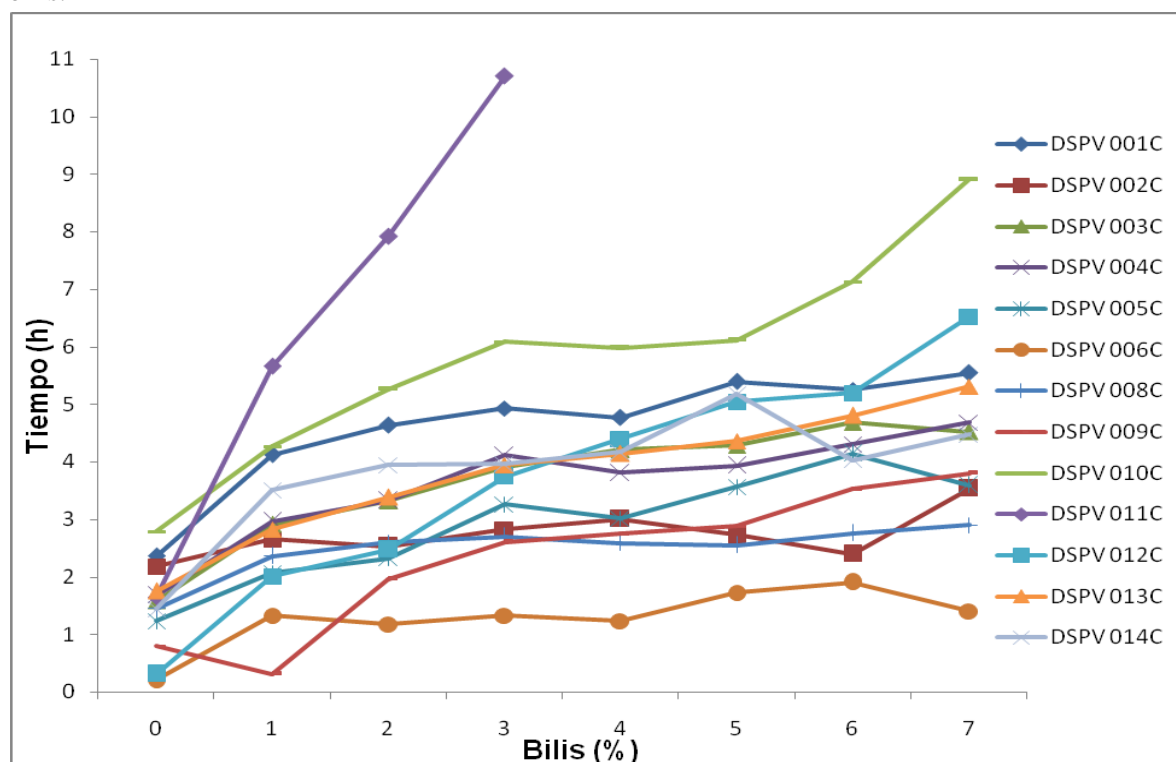
(a,b,c,d,e,f): Diferencias significativas entre filas para la misma cepa ($P < 0,05$).

Nd: No fue determinado.

IV.3.4.3.3. Tiempo de latencia (t-lag)

Las cepas aumentaron progresivamente su fase lag a medida que se incrementaba la concentración de bilis. En todos los microorganismos hubo diferencias significativas entre el 0% y el resto de las concentraciones de bilis, exceptuando *L. agilis* DSPV 009C y *L. reuteri* DSPV 002C. Esta última cepa sólo tuvo diferencias entre el control y el 7% de bilis.

Gráfico 7: Duración de la fase lag de las cepas aisladas para las distintas concentraciones de bilis.

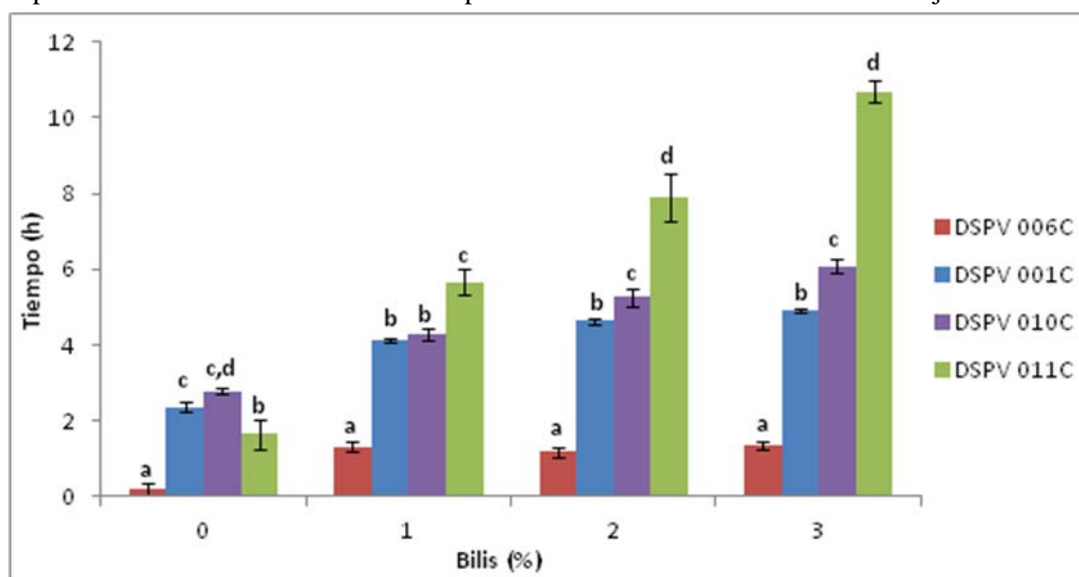


L. reuteri DSPV 002C, *L. agilis* DSPV 005C, *L. reuteri* DSPV 008C y *L. agilis* DSPV 009C fueron las menos afectadas en la concentración más baja de bilis respecto a sus controles (Gráfico 7).

L. ruminis DSPV 006C utilizó el menor tiempo en las concentraciones del 2% al 7% y en todas ellas el tiempo de latencia fue inferior a las 2 h. Los microorganismos

que prolongaron más su adaptación al medio para comenzar a crecer fueron *L. johnsonii* DSPV 001C, *L. johnsonii* DSPV 010C y *L. johnsonii* 011C (Gráfico 8) con diferencias significativas sobre los demás y los restantes utilizaron tiempos intermedios.

Gráfico 8: Comparación del tiempo de latencia de las cepas *L. johnsonii* aisladas en comparación con *L. ruminis* DSPV006C para las concentraciones de bilis más bajas.



a,b,c,d: Diferencias significativas entre microorganismos para la misma concentración de bilis ($P < 0,05$).

IV.3.5. Crecimiento en ácido

Los resultados de los ensayos de crecimiento a un pH de 2 y 3 no pudieron introducirse al programa Microfit[®]. Esto se debió a que el desarrollo microbiano fue insignificante (Gráfico 9 y 10) y por lo tanto los datos obtenidos no pudieron ser introducidos al programa empleado. Es por ello que solo fueron utilizados los valores de pH 4, 5 y 6,5 para evaluar los parámetros del crecimiento microbiano.

El gráfico 9 muestra el cambio de densidad óptica de microorganismos expuestos a pH 2, 3, 4, 5 y 6,5 (control).

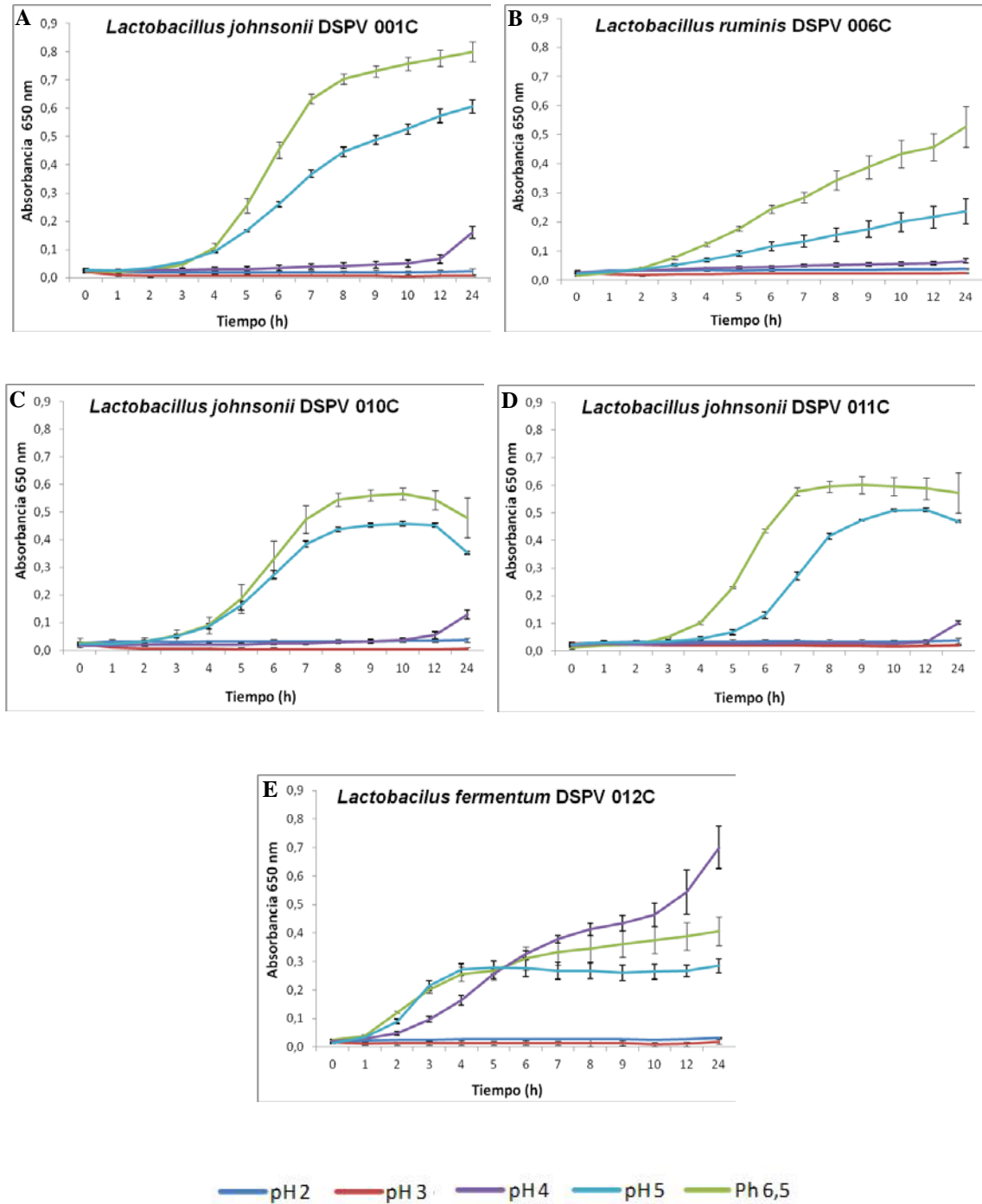
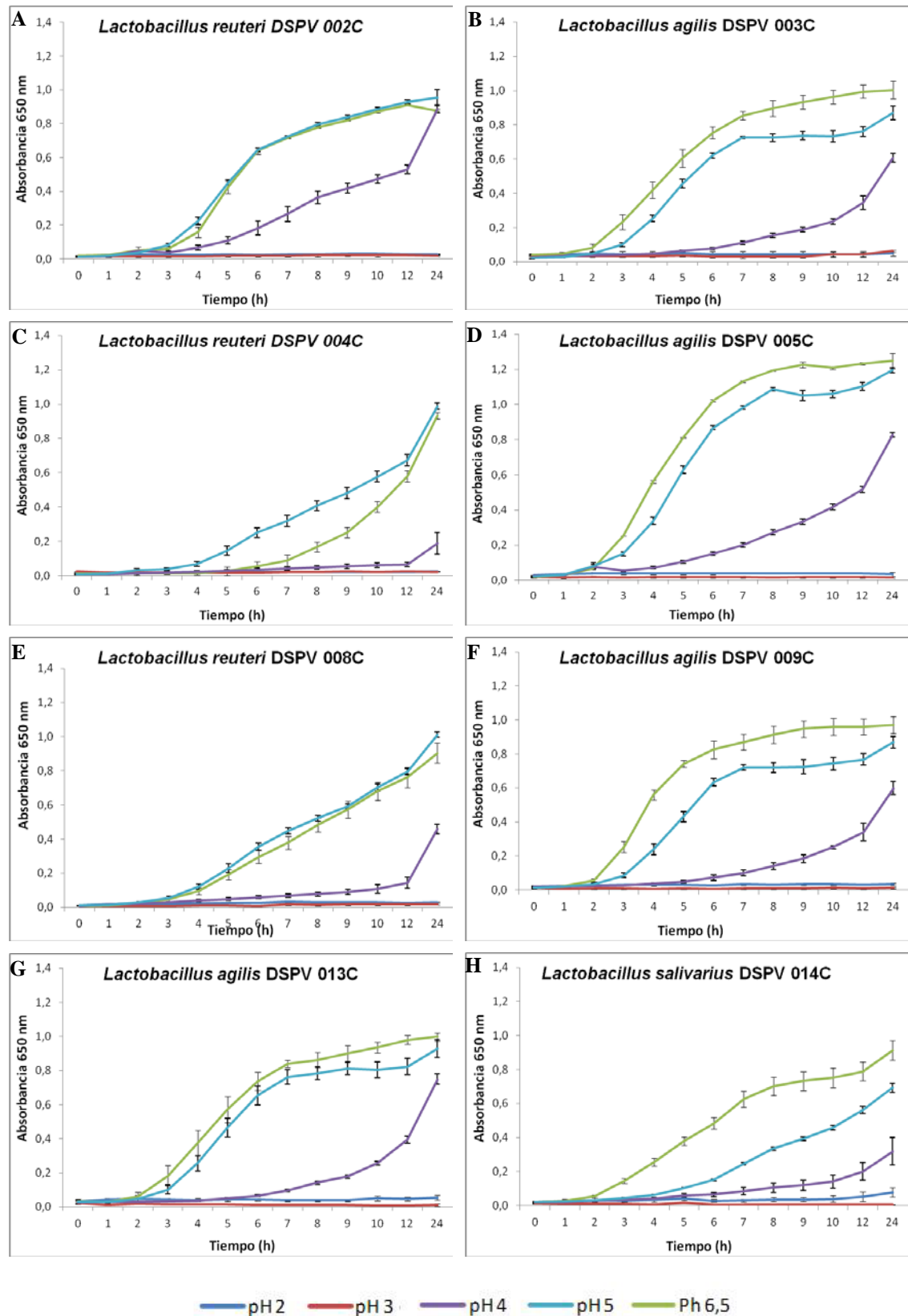
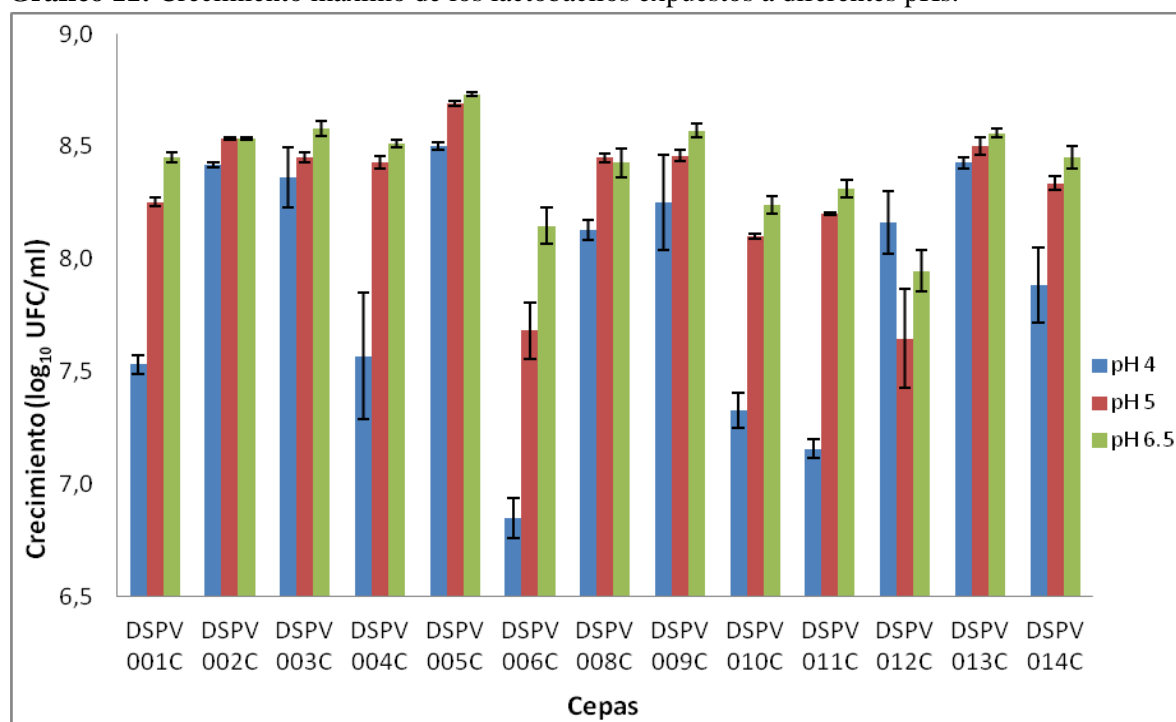
Gráfico 9: Lactobacilos que crecieron modificando $< 0,9$ la densidad óptica a pH 6,5.

Gráfico 10: Lactobacilos que crecieron modificando $> 0,9$ la densidad óptica a pH 6,5.

IV.3.5.1. Crecimiento máximo (N-Max)

Los microorganismos disminuyeron su N-Max en diferentes magnitudes al ser expuestos a pH 4 respecto a los restantes pHs. *L. fermentum* DSPV 012C fue la excepción a este comportamiento y la única cepa que no mostró diferencias estadísticas entre el pH 4 y el 6,5 (Gráfico 11).

Gráfico 11: Crecimiento máximo de los lactobacilos expuestos a diferentes pHs.

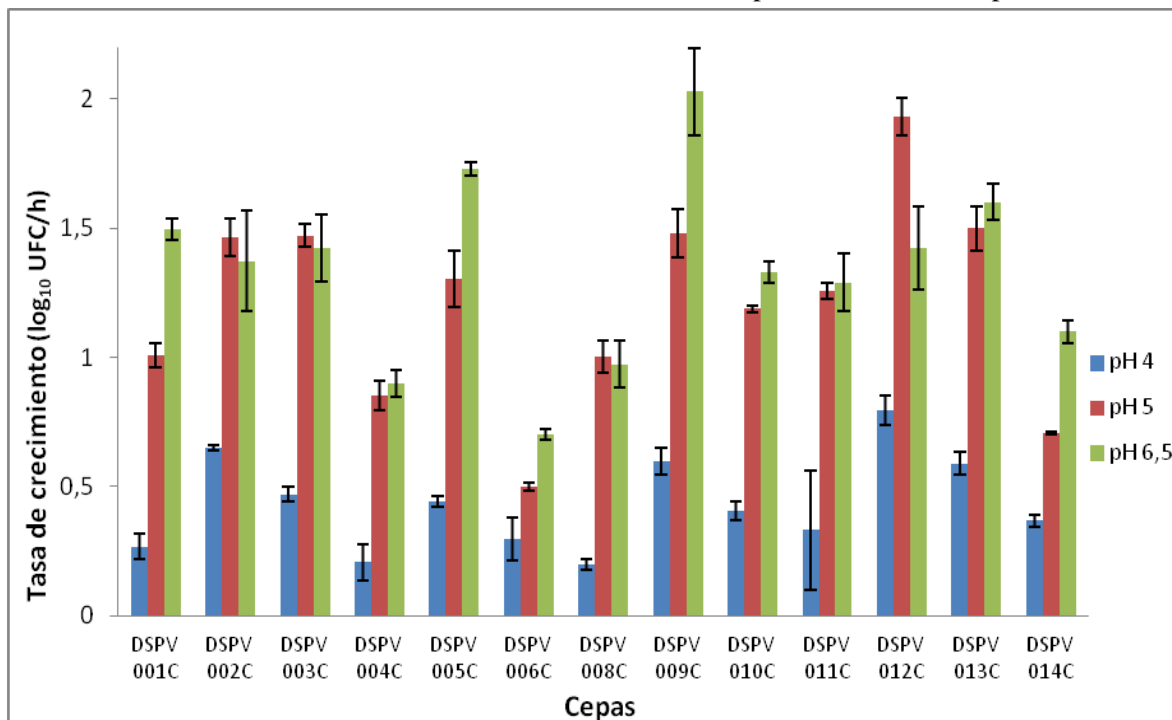


Las cepas con mayor crecimiento fueron *L. reuteri* DSPV 002C, *L. agilis* DSPV 003C, *L. agilis* DSPV 005C y *L. agilis* DSPV 013C. En cuanto a *L. ruminis* DSPV 006C su crecimiento no alcanzó a los 7 log₁₀ UFC/ml a pH 4 y demostró los menores valores en este parámetro, seguido por *L. johnsonii* DSPV 010C. Finalmente, el menor impacto negativo sobre su crecimiento respecto al control (pH 6,5) lo tuvieron *L. fermentum* DSPV 012C y *L. reuteri* DSPV 002C, el cual disminuyó sólo 0,12 log₁₀ UFC/ml.

IV.3.5.2. Tasa de crecimiento (Mumax)

La Mumax de los microorganismos mostró menor variabilidad entre las cepas a medida que disminuía el pH. Esto lo demuestra el hecho que la mayor amplitud de valores entre dos cepas a pH 4 fue de 0,59 log₁₀ UFC/h mientras que a pH 5 y 6,5 fue de 1,43 log₁₀ UFC/h y 1,33 log₁₀ UFC/h respectivamente. La totalidad de los lactobacilos mostraron diferencias significativas entre el pH más bajo y los dos superiores (Gráfico 12).

Gráfico 12: Tasa de crecimiento máximo de los lactobacilos expuestos a diferentes pHs.



L. fermentum DSPV 012C a pH 4 y 5 obtuvo el mayor valor de la tasa con diferencias sobre el resto de los microorganismos.

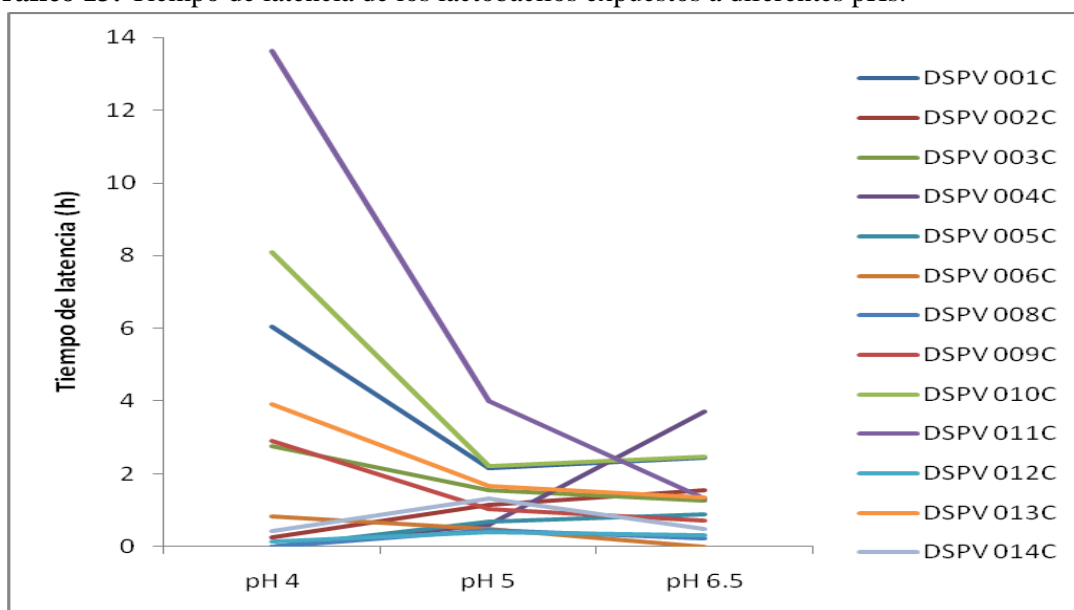
Las cepas estudiadas pueden nuclearse en tres grupos de acuerdo al comportamiento expresado frente a los diferentes pHs. Un grupo fue aumentando la tasa de crecimiento máxima a medida que se acrecentaba el pH (*L. johnsonii* DSPV 001C, *L.*

agilis DSPV 005C, *L. ruminis* DSPV 006C, *L. reuteri* DSPV 009C, *L. agilis* 010C y *L. salivarius* DSPV 014C). Otro grupo no mostró diferencias de crecimiento entre los dos valores de pHs superiores (5 y 6,5) y finalmente el último grupo integrado sólo por *L. fermentum* DSPV 012C quien obtuvo un valor superior en el pH 5 respecto al control.

IV.3.5.3. Tiempo de latencia (t-lag)

Los microorganismos mostraron dos tipos de comportamiento en cuanto a su tiempo de latencia. Por un lado, algunas cepas disminuyeron el tiempo de la fase lag a medida que aumentaba el pH, mientras que otras lo hicieron a la inversa. Sin embargo, en ambos casos las diferencias mayores se dieron entre el pH 4 y 5 (Gráfico 13).

Gráfico 13: Tiempo de latencia de los lactobacilos expuestos a diferentes pHs.



El tiempo que necesitaron para comenzar a crecer en forma exponencial a pH 4 fue menor a una hora en *L. reuteri* DSPV 002C, *L. reuteri* DSPV 004C, *L. agilis* DSPV 005C, *L. ruminis* DSPV 006C, *L. reuteri* DSPV 008C, *L. fermentum* DSPV 012C y *L. salivarius* DSPV 014C. Los microorganismos que más tiempo demoraron en comenzar

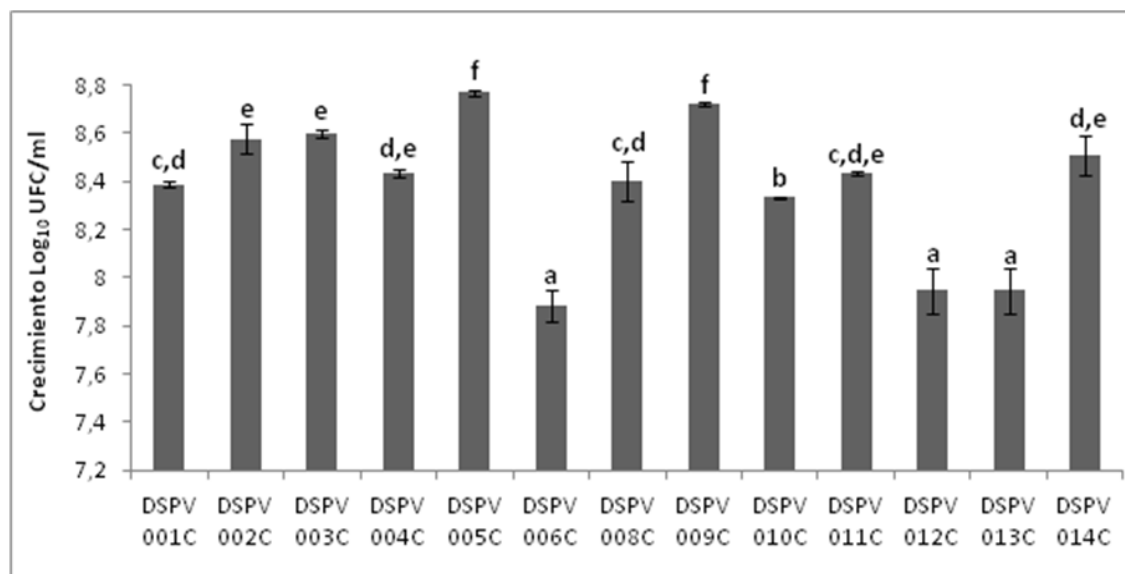
su crecimiento fueron *L. johnsonii* DSPV 011C y *L. johnsonii* DSPV 010C con 13,8 h y 8,1 h respectivamente, mientras que el resto de las cepas lo hicieron entre 3 y 6 h.

IV.3.6. Evaluación del crecimiento en condiciones óptimas

IV.3.6.1. Crecimiento máximo (N-Max)

Las cepas que alcanzaron mayor desarrollo fueron *L. agilis* DSPV 005C y *L. reuteri* DSPV 009C con valores de 8,7 log₁₀ UFC/ml estableciendo diferencias significativas sobre el resto de los microorganismos. En el otro extremo, con los menores crecimientos se encontraron *L. ruminis* DSPV 006C, *L. fermentum* DSPV 012C y *L. agilis* DSPV 013C los cuales no alcanzaron los 8 log₁₀ UFC/ml. Las cepas restantes obtuvieron un crecimiento máximo que estuvo entre 8,33 y 8,6 log₁₀ UFC/ml (Gráfico 14).

Gráfico 14: Crecimiento máximo de los lactobacilos en MRS.

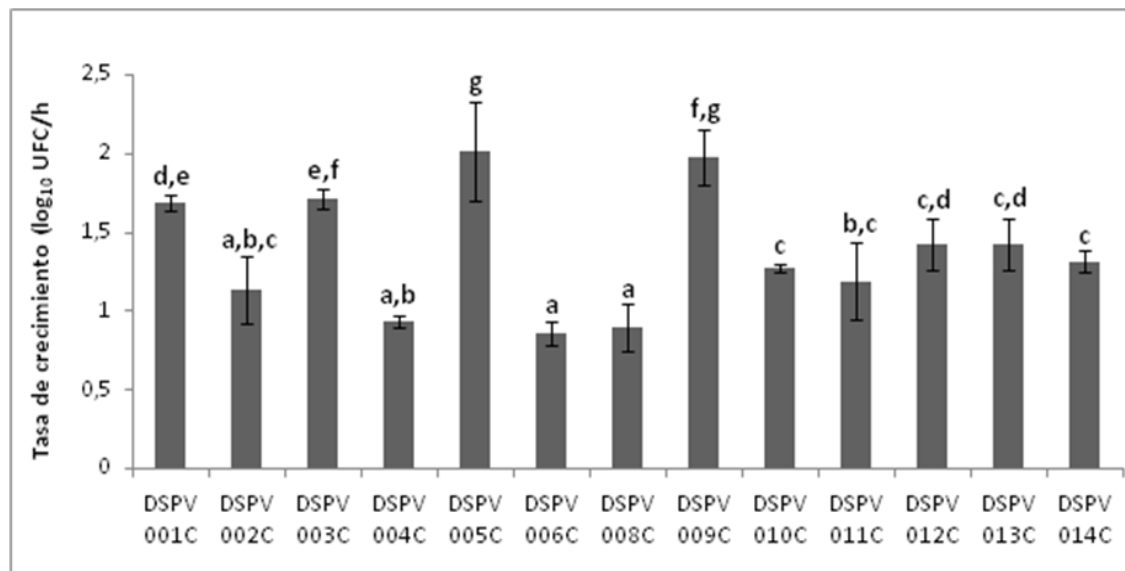


a,b,c,d,e,f: Diferencias significativas entre microorganismos ($P < 0,05$).

IV.3.6.2. Tasa de crecimiento (Mumax)

La Mumax fue mayor para las cepas *L. johnsonii* DSPV 001C, *L. agilis* DSPV 003C, *L. agilis* DSPV 005C y *L. reuteri* DSPV 009C con valores superiores a 1,5 log₁₀ UFC/h. En el otro extremo, obteniendo una tasa menor a 1 log₁₀ UFC/h, se situaron *L. ruminis* DSPV 006C, *L. reuteri* DSPV 008C y *L. reuteri* DSPV 004C y los microorganismos restantes tuvieron un comportamiento intermedio con valores entre 1 y 1,5 log₁₀ UFC/h (Gráfico 15).

Gráfico 15: Tasa de crecimiento máximo de los lactobacilos en MRS.



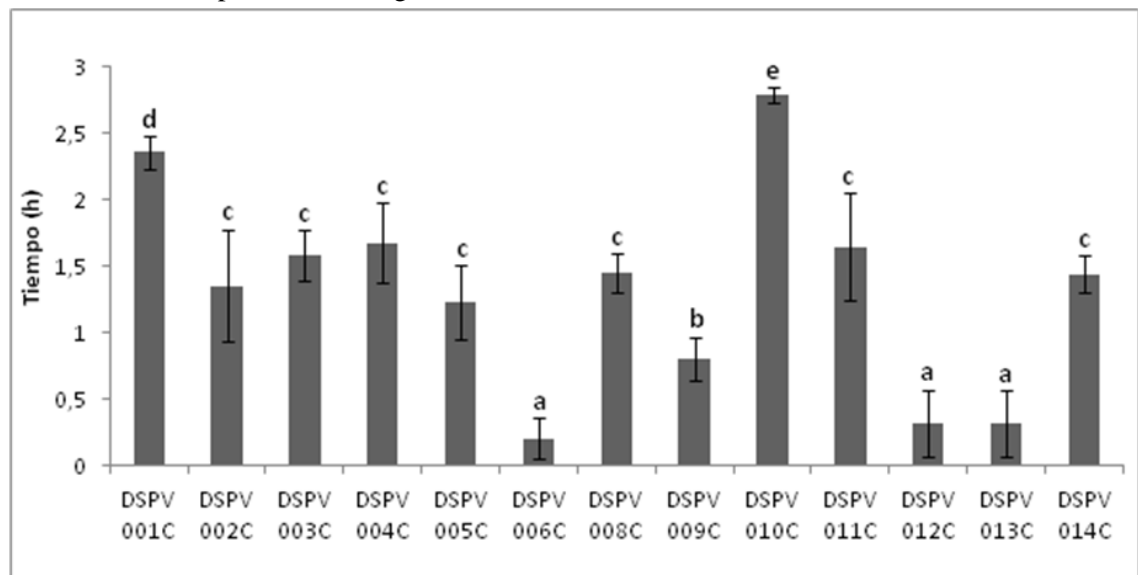
a,b,c,d,e,f: Diferencias significativas entre microorganismos ($P < 0,05$).

IV.3.6.3 Tiempo de latencia (t-lag)

Las cepas que mostraron los tiempos de latencia mas cortos fueron *L. ruminis* DSPV 006C (0,2 h), *L. fermentum* DSPV 012C (0,31 h) y *L. agilis* DSPV 013C (0,31 h) con diferencias significativas frente al resto. Estas BAL junto a *L. reuteri* DSPV 009C (0,8 h) fueron las únicas que cuyo t-lag fue inferior a 1 h (Gráfico 15).

Los microorganismos que mas prolongaron su latencia fueron *L. johnsonii* DSPV 001C y *L. johnsonii* DSPV 010C y los lactobacilos restantes obtuvieron valores intermedios de tiempo entre 1,2 h a 1,7 h sin diferencias estadísticas entre ellos (Gráfico 16).

Gráfico 16: Tiempo de la fase lag de los lactobacilos en MRS.



a,b,c,d,e,f : Diferencias significativas entre microorganismos ($P < 0,05$).

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

El medio LAMVAB demostró cualidades valiosas para el aislamiento de cepas potencialmente próbóticas las cuales pertenecieron al género *Lactobacillus*. Los microorganismos identificados no incluyeron algunas especies de lactobacilos citadas por otros autores (Leser *et al.*, 2002; Korhonen *et al.*, 2007) como predominantes en el tracto gastrointestinal de los cerdos. Este hallazgo podría deberse a que en los trabajos consultados utilizaron otras técnicas de aislamiento, junto a otros factores como es la influencia dietaria y medioambiental que afecta a los integrantes de la flora indígena de los cerdos. La identificación se realizó en una porción limitada de exponentes microbianos obtenidos a partir de un trabajo de selección que se llevo a cabo en un número importante de aislamientos. Gran parte de los aislamientos que integraban la flora porcina no fue identificada por considerarla inapropiada o de inferiores condiciones que las cepas seleccionadas. Esto inevitablemente produjo un sesgo en cuanto al tipo de microorganismos que fueron identificados e informados en este trabajo y explica, de alguna manera, porque no están presentes ciertas especies citadas por otros autores como integrantes de la microbiota normal de los cerdos.

Las especies identificadas tuvieron un porcentaje de homología entre el 97% y 99% respecto a las presentes en el GenBank; valores similares a los encontrados por Soto *et al.* (2010). Los resultados obtenidos validan el método utilizado en el aislamiento del ADN bacteriano, la posterior amplificación del gen específico y finalmente la secuenciación del mismo. Las especies de lactobacilos encontradas fueron 6 y coinciden con las aisladas por otros autores en intestino de cerdos. Las BAL identificadas como *L. reuteri* y *L. johnsonii* son lactobacilos predominantes del intestino

de cerdos sanos (Leser *et al.*, 2002). *L. agilis* y *L. salivarius* son encontrados en poblaciones microbianas intestinales de cerdos, pero en menor magnitud que los anteriores (Korhonen *et al.* 2007; Leser *et al.* 2002). Al Jassim (2003) determinó que *L. ruminis* es la BAL predominante del intestino grueso de cerdos, cumpliendo una importante función en la ecología microbiana del mismo. *L. fermentum* ha sido aislado en muchas especies de mamíferos y aves y Lin *et al.* (2007) la identificaron como la principal BAL del tracto gastrointestinal de aves de corral y porcinos. Las especies identificadas son parte de la microbiota indígena de cerdos de distintos orígenes lo que muestra su potencial para establecerse en el TGI aunque debería realizarse una comprobación *in vivo*. La información existente sobre las propiedades probióticas de cepas de *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. salivarius* y *L. fermentum* es abundante, sucediendo lo inverso con *L. ruminis* y *L. agilis* donde es escasa. La división del género *Lactobacillus* de acuerdo a la asignación filogenética brindada por Vandamme *et al.* (1996) coloca a *L. johnsonii* dentro del grupo *L. delbrueckii* y al resto de las especies identificadas en el grupo *L. casei-Pediococcus* con representantes de los tres fenotipos (tipo de fermentación). Las especies identificadas muestran de esta forma la diversidad de nichos que podrían ocupar para ser utilizadas en un inóculo multiespecie.

La autoagregación es una propiedad de superficie que puede utilizarse para iniciar el estudio de las interacciones microbianas (Frizzo, 2007). Hay una asociación entre la habilidad de los lactobacilos para adherirse al epitelio intestinal y la actividad de agregación (Wadstrom *et al.*, 1987). La presencia de esta característica en los microorganismos permitiría entrever la habilidad para adherirse e interactuar con la pared intestinal (Del Re *et al.*, 2000; Bertozzi *et al.*, 2007). La capacidad de las bacterias para adherirse al epitelio intestinal juega un papel importante en la colonización del

tracto gastrointestinal, evitando ser eliminadas por el peristaltismo y les proporciona una ventaja competitiva frente a la microbiota intestinal (Crociani *et al.*, 1995; Alander *et al.*, 1997). Los microorganismos con este comportamiento pueden competir por los sitios de fijación frente a patógenos causantes de diarreas y estimular el sistema inmune local y sistémico. Castagliuolo *et al.* (2004) demostraron que es indispensable la autoagregación por parte de las bacterias para ejercer su efecto protector en las colitis. Este ensayo sirve también de tamiz para descartar microorganismos durante la selección (Maldonado *et al.*, 2009), ya que las cepas con ausencia de esta característica funcional difícilmente se adhieran y persistan en el tubo digestivo en estudios *in vivo*, tal como lo demostraron Cesena *et al.* (2001). La totalidad de los lactobacilos identificados fueron positivos a la agregación y serían capaces de adherirse al epitelio intestinal y efectuar su acción competitiva frente a bacterias potencialmente productoras de diarreas. La autoagregación según la clasificación propuesta por Bujnakova & Kmet (2002) en ningún caso fue lenta, demostrando una alta potencialidad de las cepas para adherir a las paredes intestinales y formar biofilms protectores. Algunas cepas que han obtenido buenos resultados *in vitro*, no lo han confirmado *in vivo* (Morelli, 2007). Por lo tanto, habría que realizar pruebas *in vivo* para confirmar la habilidad de las cepas seleccionadas para colonizar el intestino de los cerdos (Cesena *et al.*, 2001).

La habilidad de las bacterias para coagregar frente a microorganismos perjudiciales puede funcionar como un importante mecanismo contra la infección (Reid *et al.*, 1988). Roselli *et al.* (2007) y Spencer & Chensson (1994) observaron cómo los lactobacilos al coagregar con patógenos pueden favorecer su remoción e inhibir la adhesión a las paredes intestinales bloqueando el primer paso en la patogénesis. La coagregación no está asociada necesariamente a la capacidad de autoagregar (Ehrmann

et al. 2002; Frizzo, 2007) y dependerá del patógeno utilizado (Soto *et al.*, 2008a), lo que justifica la realización de la prueba con diferentes patógenos y en aquellas cepas positivas a la autoagregación. El presente estudio mostró que *Salmonella* Dublin DSPV 595 y *E. coli* DSPV 247T fueron coagregadas por todos los lactobacilos identificados. En 10 de las cepas la velocidad de coagregación fue de 30 y 60 min, tiempos considerados como rápidos y normales por Bujnakova & Kmet (2002), mientras que *L. reuteri* DSPV002C, *L. agilis* DSPV 005C y *L. fermentum* DSPV 012C lo hicieron en forma lenta (90 min) frente a por lo menos uno de los patógenos utilizados. Los resultados permiten entrever potencial actividad de las cepas frente a patógenos en un ensayo *in vivo*. Esta habilidad puede ser modificada por condiciones ambientales o tecnológicas a las que pueden ser sometidas las bacterias durante la incorporación a un alimento, como es la presencia o ausencia de oxígeno y los tratamientos térmicos (Ekmecki *et al.*, 2009). En futuros ensayos, sería de interés incorporar las variables antes mencionadas para conocer el impacto en la coagregación de las cepas evaluadas.

La actividad antimicrobiana de las BAL utilizadas como probióticos juega un rol importante en su habilidad para competir con la microbiota residente y modificarla beneficiosamente (Frizzo, 2007). La misma, puede efectuarse por una serie de actividades microbianas como: producción de ácido láctico, consumo de los nutrientes disponibles, disminución del potencial redox, producción de peróxido de hidrógeno y producción de sustancias inhibidoras específicas como bacteriocinas (Havenaar *et al.*, 1992). A pesar de las limitaciones de las pruebas *in vitro*, en una primera etapa son útiles como elemento de selección en la detección de cepas probióticas (Annuk *et al.*, 2003). Existe una alta correlación entre el poder inhibitorio de los lactobacilos y la producción de ácidos orgánicos, cuya acción antimicrobiana frente a patógenos fue

demostrada en múltiples publicaciones (Brashears *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 2001; Servin, 2004). Si bien, la actividad antagónica entre microorganismos es generalmente especie específica, las bacterias Gram negativas son más sensibles a los ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos (Alakomi *et al.*, 2000). En el presente trabajo 12 de los 13 microorganismos estudiados inhibieron patógenos que están presentes en el tracto gastrointestinal. El efecto de inhibición fue debido a la producción de ácido láctico por parte de las BAL. Los halos producidos por las cepas fueron similares a los encontrados por Jacobsen *et al.* (1999) y fueron causados por la acción ácida de los sobrenadantes, ya que al ser neutralizados no se observaron evidencias de su efecto inhibitorio. Las cepas de *L. salivarius* DSPV014C y *L. agilis* DSPV009C fueron las que mayor inhibición produjeron en las especies de salmonellas utilizadas, tal como determinaron Casey *et al.* (2004) y Van coillie *et al.* (2007) en cepas obtenidas de bovinos y de aves respectivamente. Sin embargo, *L. reuteri* mostró gran variabilidad en la inhibición coincidiendo con los datos reportados con Van coillie *et al.* (2007). La capacidad para producir ácidos orgánicos se modifica de acuerdo al ambiente donde se desarrollan los microorganismos (Annuk *et al.*, 2003) y el tipo de fermentación que realicen (Vandamme, 1996). El ensayo fue efectuado en condiciones de aerobiosis y sin competencia con otros microorganismos, a diferencia del intestino donde existe anaerobiosis y gran competencia microbiana por los sustratos, los cuales podrían modificar la producción de ácidos por las cepas. La fuente principal de hidratos de carbono suministrada en el ensayo *in vitro* fue la glucosa, mientras que en el TGI existe una gran variedad de monosacáridos. Las bacterias utilizadas pertenecieron a los tres grupos de fermentación (homofermentativas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas) lo cual posibilita la utilización de sustratos variados a través de

vías metabólicas diferentes para producir diversas sustancias como resultado de su metabolismo celular. Así, es conocido que las bacterias heterofermentativas facultativas utilizan la glucosa produciendo ácido láctico y ante la baja disponibilidad de ésta fermentan hexosas sintetizando entre otras sustancias ácido acético (Vandamme *et al.*, 1996) el cual tiene un poder inhibitorio mayor que el ácido láctico (Ouwehand, 1998). De todas maneras, se ha demostrado una alta correlación entre la producción de ácido láctico y la inhibición de cepas de Salmonellas (Van coillie *et al.*, 2007). El estudio realizado permitió seleccionar potenciales cepas probióticas teniendo en cuenta la capacidad de inhibición de las mismas aunque dista de brindar precisiones sobre el poder inhibitorio que tendrán en el intestino. Por lo tanto, será de interés realizar un estudio bajo las condiciones que están presentes en el intestino para tratar de cuantificar la capacidad de producción de ácidos y el efecto inhibitorio causado sobre otras cepas de interés.

En la bibliografía hay disponible numerosos trabajos sobre microorganismos expuestos a bilis de diferentes especies animales (Gilliland *et al.*, 1984; Chateau, 1994; Hyronimus *et al.*, 2000; Liong & Shah, 2005), los cuales han presentado sus resultados de crecimiento bacteriano mostrando el tiempo que requirieron las cepas expuestas a la bilis para alcanzar una determinada DO. Los lactobacilos resisten en forma diversa a la bilis, siendo la cepa un factor importante de variación (Chateau *et al.*, 1994). En el presente trabajo fue encontrada una gran variabilidad entre los lactobacilos y entre cepas de *L. Johnsonii* y *L. reuteri*. En ambas especies se estudiaron tres ejemplares, comportándose de tres maneras diferentes. Uno de ellos creció alcanzando la DO de 0,3 en todas las concentraciones de bilis, otro lo hizo en las más bajas y la última sólo pudo alcanzar el parámetro predeterminado en ausencia de bilis. Chateau *et al.* (1994)

mostraron que la mitad de las cepas de *Lactobacillus* estudiadas retrasaron su crecimiento más de una hora en un medio con bilis respecto a uno sin ella. En los microorganismos evaluados en el presente trabajo las diferencias fueron de hasta 3,5 h en las 5 cepas con crecimiento más rápido, pero con una concentración 3 veces mayor de bilis y un inóculo inicial del 1,3% a diferencia del estudio citado el cual fue del 10%. Gilliland *et al.* (1984) obtuvieron un retraso de más de 3 h en varias cepas de *L. acidophilus* expuestas a 0,3% de bilis, similar al retraso encontrado en el presente trabajo en la concentración al 1%. El grado de resistencia a la bilis es importante para seleccionar microorganismos probióticos (Gilliland *et al.*, 1984). La metodología utilizada permitió distinguir cepas con distintos grados de tolerancia a la acción biliar, en la cual *L. johnsonii* DSPV 001C, *L. reuteri* 004C y *L. ruminis* DSPV 006C fueron las más resistentes en todas las concentraciones de bilis mientras que *L. reuteri* DSPV 002C y *L. johnsonii* DSPV 010C mostraron una tolerancia más baja. Este tipo de análisis de los resultados brindó información sobre la tasa de crecimiento y el desarrollo máximo que podrían tener las cepas durante las primeras horas de su llegada al intestino. Además, permitió seleccionar las cepas con diferentes capacidades para resistir la acción biliar.

Las cepas fueron comparadas utilizando los valores de DO del control respecto de las concentraciones de bilis (Mustapha *et al.*, 1997) y se observó lo sucedido a través del tiempo. Los lactobacilos utilizados, si bien pertenecían a 6 especies diferentes, mostraron comportarse de manera similar, indicando que al exponerlos al 1% de bilis se proporcionó una buena aproximación de lo sucedido en concentraciones superiores. Ello fue determinado al observar que cada cepa obtuvo diferencias de crecimiento entre el medio con bilis y su respectivo control, las cuales se modificaban escasamente a medida

que crecía la concentración de bilis. En la hora 4 del ensayo las BAL marcaron la tendencia de comportamiento que tendrían en las siguientes horas. A partir de la hora 8 las diferencias de crecimiento respecto a los controles variaron escasamente, debido a que en el medio sin bilis los microorganismos estaban finalizando su fase exponencial, mientras que en el medio con bilis todavía continuaba el crecimiento bacteriano. *L. ruminis* DSPV 006C fue la menos afectada a lo largo de todo el ensayo y en las primeras horas *L. reuteri* 004C, *L. reuteri* DSPV 008C y *L. johnsonii* DSPV 010C mostraron un comportamiento similar. Al final del ensayo *L. fermentum* DSPV 012C y *L. johnsonii* DSPV 001C fueron las menos afectadas. En el otro extremo se situaron las cepas *L. agilis* DSPV 003C, *L. agilis* DSPV 005C, *L. reuteri* DSPV 009C y *L. agilis* DSPV 013C que fueron las que más disminuyeron el crecimiento. Los resultados posibilitaron conocer el impacto en el crecimiento ante la presencia de bilis en relación a condiciones óptimas y el grado de tolerancia de las cepas. La metodología tiene como limitante el hecho de no mostrar los valores absolutos alcanzados, los cuales pueden ser altos, a pesar de haber disminuido fuertemente el crecimiento respecto al control. Por ello, actúa en detrimento de aquellas cepas que se desarrollan de mejor forma sin bilis.

El estudio de los parámetros de crecimiento microbiano ha sido empleado con poca frecuencia para los estudios de selección de cepas probióticas. Ahn *et al.* (2003) analizaron microorganismos expuestos a un ácido biliar en una única concentración obteniendo parámetros de crecimiento, mientras en el presente trabajo se expusieron las cepas a bilis completa en numerosas concentraciones.

Para el caso del crecimiento máximo las cepas fueron divididas en dos grupos en base al desarrollo obtenido en las condiciones utilizadas, las de mayor y menor crecimiento. En ambos grupos existieron cepas de la misma especie, demostrando que la

capacidad para crecer en bilis fue dependiente de cepa. Los resultados reportados son similares a los encontrados por Gotcheva *et al.* (2002) que utilizaron una concentración máxima del 2% de bilis. Además, existió una heterogeneidad moderada entre cepas de las especies *L. agilis*, *L. johnsonii* y *L. reuteri* como lo observaron Chateau *et al.* (1994).

La Mumax de las cepas, ante la presencia de bilis, mostró un aumento, una disminución marcada o no fue modificada. En el primer caso los microorganismos fueron *L. johnsonii* DSPV001C, *L. reuteri* DSPV 004C, *L. reuteri* 008C y *L. salivarius* 014C, los cuales tuvieron una tasa de crecimiento mayor en bilis respecto a los controles, la misma descendía en forma gradual a partir del 1% de bilis. En estas cepas la fase de crecimiento exponencial fue mas corta y el t-lag mas prolongado, por ello, la tasa de crecimiento no fue suficiente para alcanzar los valores de crecimiento del control. Aunque tuvieron la capacidad de crecer rápidamente ante el stress generado por la bilis, lo hicieron por un lapso acotado de tiempo. *L. ruminis* DSPV 006C también se ubicó en este grupo pero fue la que se adaptó mejor al medio con la presencia de bilis alcanzando valores de crecimiento máximo superiores al control y tiempos menores de la fase lag respecto al 0% de bilis. Las cepas de los lactobacilos de la misma especie tuvieron comportamientos similares en la tasa de crecimiento a diferentes concentraciones. Sólo se diferenciaron en los valores absolutos pero siguieron una tendencia similar durante el ensayo. Sánchez *et al.* (2007) y Tsuda *et al.* (2007) expusieron sólo la Mumax como único parámetro de crecimiento. Esto representa una visión parcial y puede llevar a errores a la hora de considerarlo en la selección de una cepa probiótica, ya que el efecto de la bilis puede hacer que la tasa de crecimiento sea mayor pero en un período de tiempo menor al del control. Por ello, una Mumax mayor pero por un corto periodo de tiempo puede resultar en un crecimiento máximo inferior y

la fase lag puede durar un tiempo mayor. Además, es cuestionable el cálculo que realizan los autores citados para obtener el parámetro, en donde utilizan los porcentajes de la tasa de crecimiento en bilis respecto al control. Los valores absolutos fueron similares e incluso superiores a los encontrados por Ahn *et al.* (2003) a pesar de que en el presente trabajo fue utilizada una mayor concentración de bilis. Las cepas estudiadas mostraron que la M_{max} no fue inversamente proporcional al aumento de la bilis cuando las concentraciones de ésta fueron altas.

La fase de latencia abarca el lapso de tiempo entre la inoculación y el momento en que se alcanza la tasa de división máxima (Schlegel, 1997), donde existe un aumento de la masa individual de los microorganismos, y es el momento en el cual los mismos preparan su maquinaria biosintética y de adaptación al medio para comenzar la replicación. Los microorganismos prolongaron la fase lag a medida que aumentó la concentración de bilis debido a que el tiempo utilizado para adaptarse a un medio de cultivo es mayor ante la presencia de inhibidores del crecimiento y mayor aún a medida que la concentración del mismo es superior. Los resultados se condicen con los encontrados por Ahn *et al.* (2003) a bajas concentraciones.

Los resultados del crecimiento fueron abordados de diferentes formas y en base a ello se pudo determinar que las cepas estudiadas crecieron en todas las concentraciones de bilis alcanzando valores finales altos. Todo ello permitió obtener datos acerca de la capacidad de crecimiento que poseerían estos microorganismos frente a este inhibidor en el TGI, si bien existen *in vivo* diversos factores que pueden atenuar el efecto de la bilis. La actividad antibacteriana de la bilis puede ser inferior a la observada *in vitro*, ya que en el intestino puede formar micelas y no estar libre para interactuar con las células bacterianas (Begley *et al.*, 2005). Además, los alimentos presentes en el tubo digestivo

pueden generar microambientes que evitan la exposición de las bacterias a la bilis o bien componentes de los alimentos que pueden ligar ácidos biliares y evitar la acción tóxica que afecta la supervivencia microbiana. La variabilidad en la susceptibilidad a la acción de la bilis es dependiente de la especie y de la cepa involucrada (Gilliland *et al.*, 1984; Mishra & Prasad, 2005), como fue demostrado en el presente trabajo. Las seis especies incluidas en este estudio mostraron diferentes respuestas a la acción biliar e incluso entre las cepas de *L. johnsonii*, *L. agilis* y *L. reuteri*. La información sobre la posible correlación entre el hospedador de la cepa aislada y su resistencia a la bilis es escasa. Morelli (2007) determinó que la especie bacteriana es de mayor importancia que la ecología de donde es originaria y solamente a valores extremos puede existir una influencia del origen. De todas maneras es de esperar que los microorganismos aislados desde los alimentos tengan menor posibilidad de resistir altas concentraciones de bilis. Las cepas estudiadas fueron aisladas desde el íleon porcino y se observó un alto nivel de resistencia. Los reportes de la composición de los fluidos biliares y su concentración en el intestino de diferentes especies animales son limitados (Lin *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). En los ensayos realizados se utilizó bilis de origen bovino, la cual posee un poder inhibitorio inferior que la de origen porcino (Morelli, 2007; Dunne *et al.*, 2001; Du toit *et al.*, 1998; Grill *et al.*, 2000). La causa de ello es que la bilis bovina contiene principalmente sales biliares trihidroxiconjugadas, mientras en la porcina son dihidroxiconjugadas (Begley *et al.*, 2005), las cuales pueden traspasar más rápidamente la membrana lipídica de las células (Grill *et al.*, 2000). Las máximas concentraciones de bilis que se podrían encontrar en el intestino son de 4% (Novik *et al.*, 2006), pero normalmente son varias veces inferiores. Estos aspectos fundamentan haber utilizado un amplio espectro de concentraciones de bilis, algunas de ellas superiores respecto a la

utilizada en la mayoría de la bibliografía consultada y probablemente a las encontradas *in vivo*. El ensayo fue exigente utilizando desde el 1% al 7% de bilis en las cuales las bacterias desarrollaron y demostraron su alta resistencia creciendo al 7% de bilis. Casey *et al.* (2004) y Kim *et al.* (2007) demostraron que cepas de *L. reuteri* y *L. johnsonii* toleraban la bilis porcina al 5%, pero sin cuantificar los resultados de una manera que permitan ser comparados con los obtenidos en el presente estudio.

Existe abundante bibliografía que estudia la resistencia a la bilis pero es escasa la que evalúa el crecimiento en bilis en altas concentraciones y por periodos prolongados. Los trabajos de Gotcheva *et al.* (2002), Ehrmann *et al.* (2002) y Jacobsen *et al.* (1999) contemplan alguna de las dos variables. La capacidad para crecer en altas concentraciones de bilis fue demostrada por todas las cepas identificadas, siendo mayor en algunas de ellas como *L. johnsonii* DSPV 001C, *L. reuteri* DSPV 002C, *L. reuteri* DSPV 004C, *L. ruminis* DSPV 006C y *L. agilis* DSPV 010C. Las cepas con esta característica podrían desarrollarse y permanecer en mayor número respecto al resto de los microorganismos en las primeras porciones del intestino delgado (Gilliland *et al.*, 1984), lo cual les daría ventajas competitivas para arribar y establecerse en el intestino grueso. *L. ruminis* DSPV 006C expresó una mínima variación de crecimiento ante las diferentes concentraciones evaluadas y por lo tanto, fue quien mejor toleró el impacto de la acción biliar. Además, mejoró el crecimiento ante la presencia de bilis, hallazgo similar al mostrado por Liong & Shah (2005) en algunas cepas de *L. casei* y *L. acidophilus*. Sin embargo, el caso inverso sucedió con las tres cepas de *L. agilis* que mostraron ser muy sensibles a la bilis, tal como lo demostró Van coillie *et al.* (2007) en todas las cepas aisladas desde aves. Gilliland *et al.* (1984) y Gopal *et al.* (1996) reportaron que cepas de *L. acidophilus* con baja tolerancia a la bilis tendieron a crecer

más lentamente en un medio sin ella. Los autores presumen que las cepas que tienen una fase lag prolongada y un activo sistema de desconjugación de ácidos biliares son más susceptibles a la inhibición, causada por liberar ácido cólico durante esta fase. Los ácidos biliares no conjugados como el cólico causan un mayor efecto inhibitor del crecimiento respecto a los conjugados (Cesena *et al.*, 2001) debido a que pueden pasar más fácilmente a través de las membranas (Begley *et al.*, 2005). Los resultados en cepas de *L. gasseri* obtenidos por Usman & Hosono (1999) muestran resultados contradictorios a los de Gilliland *et al.* (1984) y Gopal *et al.* (1996) ya que algunas cepas tuvieron un lento desarrollo en bilis y crecieron rápidamente en ausencia de ella. En el presente estudio también se muestran resultados difíciles de explicar con la información solamente obtenida en este estudio, debido a que las tres cepas de *L. agilis* toleraron menos la bilis pero crecieron rápidamente sin ella y lo inverso sucedió con *L. ruminis* DSPV 006C. Los resultados de N-Max de cada cepa muestran escasas diferencias en las diversas concentraciones, en cambio la fase lag, como era de esperar, se fue incrementando a medida que aumentaba la concentración de bilis. Esto puede explicarse debido a que el t-lag es tomado previo a que la actividad bacteriana pueda modificar las condiciones del medio como lo es el descenso del pH (Liong & Shah, 2005), si bien existe un buffer en el MRS que amortigua en parte este descenso. En cambio N-Max es calculado cuando el crecimiento bacteriano ya fue efectuado y en los ensayos que se utilizó alta concentración de bilis la baja del pH producida por las bacterias puede haber disminuido la solubilidad de los ácidos biliares y de esta forma haberse visto afectada la capacidad de inhibición en horas avanzadas donde la actividad bacteriana produjo gran cantidad de ácido. En cerdos adultos el pH en la primera porción del intestino puede variar entre 3,5 a 6,5 (Jonsson & Conway, 1992) y es el

lugar del tubo digestivo donde es más alta la concentración biliar. En este trabajo el pH alcanzado en el medio causado por la producción de ácido bacteriano difícilmente haya alcanzado el valor más bajo citado por la bibliografía y por ello, la metodología utilizada generó un pH que se aproximaría al existente en el lugar más crítico para la resistencia a la bilis. Aunque en el presente estudio no se realizó la prueba de desconjugación de los ácidos biliares (BSH), cuya característica podría ser una de las razones de resistencia a la bilis por parte de las bacterias, es necesario hacer algunos comentarios al respecto. Existen datos de diversos investigadores que resultan contradictorios cuando analizan la actividad BSH y su relación a la tolerancia a la bilis, algunos establecen que las cepas BSH positivas son más resistentes a la bilis (De Smet *et al.*, 1995) mientras que otros no reconocen dicha relación (Ahn *et al.*, 2003). Las cepas BSH positivas incorporan los ácidos biliares conjugados (la bilis posee aproximadamente 97% de estos) a la célula hidrolizándolo para generar ácido cólico, quenodeoxicólico o deoxicólico por un lado y taurina o glicina por otro. El ácido desconjugado tiene un efecto inhibitor más potente que su predecesor conjugado y existe un sistema dependiente de energía que lo cotransportaría junto a protones fuera de la célula bacteriana. Los ácidos biliares conjugados con glicina tienen un pKa de 3,9 y aquellos conjugados con taurina poseen 1,9 mientras que en los no conjugados es de 5,0 (Fini & Roda, 1987). El MRS posee un pH de 6,5 que va descendiendo a medida que se desarrollan los lactobacilos y por debajo del pH 6 los ácidos biliares no conjugados comienzan a precipitar por pérdida de la solubilidad en las condiciones del cultivo (Klaver & Van der Meer, 1993). De esta forma la actividad inhibitoria se puede haber visto disminuida y perturbada en cierta forma la medición de DO. *In vivo* los ácidos desconjugados son tomados por otras bacterias y transformados en compuestos más

inestables a pH intestinal que precipitan con facilidad, debido a la pérdida de hidrosolubilidad (Barrett, 2006). El presente estudio muestra lo variable que son los parámetros de crecimiento en las cepas y lo dificultoso que es obtener conclusiones sin caer en errores cuando se tiene información limitada. Algunos autores se basan en el retardo en iniciar el crecimiento de los microorganismos, sin tener en cuenta que a pesar de ello pueden desarrollarse bien (tolerar bien la bilis). Evaluar sólo el tiempo que tarda una cepa en alcanzar determinado crecimiento, que no es el final (evaluando una combinación de t-lag y en parte su μ_{max}) es actuar en detrimento de los microorganismos que demoran más tiempo en adaptarse al medio pero que crecen produciendo mayor masa bacteriana. Por lo tanto ¿qué característica es preferible? ¿Mayor N-Max, mayor μ_{max} o menor t-lag? ¿O bien una combinación de estos? Es evidente que la utilización de la mayor cantidad de información posible nos acercará a un proceso de selección más adecuado teniendo en cuenta el factor estresante estudiado. Los resultados obtenidos a bajas concentraciones coinciden a grandes rasgos con los de otros autores (Ehrmann *et al.*, 2002; Gotcheva *et al.*, 2002 y Lin *et al.*, 2007) y a altas concentraciones hay escasos trabajos con los cuales se obtuvieron valores similares (Soto *et al.*, 2008b). Aunque las cepas fueron altamente resistentes a la bilis y desde este aspecto son aptas para ser utilizadas como probióticos, existen estrategias como la encapsulación que pueden mejorar aun más la viabilidad de los microorganismos.

El pH del estómago de los cerdos está influenciado por diversos factores, algunos de importancia son: el tipo de alimento empleado en la crianza, el momento de alimentación y la edad. En términos generales el pH gástrico en lechones pre y post destete está entre 3 y 4,9 (Jonsson & Conway, 1992). Lawrence (1970) reportó en cerdos con diferentes dietas un pH máximo de 3,8 a 4,8 a los 30 min luego de la

alimentación, descendiendo gradualmente, para llegar a 2 a las 7,5 h. La alimentación post-destete, como suele ser *ad libitum*, ocasionaría la presencia constante de alimento en el estómago y por ende el pH del mismo sería relativamente alto. Las bacterias estudiadas al ser expuestas a pH 2 y 3 tuvieron pequeños aumentos en la densidad óptica, pero se consideró que el método empleado no es lo suficientemente sensible para adjudicar esos cambios al crecimiento de las cepas, tal como lo hacen Gotcheva *et al.* (2002). De todas maneras, Anukam & Koyama (2007) encontraron crecimiento en recuentos en placa a pesar de haber encontrado una pequeña variación en la densidad óptica. Diversos autores no detectaron desarrollo bacteriano a pH 2,5 y 3 (Jacobsen *et al.*, 1999; Dunne *et al.*, 2001; Van coillie *et al.*, 2007) en una gran cantidad de especies de lactobacilos, coincidiendo con el presente estudio. Sin embargo, Du toit *et al.* (1998) observaron crecimiento a pH 3 y 4 en cepas de *L. johnsonii* y *L. reuteri* en magnitudes que no fueron publicadas en su trabajo. Los microorganismos del estudio crecieron a partir de un pH 4 y mostraron, como mínimo, una tolerancia moderada a la acidez tal como era previsible. Los mejores exponentes desarrollaron entre 2,35 - 2,50 log₁₀ UFC/ml por encima del valor inicial como lo hizo *L. reuteri* DSPV 002C, *L. agilis* DSPV 003C, *L. agilis* DSPV 005C y *L. agilis* DSPV 013C. Las BAL que mayor Mumax obtuvieron en el pH 4 fueron *L. reuteri* DSPV 002C, *L. reuteri* DSPV 009C, *L. fermentum* DSPV 012 y *L. agilis* DSPV 013C. En el pH 5 las cepas que mejor se comportaron analizando los tres parámetros fueron *L. reuteri* DSPV 002C, *L. agilis* DSPV 003C, *L. reuteri* DSPV 009C y *L. agilis* DSPV 013C. Los valores alcanzados de Mumax por todos los microorganismos tendían a igualarse a medida que el pH descendía y lo inverso sucedió con N-Max. *L. agilis* DSPV 005C tuvo la particularidad de ser el microorganismo que más creció en las diferentes condiciones pero con una tasa

muy baja M_{umax} , mientras que *L. fermentum* DSPV 012 se caracterizó por lo contrario, bajo crecimiento con alto M_{umax} . Las cepas de *L. johnsonii* tuvieron un pobre crecimiento en general aunque podrían sobrevivir al pH bajo como lo demostraron Casey *et al.*, (2004) en una cepa de esta especie. El tiempo de latencia mostró, a diferencia de lo esperado, que determinadas cepas prolongaban la fase lag a medida que aumentaba el pH. Esta situación puede deberse a que algunos microorganismos fueron afectados por el bajo pH y realizaron un crecimiento lento pero constante y no existió una diferenciación clara entre la terminación de la fase lag y el comienzo del crecimiento exponencial. Debido a esto, el programa utilizado (MicroFit® v1.0) tomó como fase exponencial un período más largo en detrimento de la fase lag. Las BAL en las cuales pudo haber ocurrido esto fueron *L. reuteri* DSPV 002C, *L. reuteri* DSPV 004C, *L. agilis* DSPV 005C, *L. reuteri* DSPV 008C, *L. fermentum* DSPV 012 y *L. salivarius* DSPV 014. Los microorganismos restantes disminuyeron la fase lag a medida que aumentaba el pH. *L. reuteri* DSPV 002C, *L. agilis* DSPV 003C y *L. agilis* DSPV 013C fueron las cepas que obtuvieron los mejores valores en los tres parámetros estudiados con escasas diferencias respecto a sus controles, mientras que *L. ruminis* DSPV 006C fue la más sensible a la acción del bajo pH respecto al resto de los microorganismos. Van coillie *et al.* (2007) realizaron un ensayo de crecimiento en ácido (pH 3) con una gran cantidad de lactobacilos, dentro de ellos *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. agilis* y *L. salivarius*. En todos los casos estas especies microbianas fueron incapaces de crecer en ese pH utilizado, pero la viabilidad fue afectada de manera diferente de acuerdo a la especie y la cepa. *L. johnsonii*, *L. reuteri* y *L. salivarius* tuvieron una gran variabilidad de acuerdo a la cepa, mientras que *L. agilis* tuvo una escasa supervivencia en todos los casos. El crecimiento óptimo obtenido en el presente ensayo por *L. reuteri*

DSPV 002C a pH 4 podría indicar que sería capaz de sobrevivir a pH 3. Por otra parte no se evidenció la alta sensibilidad que tuvieron las cepas de *L. agilis* en el estudio citado previamente, teniendo en cuenta la buena performance que tuvieron a pH 4.

Los componentes del alimento y los constituyentes de las secreciones no ácidas tienen un efecto protector en la viabilidad de las cepas durante su exposición al bajo pH del estómago, que no fueron tenidos en cuenta en la prueba *in vitro* utilizada. Esta situación hace atractivo realizar pruebas *in vivo* para evaluar el comportamiento bajo esas condiciones. Aunque la tolerancia de las BAL a los ácidos puede ser mejorada por algunos protectores naturales que están presentes en los alimentos, resulta interesante conocer el comportamiento de las cepas en una condición extrema, ya que la tolerancia a la misma implica una mayor capacidad de los microorganismos para sobrevivir (Frizzo, 2007). Sólo las cepas que son extremadamente sensibles al ácido *in vitro* parecen ser incapaces de sobrevivir al tránsito gástrico, mientras que una resistencia moderada al pH bajo, parece necesario para evitar pérdidas de viabilidad. Sin embargo, aún no se ha demostrado que una alta resistencia evaluada *in vitro* se correlacione con una mejor capacidad de colonización (Morelli, 2007). Las cepas evaluadas, al crecer a un pH 4, nos permiten prever que pueden sobrevivir durante el tránsito en el estómago y mantenerse viables para llegar al sitio de acción, ya que si fueran suministrados en un alimento en un ensayo *in vivo* es probable que el pH crítico a tolerar esté cercano al mencionado. Todo ello muestra que las cepas de lactobacilos fueron siempre, por lo menos moderadamente resistentes a los bajos pHs y, por ello, la resistencia de las cepas a un pH extremo podría complementarse efectuando un estudio de viabilidad a pH 2 y 3.

Los microorganismos seleccionados en el presente estudio demostraron una gran aptitud para producir biomasa, exceptuando a *Lactobacillus ruminis* DSPV 006C,

Lactobacillus fermentum DSPV 012C y *Lactobacillus agilis* DSPV 013C. El crecimiento óptimo de microorganismos del género *Lactobacillus* requiere de una serie de factores nutricionales y ambientales (Charalampopoulos *et al.*, 2002). Las condiciones de crecimiento utilizadas en este estudio fueron de aerobiosis, razón por la cual algunos lactobacilos con menor aerotolerancia pueden haber limitado su crecimiento en forma diferencial. *L. agilis* DSPV 005C y *L. agilis* DSPV 009C evidenciaron los mejores parámetros de crecimiento, produciendo mayor concentración microbiana por unidad de volumen. Esta característica adquiere mucha relevancia cuando se deben producir los microorganismos a escala industrial (Frizzo, 2007). Estas BAL han encontrado los nutrientes ideales y fueron capaces de resistir la acidez producida por ellos, ya que en estas el bajo pH tuvo un escaso impacto sobre su crecimiento. Además, debemos hacer notar que *L. agilis* DSPV 009C produjo los mayores halos de inhibición a patógenos por la acción de su sobrenadante sin neutralizar, lo que indicaría su elevada producción de ácidos orgánicos. El análisis de los parámetros estudiados muestra a *L. ruminis* DSPV 006C como el lactobacilo que tuvo mayores dificultades para crecer en el medio MRS y se caracterizó por tener una baja M_{max} , un pobre crecimiento máximo aunque una fase lag reducida. El programa utilizado puede haber sesgado el último parámetro debido a que la cepa tuvo un crecimiento muy lento, no marcando claramente diferencias entre la fase lag y la de crecimiento logarítmico. Por lo tanto, puede haber considerado la fase del crecimiento exponencial desde el inicio. Ahn *et al.* (2003) obtuvieron resultados similares a los del presente estudio en cepas de *L. acidophilus*, demostrando una alta potencialidad de la mayoría de las cepas. Por todo lo antedicho, sería de interés el estudio en medios de desarrollo bacteriano de bajo costo para la producción de estos microorganismos a gran

escala, para conocer si se mantiene la alta capacidad de crecimiento. La leche podría ser utilizada para estos fines, tal como lo demostraron Soto *et al.* (2006b).

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Las 13 cepas estudiadas tuvieron alguna característica deseable para ser incorporadas a un inóculo probiótico. Todas ellas fueron capaces de agregar en las condiciones planteadas lo que brinda indicios de su capacidad para permanecer en el tracto gastrointestinal.

En el estudio de las interacciones con microorganismos patógenos los lactobacilos se mostraron activos frente a ellos *in vitro*. La coagregación fue observada en todos los exponentes bacterianos y excepto *Lactobacillus reuteri* DSPV 004C, inhibieron a *Salmonella* spp. y/o *Escherichia coli*. Estas características exponen la potencialidad de estas cepas en el control de estos patógenos en un futuro ensayo *in vivo*.

Los exponentes que mejor performance obtuvieron en las pruebas *in vitro* fueron *L. reuteri* DSPV 002C, *Lactobacillus agilis* DSPV 009C, *L. ruminis* DSPV 006C. Los mismos están en condiciones de ser incorporados en un inóculo probiótico multicepa y evaluados en un ensayo *in vivo*. *L. reuteri* DSPV 002C mostró los mejores parámetros de crecimiento ante las condiciones de stress planteado generando una buena cantidad de biomasa por unidad de volumen. *Lactobacillus agilis* DSPV 009C produjo la mayor inhibición de los cuatro patógenos utilizados, mostró una buena tolerancia a bajo pH y un crecimiento óptimo en MRS. Aunque la resistencia a la bilis fue moderada esta característica podría ser mejorada con alguna técnica de microencapsulación. *L. ruminis* DSPV 006C manifestó una extremada resistencia a la bilis lo que indica su alta adaptación de crecer y permanecer en las primeras porciones del intestino delgado. Frente a los patógenos mostró una actividad aceptable y, si bien, no creció adecuadamente en MRS podría buscarse un medio y una atmósfera que le permita crecer más eficientemente. Las tres cepas nombradas anteriormente mostraron

características que las hacen de interés para ser incorporadas a un inóculo y evaluadas *in vivo* administrándolas a cerdos jóvenes para determinar su inocuidad y efectos benéficos en el hospedador.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AARESTRUP, F.M.; SEYFARTH, A.M.; EMBORG, H.D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S. & BAGER, F. (2001). Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Ch.* 45:2054-2059.
- ABE, F.; ISHIBASHI, N. & SHIMAMURA, S. (1995). Effect of administration of Bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* 78:2838-2846.
- AHN, Y.T.; KIM, G.B.; LIM, K.S.; BAEK, Y.J. & KIM, H.U. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *Int. Dairy J.* 13:303-311.
- ALAKOMI, H.L.; SKYTТА, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K. & HEALNDER, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environm. Microbiol.* 66:2001-2005.
- ALANDER, M.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T. & VON WRIGHT, A. (1997). Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Lett. Appl. Microbiol.* 24:361-364.
- ALEXOPOULOS, C.; GEORGOULAKIS, I. E.; TZIVARA, A.; KRITAS, S. K.; SIOCHU, A. & KYRIAKIS, S. C. (2004). Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the

- health status and performance of sows and their litters. *J. Anim. Physiol. An. N.* 88:381-392.
- AL JASSIM, R.A.M. (2003). *Lactobacillus ruminis* is a predominant lactic acid producing bacterium in the caecum and rectum of the pig. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:213-217.
- ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M. & MIKELSAAR, M. (2003). Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J. Appl. Microbiol.* 94:403-412.
- ANUKAM, K.C. & KOYAMA, T.E. (2007). Bile and acid tolerance of *Lactobacillus plantarum* KCA-1: A potential probiotic agent. *Int. J. Dairy Sci.* 2:275-280.
- ASAHARA, T.; NOMOTO, K.; WATANUKI, M. & YOKOKURA, T. (2001). Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Ch.* 45:1751-1760.
- AZCARATE-PERIL, M.A.; ALTERMANN, E.; HOOVER-FITZULA, R.L.; CANO, R.J. & KLAENHAMMER, T.R. (2004). Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5315-5322.
- BAGER, F.; MADSEN, M.; CHRISTENSEN, J. & AARESTRUP, F.M. (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev. Vet. Med.* 31:95- 112.
- BARANYI, J. & ROBERTS, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23:277-294.

- BARRETT, K.E. (2006). Bile Formation and Secretion. In: *Gastrointestinal Physiology*. Barrett, K.E. McGraw-Hill. United States. pp.153-191.
- BATES, J.; JORDENS, J.Z. & GRIFFITHS, D.T. (1994). Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J. Antimicrob. Chemother.* 34:507-516.
- BEERENS, H. (1990). An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 11:155-157.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C.G. & HILL, H. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:625-651.
- BEGLEY, M.; HILL, C. & GAHAN, C.G.M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1729-1738.
- BENSON, D.A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; RAPP, B.A. & WHEELER, D.L. (2000). GenBank. *Nucleic Acids Research.* 28:15-18.
- BERG, R. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4:430-435.
- BERTOZZI, E.; FRIZZO, L.; SOTO, L.P.; SEQUEIRA, G.; MARTÍ, L.E. & ROSMINI, M.R. (2007). Capacidad de autoagregación de microorganismos aislados desde el íleon porcino. En actas: Jornadas de divulgación técnico-científicas 2007, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario. Casilda, Argentina. 6 de agosto. pp.27-28.
- BERTSCHINGER, H.U.; FAIRBROTHER, J.M.; NIELSEN, N.O. & POHLENZ, J.F. (1992). *Escherichia coli* Infections. In: *Diseases of Swine*. Lehman A. D.; Shaw B. E.; Mengelin L. W.; D'allaire S. & Taylor D. J. 7th edition, Iowa State University Press. pp. 487-497.

- BOGOVIŠ MATIJAŠIĆ, B.; STOJKOVIĆ, S.; SALOBIR, J.; MALOVRH, Š. & ROGELJ I. (2004). Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. *Anim. Res.* 53:35-44.
- BRASHEARS, M.M.; REILLY, S.S. & GILLILAND, S.E. (1998). Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat. *J. Food Prot.* 61:166-170.
- BROCK, T.D.; SMITH, D.W. & MADIGAN, M.T. (1987). El crecimiento y su control. En: *Microbiología*. Almeida, O. 4^{ed} Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. Mexico. pp. 231-258.
- BROOM, L.J.; MILLER, H.M.; KERR, K.G. & KNAPP, J.S. (2006). Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Res. Vet. Sci.* 80:45-54.
- BUJNAKOVA, D. & KMET, V. (2002). Aggregation of animal lactobacilli with O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Vet. Med. B.* 49:152-154.
- CARTER, G.R. (1989). Nutrición microbiana, metabolismo y crecimiento. En: *Fundamentos de bacteriología y micología veterinaria*. Carter, G.R. Acribia, Zaragoza-España. pp.19-45.
- CASEY, P.G.; CASEY, G.D.; GARDINER, G.E.; TANGNEY, M.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; HILL, C. & FITZGERALD, G.F. (2004). Isolation and characterization of anti-*Salmonella* lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Lett. Appl. Microbiol.* 39:431-438.
- CASTAGLIUOLO, I.; GALEAZZI, F.; FERRARI, S.; ELLI, M.; BRUN, P.; CAVAGGIONI, A.; TORMEN, D.; STURNIOLO, G.; MORELLI, L. & PALU, G.

(2004). Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 43:197-204.

CENSO NACIONAL AGROPECUARIO. (2002) Porcinos. Existencias por composición de la piara, según provincia.
http://www.indec.gov.ar/agropecuario/cna_defini.asp

CERVANTES, H.M. (2009). Contrario a la creencia popular, el uso los antibióticos conocidos como los promotores del crecimiento producen beneficios directos tanto para la salud animal, como la humana. Wattagnet on line.
<http://www.wattagnet.com/IA/10894.html>

CESENA, C.; MORELLI, L.; ALANDER, M.; SILIJANDER, T.; TUOMOLA, E.; SALMINEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VILPPONEN-SALMELA, T. & VON WRIGHT, A. (2001). *Lactobacillus crispatus* and its nonaggregating mutant in human colonization trials. J. Dairy Sci. 84:1001-1010.

CHADWICK, P.R.; WOODFORD, N.; KACZMARSKI, E.B.; GRAY, S.; BARRELL, R.A. & OPPENHEIM, B.A. (1996). Glycopeptide-resistant enterococci isolated from uncooked meat. J. Antimicrob. Chemother. 38:908-909.

CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA, S.S. & WEBB, C. (2002). Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. J. Appl. Microbiol. 92:851-859.

CHATEAU, N.; DESCHAMPS, M. & HADJS SASSI, A. (1994). Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. Lett. Appl. Microbiol. 18:42-44.

- CHOU, L. & WEIMER, B. (1999). Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci. 82:23-31.
- COLEMAN, R.; LOWE, P.J. & BILLINGTON, D. (1980). Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage. Biochim. Biophys. Acta. 588:294-300.
- COLLIER, C.T.; SMIRICKY-TJARDES, M. R.; ALBIN, D.M.; WUBBEN, J.E.; GABERT, V.M.; DEPLANCKE, B.; BANE, D.; ANDERSON, D.B. & GASKINS, H.R. (2003). Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. J. Anim. Sci. 81:3035-3045.
- COLLINS, F.M. & CARTER, P.B. (1978). Growth of *Salmonellae* in orally infected germfree mice. Infect. Immun. 21:41-47.
- COMUNIDAD ECONOMICA EUROPEA. Reglamento N° 2821/98 del parlamento Europeo y del consejo. (1998) “se modifica la Directiva 70/524/CEE sobre los aditivos en la alimentación animal, en lo que respecta a la revocación de la autorización de determinados antibióticos”. Diario oficial de la Unión Europea. L351:04-08.
- COMUNIDAD ECONOMICA EUROPEA. Reglamento N° 1831/2003 del parlamento Europeo y del consejo. (2003) “Sobre los aditivos en la alimentación animal”. Diario oficial de la Unión Europea. L268:29-43.
- CORCORAN, B.M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F. & ROSS, R.P. (2005). Survival of probiotic Lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. Appl. Environ. Microbiol. 71:3060-3067.
- COTTER, P.D. & HILL, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67:429-453.

- CROCIANI, J.; GRILL, J.P.; HUPPERT, M. & BALLONGUE, J. (1995). Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:146-148.
- CURRAN, T.M.; LIEOU, J. & MARQUIS, R.E. (1995). Arginine deiminase system and acid adaptation of oral Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4494-4496.
- DAESCHEL, M.A. (1989). Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43:164-167.
- DE ANGELIS, M.; SIRAGUSA, S.; CAPUTO, L.; RAGNI, A.; BURZIGOTTI, R. & GOBBETTI, M. (2007). Survival and persistence of *Lactobacillus plantarum* 4.1 and *Lactobacillus reuteri* 3S7 in the gastrointestinal tract of pigs. *Vet. Microbiol.* 123:133-144.
- DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M. & PALENZONA, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31:438-442.
- DE SMET, I.; VAN HOORDE, L.; VANDE WOESTYNE, M.; CHRISTIAENS, H. & VERSTRAETE, W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 79:292-301.
- DILWORTH, B.C. & DAY, E.J. (1978). *Lactobacillus* cultures in brooder diets. *Poultry Sci.* 57:1101-1104.
- DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; O'MAHONY, L.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; MORRISSEY, D.; THORN-TON, G.; FITZGERALD, G.; DALY, CH.; KIELY, B.; QUIGLEY, E. M.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F. & COLLINS, J. K. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of

functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 76:279-292.

DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G.C.; SHANAHAN, F. & COLLINS, J.K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:386S-92S.

DU TOIT, M.; FRANZ, C.M.; DICKS, L.M.; SCHILLINGER, U.; HABERER, P.; WARLIES, B.; AHRENS, F. & 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. *Int. J. Food Microbiol.* 40:93-104.

EHRMANN, M.A.; KURZAK, P.; BAUER, J. & VOGEL, R.F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol.* 92:966-975.

EKMEKCI, H.; ASLIM, B. & OZTURK, S. (2009). Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.* 53:59-65.

ERRECALDE J.O. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. *Producción y sanidad animal* N° 162. ONU - FAO. Roma, Italia.

FAO/OMS (2001). Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina.

- FAO/OMS (2002). Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario-Canada. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- FEDALTO, L.M.; TKACZ, M. & ADER, L.P. (2002). Probioticos na alimentação de leitões do desmame aos 63 dias de idade. Arch. Vet. Sci.7:83-88.
- FINI, A. & RODA, A. (1987). Chemical properties of bile acids. IV. Acidity constants of glycine-conjugated bile acids. J. Lipid Res. 28:755-759.
- FLAHAUT, S.; FRERE, J.; BOUTIBONNES, P. & AUFRAY, Y. (1996). Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. Appl. Environ. Microbiol. 62:2416-2420.
- FOOKS, L.J.; FULLER, R. & GIBSON, G.R. (1999) Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J. 9:53-61.
- FORESTIER, C., DE CHAMPS, C.; VATOUX, C. & JOLIE, B. (2001). Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res. Microbiol. 152:167-173.
- FOX, S.M. (1988). Probiotics: intestinal inoculants for production animals. Vet. Med. 83:806-810.
- FRIZZO, L.; PERALTA, C.; ZBRUN, M.V.; BERTOZZI, E.; SOTO, L.; MARTÍ, 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. FAVE - Ciencias Veterinarias 4:41-53.
- FRIZZO, L.; PERALTA, C.; ZBRUN, M.V.; BERTOZZI, E.; SOTO, L.; MARTÍ, 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. FAVE - Ciencias Veterinarias 4(1-2):41-53.
- 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. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. pp.106.
- FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; MIZUMACHI, K.; KURISAKI, J. & MITSUOKA, T. (1999). Effect of bifidobacteria feeding on fecal flora and production of immunoglobulins in lactating mouse. Int. J. Food Microbiol. 46:193-197.
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. J.Appl. Bacteriol. 66:365-378.
- FULLER, R. (1992). History and development of probiotics. In: Probiotics, The Scientific Basis. Fuller, R. London, Chapman & Hall. ch. 1, pp. 1-8.
- FULLER, R. (1997). Introduction. In: Probiotics 2: Applications and practical aspects, Fuller, R. London, Chapman & Hall. ch. 1, pp. 1-9.
- GARDINER, G.E.; CASEY, P.G.; CASEY, G.; BRENDAN LYNCH, P.; LAWLOR, P.G.; HILL, C. FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. & ROSS, R.P. (2004). Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. 70:1895-1906.
- GESCHE, E. & EMILFORK, C. (1998). Residuos de antimicrobianos en canales de vacas. Arch. Med. Vet. 30:137-143.
- GIBSON, G.R. & FULLER, R. (2000). Symposium: Probiotic bacteria: Implications for human health: Aspects of *in vitro* and *in vivo* research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J. Nutr. 130:391S-395S.

- GILLILAND, S.E.; BRUCE, B.B.; BUSH, L.J. & STALEY, T.E. (1980). Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. J. Dairy Sci. 63:964-972.
- GILLILAND, S.E.; STALEY, T.E. & BUSH, L.J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. J. Dairy Sci. 67:3045-3051.
- GILLILAND, S.E. & WALKER, D.K. (1990). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. J. Dairy Sci. 73:905-911.
- GONZÁLEZ GALLEGO, J. (1995). Hígado y secreción biliar. En: Fisiología veterinaria. Garcia Sacristán, A.; Castejon Montijano, F.; de la Cruz Palomino, L.F.; González Gallego, J.; Murillo Lopez de Silanes, M.D. & Salido Ruiz, G. Interamericana S.A. España. pp.586-598.
- GOPAL, A.; SHAH, N. P. & ROGINSKI, H. (1996). Bile tolerance, taurocholate deconjugation and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Milchwissenschaft. 51:619-623.
- GORDON, H.A. & PESTI, L. (1971). The Gnotobiotic Animal as a tool in the study of host microbial relationships. Bacteriol. Rev. 35:390-429.
- GOTCHEVA, V.; HRISTOZOVA, E.; HRISTOZOVA, T.; GUO, M.; ROSHKOVA, Z. & ANGELOV, A. (2002). Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. Food Biotechnol. 16:211-225.
- GRAVE, K.; FRØKJÆR JENSEN, V.; ODENSVIK, K.; WIERUP, M. & BANGEN, M. (2006). Usage of veterinary therapeutic antimicrobials in Denmark, Norway and Sweden following termination of antimicrobial growth promoter use. Prev. Vet. Med. 75:123-132.

- GRILL, J.P.; CAYUELA, C.; ANTOINE, J.M. & SCHNEIDER, F. (2000). Isolation and characterization of a *Lactobacillus amylovorus* mutant depleted in conjugated bile salt hydrolase activity: relation between activity and bile salt resistance. *J. Appl. Microbiol.* 89:553-563.
- GUSILS, C.; CUOZZO, S.; SESMA, F. & GONZALEZ, S. (2002). Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. *Can. J. Microbiol.* 48:34-42.
- HARTEMINK, R.; DOMENECH, V.R. & ROMBOUITS, 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. & HUIS IN'T VELT, J.H.J. (1992). Selection of strains for probiotic use. In: *Probiotics, The Scientific Basis*. Fuller, R. London, Chapman & Hall, pp. 209-224.
- HOOPER, L.V. & GORDON, J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 292:1115-1118.
- HOOPER, L.V.; WONG, M.H.; THELIN, A.; HANSSON, L.; FALK, P.G. & GORDON, J.I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science.* 291:881-884.
- HUBER, J.T. (1997). Probiotics in cattle. In: *Probiotics: 2. Applications and practical aspects*, R.Fuller E. Londres, Chapman & Hall. pp. 182-185.
- HUDAULT, S.; LIÉVIN, V.; BERNET-CAMARD, M.F. & SERVIN, A.L. (1997). Antagonistic activity *in vitro* an *in vivo* by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella* Typhymurium C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:513-518.

- HYRONIMUS, B.; LE MARREC, C.; HADJ SASSI, A. & DESCHAMPS A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria Int. J. Food Microbiol. 61:193-197.
- ISOLAURI, E.; JUNTUNEN, M.; RAUTANEN, T.; SILLANAUKKEE, P. & KOIVULA, T. (1991). Human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus* GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. Pediatrics. 88:90-97.
- JACOBSEN, C.N.; ROSENFELDT NIELSEN, V.; HAYFORD, A.E.; MØLLER, P.L.; MICHAELSEN, K.F.; PÆRREGAARD, A.; SANDSTROM, B.; TVEDE, M. & JAKOBSEN, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl. Environ. Microbiol. 65:4949-4956.
- JIN, L.; MARQUARDT, R. & BAIDOO, S. (2000). Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. J. Sci. Food Agric. 80:619-624.
- JOHNSON-HENRY, K.C.; DONATO, K.A.; SHEN-TU, G.; GORDANPOUR, M. & SHERMAN, P.M. (2008). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-Induced changes in epithelial barrier function. Infect. Immun. 75:1340-1348.
- JONSSON, E. & CONWAY, P. (1992). Probiotics for pig. In: Probiotics, The Scientific Basis. Fuller, R. London, Chapman & Hall, p. 259-316.
- JUNCO DÍAZ, R.A. & RODRÍGUEZ PÉREZ, C.M. (2001). Cultivo y crecimiento de los microorganismos. En: Microbiología y parasitología médicas. Llop Hernández, A.; Valdez-Dapena Vivanco, M.M. & Zuazo Silva, J.L. Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. Tomo 1. 45-54.

- KIELY, L.J. & OLSON, N.F. (2000). The physicochemical surface characteristics of *Lactobacillus casei*. *Food Microbiol.* 17:277-291.
- KIM, M. & 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.
- KIM, P.I.; JUNG, M.Y.; CHANG, Y.H.; KIM, S.; KIM, S.J. & PARK, Y.H. (2007). Probiotic properties of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:1103-1111.
- KIMOTO, H., OHMOMO, S. & OKAMOTO, T. (2002). Enhancement of bile tolerance in Lactococci by Tween 80. *J. Appl. Microbiol.* 92:41-46.
- KLAENHAMMER, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70:337-349.
- KLAVER, F.A.M. & VAN DER MEER, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1120-1124.
- KMET, V.; CALLEGARL, M.L.; BOTTAZZI, V. & MORELLI, L. (1995). Aggregation-promoting factor in pig intestinal *Lactobacillus* strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:351-353.
- KORHONEN, J.M. SCLIVAGNOTIS, Y. & VON WRIGHT, A. (2007). Characterization of dominant cultivable lactobacilli and their antibiotic resistance profiles from faecal samples of weaning piglets. *J. Appl. Microbiol.* 103:2496-2503.
- KORNEGAY, E.T.; RHEIN-WELKER, D.; LINDEMANN, M.D. & WOOD, C.M. (1995). Performance and nutrient digestibility in weanling pigs as influenced by

- yeast culture additions to starter diets containing dried whey or one of two fiber sources. *J. Anim. Sci.* 73:1381-1389.
- KURZAK, P.; EHRMANN, M.A. & VOGEL, R. (1998). Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. *System. Appl. Microbiol.* 21:588-592.
- KYRIAKIS, S.C.; TSILOYIANNIS, V.K.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K.; TSINAS, A.C.; ALEXOPOULOS, C. & JANSEGGERS, L. (1999). The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Res. Vet. Sci.* 67:223-228.
- LALLÈS, J.P.; BOSI, P.; SMIDT, H. & STOKES, C.R. (2007). Weaning - A challenge to gut physiologists. *Livest. Sci.* 108:82-93.
- LAINE, T.; YLIAHO, M.; MYLLYS, V.; POHJANVIRTA, T.; FOSSI, M. & ANTTILA, M. (2004). The effect of antimicrobial growth promoter withdrawal on the health of weaned pigs in Finland. *Prev. Vet. Med.* 66:163-174.
- LAWRENCE, T.L.J. (1970). Some effects of including differently processed barley in the diet of the growing pig. *In vivo* gastric pH changes. *Anim. Prod.* 12:151-163.
- LESER, T. D.; AMENUVOR, J. Z.; JENSEN, T. K.; LINDECORONA, R. H.; BOYE, M. & MØLLER, K. (2002). Culture-Independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:673-690.
- LESSARD, M. & BRISSON, G. J. (1987). Effect of a *Lactobacillus* fermentation product on growth, immune response and fecal enzyme activity in weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 67:509-516.
- LIN, W.H.; YU, B.; JANG, S.H. & TSEN, H.Y. (2007). Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe.* 13:107-113.

- LIONG, M.T. & SHAH, N.P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of Lactobacilli strains. *J. Dairy Sci.* 88:55-66.
- LORCA, G.L.; FONT DE VALDEZ, G. & LJUNGH, A. (2002). Characterization of the protein-synthesis dependent adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4:525-532.
- MALDONADO, N.C.; SILVA DE RUIZ, C.; SESMA, F. & NADER-MACÍAS, M.E. (2009). Selection of acid lactic bacteria strains isolated from new born calves for the design of new probiótica productto be use as additive for prevention of diarrohea. En actas: II Simposio Internacional de Bacterias Lácticas. Tucumán, Argentina. 15-17 de septiembre. p.47.
- MANZANILLA, E.G.; PEREZ, J.F.; MARTIN, M.; KAMEL, C.; BAUCCELLS, F. & GASA, J. (2004) Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 82:3210-3218.
- MARMUR, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 13:208-218.
- MARTEAU, P. (2001). Prebiotics and probiotics for gastrointestinal health. *Clin. Nutr.* 20(S1):41-45.
- MARUTAS, K. (1993). Probióticos e seus benefícios. En actas: Conferência APINCO de Ciências e Tecnologias Avícolas, Santos, Brasil. 203-219.
- MAUS, J.E. & INGHAM, S.C. (2003). Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 95:146-154.
- MCEWEN S.A. & FEDORKA-CRAY J.F. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin. Infect. Dis.* 34(3):S93-S106.

- MENG, Q.; KERLEY, M.S.; RUSSEL, T.J. & ALLEE, G.L. (1998). Lectin-like activity of *Escherichia coli* K88, *Salmonella Choleraesuis*, and *Bifidobacteria pseudolongum* of porcine gastrointestinal origin. *J. Anim. Sci.* 76:551-556.
- MILES, R.D.; ARAFA, A.S.; HARMS, R.H.; CARLSON, C.W.; RIED, B.L. & CRAWFORD, J.S. (1981). Effects of a living non-freeze dried *Lactobacillus acidophilus* culture on performance, egg quality and gut microflora in commercial layers. *Poultry Sci.* 60:993-1004.
- MISHRA, V. & 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.
- MORELLI, L. (2007). *In vitro* assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Int. Dairy J.* 17:1278-1283.
- MORDENTI, A. (1986). Probiotics and new aspects of grow promoters in pig production. *Inf. Zootechnol.* 32:69-72.
- MROZ, Z. (2005). Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. *Adv. Pork Prod.* 16:169-182.
- MUSTAPHA, A.; JIANG, T. & 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.
- MÜLLER, M.R.A.; EHRMANN, M.A. & VOGEL, R.F. (2000). Multiplex PCR for the detection of *Lactobacillus pontis* and two related species in a sourdough fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2113-2116.

- NOUSIAINEN, J. & SETÄLÄ, J. (1998). Lactic acid bacteria as animal probiotics. En: Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects, S. Salminen y A. Von Wright, Marcel Dekker, Inc., Nueva York. pp. 437-473.
- NOVIK, G.I.; SAMARTSEV, A.A.; ASTAPOVICH, N.I.; KAVRUS, M.A. & MIKHALYUK, A.N. (2006). Biological activity of probiotic microorganisms. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42:166-172.
- OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T. & TAKEDA, Y. (2001). Inhibition of *in vitro* growth of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 68:135-140.
- OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C. & SALMINEN, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* 9:43-52.
- PAPOTTO, D. (2006) Producción Porcina en Argentina - Pasado, Presente y Futuro. INTA-Pergamino.
http://www.inta.gov.ar/Pergamino/info/documentos/2006/Pdo_Pte_Futuro_Papotto.pdf
- PASCUAL, M.; HUGAS, M.; BADIOLA, J.I. & MONOFORT, J.M. (1999). *Lactobacillus salivarius* CTC2197 Prevents *Salmonella* Enteritidis Colonization in Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4981-4986.
- PATTERSON, J.A. & BURKHOLDER, K.M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Sci.* 82:627-631.

- POLLMAN, D.S.; DANIELSON, D.M. & PEO, E.R. (1980). Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 51:577-581.
- RAIBAUD, P. (1992) Bacterial interactions in the gut. In: *Probiotics, The Scientific Basis*. Fuller, R. London. Chapman & Hall. Cap. 2, pp. 9-28.
- REID, G.; MCGROARTY, J.A.; ANGOTTI, R. & COOK, R.L. (1988). *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Can. J. Microbiol.* 34:344-351.
- REID, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3763-3766.
- REID, G. & FRIENDSHIP, R. (2002). Alternatives to antibiotic use: Probiotics for the gut. *Anim. Biotechnol.* 13:97-112.
- RENIERO, R.; COCCONCELLI, P.; BOTTAZZI, V. & MORELLI, L. (1992). High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *J. Gen. Microbiol.* 138:763-768.
- RICKARD, A.H.; LEACH, S.A.; HALL, L.S.; BUSWELL, C.M.; HIGH, N.J. & HANDLEY, P.S (2002). Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3644-3650.
- RODRIGUEZ, E.; ARQUES, J.L.; RODRIGUEZ, R.; NUÑEZ, M. & MEDINA, M. (2003). Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:259-263.
- ROSMINI, M. R.; SEQUEIRA, G. J.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; MARTÍ, L. E.; DALLA-SANTINA, R.; FRIZZO, L. & BONAZZA, J.C. (2004). Producción de

probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 3:181-191.

ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; BRITTI, M.S.; KONSTANTINOV, S.R.; SMIDT, H.;

DE VOS, W.M. & MENGHER, E. (2007). The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. *J. Nutr.* 137:2709-2716.

RUSSELL, N.J.; EVANS, R.I.; TER STEEG, P.F.; HELLEMONS, J.; VERHEUL, A.

& ABEE, T. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. *Int. J. Food Microbiol.* 28:255-261.

SAARELLA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MÄTTÖ, J. & MAITTLA-

SANDHOLM, T. (2000). Probiotic bacteria: safety functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84:197-215.

SALMINEN, S.; DEIGHTON, M.A.; BENNO, Y. & GORBACH, S.L. (1998). Lactic

acid bacteria in health and disease. In: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspect.* Salminen, S. & Von Wright, A. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 211-253.

SÁNCHEZ, B.; CHAMPOMIER-VERGES, M.C.; COLLADO, M.C.; ANGLADE, P.;

BARAIGE, F.; SANZ, Y.; DE LOS REYES-GAVILÁN, G.C.; MARGOLLES, A. & ZAGOREC, M. (2007). Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype longum. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6450-6459.

SAVAGE, D.C. (1992). Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion *in vitro* of

lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1992-1995.

- SCHILLINGER, U. & LUCKE, F.K. (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microb.* 55:1901-1906.
- SCHLEGEL, H. (1997). El crecimiento de los microorganismos. En: *Microbiología general*. Schlegel, H. & Zaborosch, C. Omega S.A. Barcelona, España. pp.193-234.
- SCHNEIDER, R.; ROSMINI, M.R.; HERMANN, M. & 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.L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:405-440.
- SHARON, N. & LIS. H. (1972.) Lectins: Cell agglutinating and sugarspecific proteins. *Science*. 177:949.
- SHARON, N. (1987). Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Lett.* 217:145-157.
- SHU, Q. & GILL, H.S. (2002). Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20™) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 34:59-64.
- SLANETZ, L.W. & BARTLEY, C.H. (1957). Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J. Bacteriol.* 74:591-595.
- SMORAGIEWICZ, W.; BIELEKA, M.; BABUCHOWSKI, A. & DUBEAU, H. (1993). Les Probiotiques. *Can. J. Microbiol.* 39:1089-1095.
- SOTO, L.P.; DRAGO, S.; FRIZZO, L.S.; DIAZ, A.; GONZALEZ, R. & ROSMINI, M.R. (2006a). Efecto de hidrolizados proteicos sobre el crecimiento de *Lactobacillus casei* DSPV 318T. En *actas: II Simposio Internacional de Bacterias*

Lácticas. Primer encuentro Red BAL. Argentina, San Miguel de Tucumán. 11-13 de octubre. p. 131.

SOTO, L.P.; FRIZZO, L.S.; DIAZ, A.; BERTOZZI, E.; BONAZZA, J.C.; SEQUIERA, G. & ROSMINI, M.R. (2006b). La leche como medio de propagación y conservación de bacterias probióticas para terneros. En actas: III Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina. 8-10 de noviembre. p.81.

SOTO, L.P.; FRIZZO, L.S.; BERTOZZI, E.; ZBRUN, M.V.; SEQUIERA, G. & ROSMINI, M.R. (2008a). Aplicación de métodos *in vitro* para la selección de cepas de *Lactobacillus salivarius* como probióticos. En actas: SAMIGE. Rosario, Argentina. 3-5 de diciembre. p.64.

SOTO, L.P.; BERTOZZI, E.; FRIZZO, L.S.; AVATANEO, E.; MARTÍ, L.E. & ROSMINI, M.R. (2008b). Efecto de la bilis sobre el crecimiento de cepas de *Lactobacillus salivarius* de origen bovino. En actas: X Congreso y XXVIII Reunión de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina. 3-5 diciembre. p.63.

SOTO, L.P.; FRIZZO, L.S.; BERTOZZI, E.; AVATANEO, E.; MARTÍ, L.E.; SEQUEIRA, G.J.; ROSMINI, M. R. (2008c). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas integrantes de la microbiota intestinal de terneros jóvenes. En actas: Jornadas de divulgación técnico-científicas 2008, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario. Casilda, Argentina. 6 de agosto. p 93.

SOTO, L.P.; FRIZZO, L.S.; BERTOZZI, E.; AVATANEO, E.; SEQUIERA, G. & ROSMINI, M.R. (2010). Molecular microbial analysis of *Lactobacillus* Strains

isolated from the gut of calves for potential probiotic use. *Vet. Med. Int.* ID 274987, 7 p.

SOULSBY, E.J. (1999). El uso de antibióticos en producción animal y la resistencia antimicrobiana. En actas: XI Reunión interamericana de salud animal a nivel ministerial (O.M.S. – O.P.S.). Washington, D.C., 13–15 de abril. pp.18.

SPENCER, R.J. & CHESSON, A. (1994). The effect of *Lactobacillus* spp. on the attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated porcine enterocytes. *J. Appl. Bacteriol.* 7:215-220.

STYRIAK, I.; NEMCOVÁ, R.; CHANG, Y.H. & LJUNGH, A. (2003). Binding of extracellular matrix molecules by probiotic bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:329-333.

STÖHR, K. (2000). Problemas del uso de antimicrobianos en la agricultura y la ganadería. *Boletín de medicamentos esenciales - OMS.* 28-29:10-11.

TANNOCK, G.W. (2004). A special fondness for Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3189-3194.

TARAS, D.; VAHJEN, W. & SIMON, O. (2007). Probiotics in pigs - modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. *Livest. Sci.* 108:229-231.

TIMMERMAN, H.M.; KONING, C.J.M.; MULDER, L.; ROMBOOTS, F.M. & BEYNEN, A.C. (2004) Monostrain, multistrain and multispecies probiotics —A comparison of functionality and efficacy. *Int. J. Food Microbiol.* 96:219-233.

- TORRES, C. & ZARAZAGA, M. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? Gac. Sanit. 16:109-112.
- TSUDA, H.; HARA, K. & MIYAMOTO, T. (2007). High bile- and low pH-resistant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented dairy products in Inner Mongolia, China. Milk Science. 55:129-134.
- USMAN & HOSONO, A. (1999). Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. J. Dairy Sci. 82:243-248.
- URIBE, A.; ALAM, M.; JOHANSSON, O.; MIDTVEDT, T. & THEODORSSON, E. (1994). Microflora modulates endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the rat. Gastroenterology. 107:1259-1269.
- VAN COILLIE, E.; GORIS, J.; CLEENWERCK, I.; GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HERMAN, L. & HEYNDRICKX, M. (2007). Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. J. Appl. Microbiol. 102:1095-1106.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K. & SWINGS, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. Microbiol. Rev. 60:407-438.
- VAN DEN BOGAARD, A.; LONDON, N. & STOBBERINGH, E. (2000). Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. J. Antimicrob. Chemoth. 45:663-671.

- VANDEVOORDE, L.; CHRISTIAENS, H. & VERSTRAETE, W. (1992). Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 72:214-219.
- VAN VELKINBURGH, J.C. & GUNN, J.S. (1999). PhoP-PhoQ regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* 67:1614-1622.
- VASSALO, M.; FIALHO, E.T.; OLIVEIRA, A.I.G.; TEIXEIRA, A.S. & BERTECHINI, A.G. (1997). Probióticos para leitões dos 10 aos 30 Kg de peso vivo. *Rev. Soc. Bras. Zootecn.* 26:31-138.
- WADSTROM, T.; ANDERSON, K., SYDOW, M.; AXELSSON, L.; LINDGREN, S. & GULLMAR, B. (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* 62:513-520.
- WALTER, J. (2008). Ecological role of Lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4985-4996.
- WEGENER, H.; AARESTRUP, F.M; JENSEN, L.B.; HAMMERUM, A.M. & BAGER F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. (1999). *Emerg. Infect. Dis.* 5:329-335.
- WESTERLUND, B. & KORHONEN, T.K. (1993). Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 9:687-694.
- WHITE, L. A.; NEWMAN, M. C.; CROMWELL, G. L.; & LINDEMANN, M. D. (2002). Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 80:2619-2628.

- WILCOCK, B. P. & SCHWARTZ, K. J. (1992). Salmonellosis. In: Diseases of swine. Lehman, A. D.; Shaw, B. E.; Mengelin, L. W.; D'allaire, S. & Taylor D. J. 7th ed. Iowa State University, Ames. pp. 570-580.
- ZANI, J.L.; WEYKAMP DE CRUZ, F.; FREITAS DOS SANTOS, A. & GILTURNES, C. (1998). Effect of probiotic Cenbiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. *J. Appl. Microbiol.* 84:68-71.
- ZIEMER, C.J. & GIBSON, G.R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concepts: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.* 8:473-479.