

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS COMPONENTES DE LA MICROBIOTA TÍPICA DE LOS TERNEROS CRIADOS EN CONDICIONES ARTIFICIALES¹

SCHNEIDER, R.², ROSMINI, M.², EHRMANN, M.³ & VOGEL, R.³

RESUMEN

Los animales sanos poseen en su tracto gastrointestinal una microbiota típica. La colonización competitiva por parte de los microorganismos benéficos tiene lugar durante los primeros días de vida. Cuando estos microorganismos son administrados como suplemento alimentario vivo, con el objetivo de producir un efecto benéfico sobre el hospedador, son denominados probióticos. El hombre y los animales generalmente poseen *Lactobacillus* sp. en su tracto intestinal. En el caso de los terneros, estos microorganismos han sido considerados como posibles responsables del control de los efectos de gérmenes patógenos. Tradicionalmente, la identificación de la microbiota animal fue realizada por medio de técnicas morfológicas y bioquímicas. No obstante, se han desarrollado un gran número de metodologías destinadas a identificar los microorganismos en base al estudio de su genoma. Entre ellas, el RAPD es utilizado para diferenciar bacterias lácticas y la técnica de comparación de secuencias de 16S rDNA está siendo aplicada para la identificación de bacterias. El objetivo del trabajo fue identificar, mediante técnicas de RAPD y 16S rDNA, bacterias ácido lácticas aisladas del tracto gastrointestinal de terneros lactantes sanos criados en condiciones artificiales (guacheras). Los microorganismos utilizados para probar las dos técnicas de identificación genética fueron aislados a partir de la saliva y de diferentes partes de la mucosa intestinal. Las muestras fueron obtenidas a partir de doce terneros con menos de un mes de vida. En particular, *Lactobacillus casei*, *L. salivarius*, *L. reuteri* y *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, tiene un interés especial para este trabajo porque existen evidencias de su posible actividad probiótica cuando son administrados a los animales. Los microorganismos encontrados en los animales estudiados han sido informados por otros autores como componentes habituales del ambiente en el que son criados los animales. La técnica de RAPD aplicada fue adecuada para diferenciar los microorganismos aislados a nivel de género y especie, pero no para detectar las diferencias entre cepas.

Palabras clave: terneros, crianza, probióticos, bacterias ácido lácticas, PCR, RAPD, 16S rDNA.

1.- Trabajo subvencionado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (PICT 99, proyecto n° 08-06970) y del Programa CAI+D 2000 de la UNL (Proyecto N° 14-1-11).

2.- Depto. Salud Pública Veterinaria, FCV (UNL). Kreder 2805 (3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Tel. (03496) 420639, int. 128. E-mail: mrosmini@unl.edu.ar

3.- Technical Microbiology, Lehrstuhl für Technical University of Munich. Freising (Weihenstephan), Alemania.

Manuscrito recibido el 19 de julio de 2004 y aceptado para su publicación el 18 de octubre de 2004.

SUMMARY

Identification of lactic acid bacteria from the typical microbiota found in artificial reared calves.

Healthy animals have characteristic microorganisms in their gastrointestinal tract. The competitive colonisation of beneficial microorganisms takes place on early life. If this microflora is administered selectively as a complement to the diet, it becomes a probiotic. Humans and animals generally have *Lactobacillus* sp. in their intestinal tract. In calves, they are considered as the possible responsible of the control of the pathogenic bacteria effects. Traditionally, the identification of animal microbiota was carried out by morphological and biochemical techniques. However, molecular methods that study bacterial genome have been developed to identify microorganisms. RAPD was employed to discriminate lactic acid bacteria and 16S rDNA sequence comparison is used for bacteria identification. This work was aimed at applying RAPD and 16S rDNA techniques to identify lactic acid bacteria that colonise the gastrointestinal tract of healthy calves reared under artificial conditions. In order to test the two genetic identification techniques the samples of microorganisms were isolated from saliva and from different parts of intestine. Sampling was carried out from twelve newly born calves. Particularly, *Lactobacillus casei*, *L. salivarius*, *L. reuteri* and *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* are of special interest as there are evidences of their possible probiotic potencial when administered to animals. The results obtained showed that the intestine of the studied young calves are colonised by germs coming from the environment where they are reared. The applied RAPD technique was able to discriminate between all isolated microorganisms at species level, but it was not sufficient to detect the differences between strains.

Key words: calves, bred, probiotic, lactic acid bacteria, PCR, RAPD, 16S rDNA.

INTRODUCCIÓN

Los animales sanos poseen en su tracto gastrointestinal una microbiota típica que, después de la colonización durante los primeros días de vida, alcanza un estado de simbiosis. Cuando estos microorganismos son administrados como suplemento alimentario vivo, con el objetivo de producir un efecto benéfico sobre el hospedador, son denominados probióticos (Fuller, 1989).

Los lactobacilos son componentes habituales de la flora intestinal normal, tanto en el hombre como en los animales (Raibaud, 1992; Smoragiewicz *et al.*, 1993), y en el caso de los terneros han sido considerados como posibles responsables del control de los efectos de gérmenes patógenos como

Salmonella sp. y *Escherichia coli* (Ellinger *et al.*, 1978; Collins & Carter, 1978). La colonización competitiva por parte de los microorganismos benéficos como *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp., para ayudar a proteger al animal frente a los dos patógenos mencionados ocurre a muy temprana edad (Fox, 1988).

En condiciones normales no sería necesario el suministro de probióticos porque los animales adquieren la flora protectora a partir de su madre y del ambiente. No obstante, las condiciones artificiales de crianza de los terneros limitan el contacto materno, proveen alimentos no naturales (sustitutos) y demandan condiciones de hábitat que favorecen el estrés y tornan más susceptibles a los animales a la colonización por microorganismos patógenos (Rosmini

et al., 2004). Además, durante los primeros días de la crianza, en la que los animales reciben dieta líquida, son más frecuentes los desórdenes digestivos.

Es reconocida la importancia de utilizar las cepas probióticas aisladas de un animal en la misma especie (Gilliland *et al.*, 1980) y en especial que sean aisladas del mismo lugar donde el microorganismo estaba actuando en el huésped (Havenaar *et al.*, 1992). Esto permite aprovechar el efecto conocido como de especificidad de hospedador (“host-specific effect”) (Fuller, 1997).

La identificación de la microbiota normal de los animales para su posible utilización como probióticos puede realizarse mediante técnicas morfológicas y bioquímicas tradicionales. Sin embargo, en la actualidad se han desarrollado un gran número de metodologías destinadas a identificar los microorganismos en base al estudio de su genoma (McCartney, 2002).

Algunas de estas herramientas son el perfil de plásmido y el RAPD (random amplified polymorphic DNA). Este último método permite la comparación de diferencias intra e interespecíficas en las bacterias. El RAPD fue utilizado inicialmente para producir patrones genéticos (fingerprints) de ADN de *Staphylococcus* sp. (Williams *et al.*, 1990) y posteriormente se lo utilizó para diferenciar bacterias ácido lácticas (Vogel *et al.*, 1996).

En la actualidad la comparación de secuencias de 16S rDNA está siendo aplicada para la identificación de bacterias, aisladas de diversas fuentes, en base a sus relaciones filogenéticas. Su utilización se ha incrementado debido a la existencia de numerosas bases de datos que cuentan con las secuencias del 16S rDNA (McCartney, 2002).

El objetivo del trabajo fue identificar, mediante técnicas de RAPD y 16S rDNA, bacterias ácido lácticas aisladas del tracto

gastrointestinal de terneros lactantes sanos criados en condiciones artificiales (guacheras), para un posterior estudio de sus capacidades probióticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los microorganismos fueron aislados a partir de la saliva (cavidad bucal) y de diferentes partes de la mucosa intestinal (duodeno, yeyuno, ciego y colon) de doce terneros, de entre 5 y 25 días de vida, criados en guacheras pertenecientes a tambos ubicados en el área de influencia de la FCV (UNL). Además, se realizaron aislamientos a partir del alimento (silaje) que se utilizaba en esos establecimientos. La saliva, las diferentes porciones del intestino y el silo son considerados los puntos de muestreo del trabajo.

Las muestras se tomaron mediante hisopado de la cavidad bucal (saliva) y por extracción directa a partir del silo. Los animales fueron desangrados y se siguieron las técnicas convencionales de necropsia. El intestino delgado y grueso de los terneros fue obtenido en condiciones asépticas y se hicieron diluciones decimales en solución de Ringer ¼ a partir del raspado de la mucosa de dichos órganos. Para aislar las bacterias ácido lácticas se utilizó agar MRS (De Man *et al.*, 1960) con la adición de un 3,5 % de acetato de sodio. El 10 % de las colonias que crecieron en cada placa fueron repicadas en agar MRS para garantizar que se trataba de colonias puras.

ANÁLISIS RAPD

Se seleccionaron 35 aislamientos, procedentes de diferentes puntos de muestreo y se realizó la extracción enzimática del ADN (Lewington *et al.*, 1987) para someter dicho material a la técnica de RAPD PCR

utilizando el cebador M13V. La secuencia del primer fue 5' - GTT TTC CGA GTC ACGAC - 3'. Las reacciones de RAPD PCR fueron realizadas en tubos de microcentrífuga de 0,5 ml, cubriendo los reactivos con aceite (50 µl) y los tubos con una plancha de TECAN (Tecan, Kreilsheim, Alemania) para asegurar su cierre.

Los componentes de la reacción fueron: 0,5 µl de ADN (125 ng/µl), 5 µl de 10 X buffer de reacción, 25 mM de MgCl₂, 200 nM de cada uno de los 4 dinucleótidos, 1,5 U de Taq polimerasa (todos los componentes de Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania), 50 pmol/µl del cebador M13V (Interactiva, Ulm, Alemania) y agua bidestilada hasta completar 50 µl.

La PCR se realizó en un termociclador Hybaid Omni Gene (MWG-Biotech, Ebersberg, Alemania), programado con los siguientes parámetros: (94 °C/3 min, 40 °C/5 min, 72 °C/5 min)3x; (94 °C/1 min, 60 °C/2 min, 72 °C/3 min) 32x.

Todos los productos de la PCR (10 µl de ADN + 5 µl de AGS buffer de corrida) fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa TBE al 1,5 %, utilizando una cuba MWG-Biotech (20 cm x 25 cm), durante 2 h a 180 V. Se utilizó 1 µg por calle de un marcador BioSizerâ VI (AGS, Heidelberg, Alemania) para acompañar los fragmentos separados. Finalizada la corrida, el gel se mantuvo durante 15 min en bromuro de etidio y posteriormente se procesó digitalmente su imagen con el sistema E.A.S.Y. (Herolab, Griesheim, Alemania).

Las bandas obtenidas fueron evaluadas con el software GelCompare 4.1 (Applied Math, Kortrijk, Belgium). Las similitudes entre los patrones de RAPD fueron calculadas utilizando el coeficiente de correlación momento-producto de Pearson ($r \times 100$).

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE 16S rDNA

Una porción del 16S rDNA (600-700 bp), correspondiente a cada patrón RAPD obtenido, fue secuenciada. La amplificación de la porción 16S rDNA se realizó en un tubo de microcentrífuga de 0,2 ml, cubriendo los reactivos con aceite (50 µl) y utilizando un termociclador Hybaid Omni Gene (MWG-Biotech, Ebersberg, Alemania). Las condiciones de la amplificación fueron: 1 µl de ADN (125 ng/µl), 10 µl de 10 X buffer de reacción, 1,5 mM de MgCl₂, 200 nM de cada uno de los 4 dinucleótidos, 1,5 U de Taq polimerasa, 100 pmol de cada cebador (616V y 630R)(Kurzak *et al.*, 1998) y agua bidestilada hasta completar 100 µl. El ciclador fue programado con los siguientes parámetros: (94 °C/2 min)1x; (94 °C/45 seg, 52 °C/2 min, 72 °C/2 min y 30 seg) 32x.

Los productos de la PCR se purificaron mediante el kit QIAquick (Quiagen, Hilden, Alemania) y fueron eluidos con 60 µl de Tris (10 mM, pH 7).

Las secuencias ribosomales fueron determinadas utilizando el ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perking Elmer) en un sistema de secuenciación ABI 373 de un servicio comercial (SequiServe, Vaterstetten, Alemania). El análisis de las secuencias ribosomales se realizó mediante el Ribosomal Data Project II (<http://www.cme.msu.edu/RDP/analyses.html>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ADN de los 35 microorganismos fue obtenido con éxito. En la figura 1 se presentan los patrones RAPD de 18 de los aislamientos, generados mediante electroforesis, digitalizados y normalizados, a manera de ejemplo. En esa figura se presentan

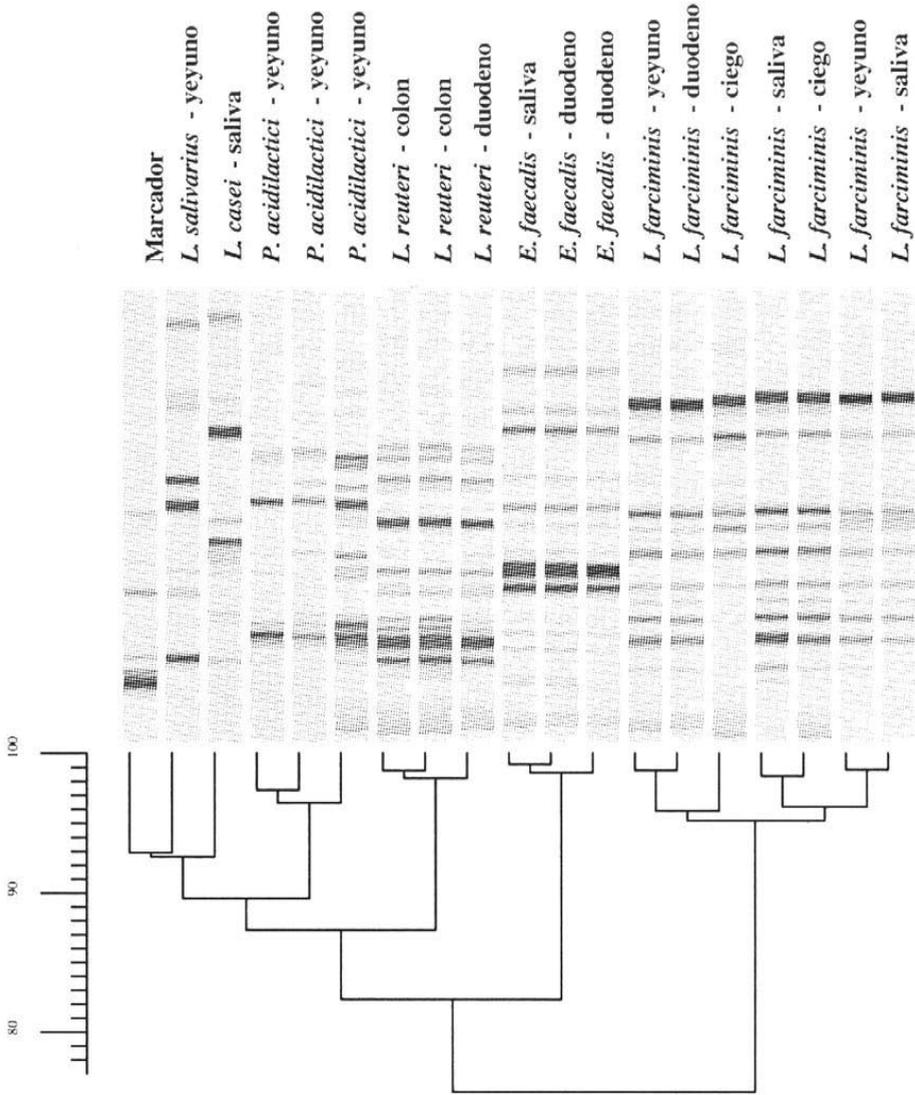


Fig. 1: Identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales.

el género y la especie, obtenido mediante secuenciación, para cada aislamiento. Asumiendo una similaridad del 95 % se obtuvieron 4 clusters bien diferenciados y dos aislamientos adicionales que se presentan separados del resto. El poder discriminativo de los métodos utilizados, para diferenciar los distintos microorganismos aislados, fue capaz de encontrar las diferencias entre las especies, no obstante no fue suficiente para detectar las diferencias entre las cepas de una misma especie. Cuando se estudian especies bacterianas estrechamente relacionadas, o cepas dentro de una misma especie, el poder discriminante de la técnica basada en el estudio del 16S rDNA puede ser limitado (McCartney, 2002).

Del total de los aislamientos, un 37 % fueron identificados como *Pediococcus acidilactici*, otro 22 % como *Lactobacillus*

faracinis, un 14 % como *L. reuteri*, un 9 % como *Enterococcus faecalis*, un 9 % como *E. faecium*, un 6 % como *L. salivarius* y un 3 % como *L. casei*.

El Cuadro 1 muestra los diferentes puntos de muestreo a partir de los cuales fueron aislados los microorganismos. En el caso del intestino delgado se encontraron las siguientes cepas: *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. farcinis*, *L. reuteri*, *L. salivarius* y *P. acidilactici*. En el intestino grueso se encontraron: *L. farcinis*, *L. reuteri* y *P. acidilactici*. En el caso de *L. salivarius* fue encontrado tanto en el alimento como en el intestino de los animales estudiados. Con la excepción de *L. farcinis*, estos microorganismos han sido informados como habitantes normales del intestino de los animales (Pascual *et al.*, 1996; Kurzak *et al.*, 1998). Su origen estaría relacionado, en general, con el ambiente donde se desarrollan los animales, los ali-

Cuadro 1: Identificación de bacterias lácticas componentes de la microbiota típica de los terneros criados en condiciones artificiales.

Origen	Punto de muestreo	Identificación
Cavidad bucal	Saliva	<i>Enterococcus faecalis</i>
	Saliva	<i>Enterococcus faecium</i>
	Saliva	<i>Lactobacillus casei</i>
	Saliva	<i>Lactobacillus farcinis</i>
Intestino delgado	Duodeno	<i>Enterococcus faecalis</i>
	Duodeno	<i>Enterococcus faecium</i>
	Duodeno	<i>Lactobacillus farcinis</i>
	Duodeno	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	Duodeno	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	Yeyuno	<i>Lactobacillus farcinis</i>
	Yeyuno	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Intestino grueso	Ciego	<i>Lactobacillus farcinis</i>
	Ciego	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	Ciego	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	Ciego	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	Ciego	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Alimento	Silo	<i>Lactobacillus salivarius</i>

mentos que consumen y los otros animales con los que conviven.

Las plantas, el suelo, el agua, los animales y el ambiente en general son fuentes naturales de bacterias ácido lácticas (Teuber, 1993). Los lactobacilos, microorganismos que cumplen una importante función en el tracto digestivo de los animales jóvenes, se encuentran en las plantas, en el suelo, en el agua, en los productos elaborados a base de cereales y en los silos (Stiles & Holzapfel, 1997). Los pediococos son comúnmente encontrados en materiales vegetales fermentados (silos), en el rumen de los animales y en las heces de los pavos (Teuber, 1993). *P. acidilactici*, *L. salivarius* y *L. casei* han sido aislados de ensilados elaborados a base de maíz o pasto y destinados a los animales (Seale, 1986; Teuber, 1993). *L. reuteri*, *E. faecalis* y *E. faecium* son habitantes del sistema gastrointestinal del hombre y los animales (Mulder *et al.*, 1997; Stiles & Holzapfel, 1997; Casas *et al.*, 1998) y han sido utilizados como inoculantes de silos (Seale, 1986). *L. reuteri*, lactobacilo entérico heterofermentativo, es el único que ha sido definido como indígena en esos ecosistemas (Mitsuoka, 1992) y, además, posee la capacidad de producir reuterina, un metabolito antimicrobiano (Stiles & Holzapfel, 1997).

Por otra parte, *P. acidilactici* es productor de pediocina, una bacteriocina con reconocida capacidad antimicrobiana (Biswas *et al.*, 1991). Una importante actividad antimicrobiana fue descrita para *L. salivarius* (Dunne *et al.*, 1999). *E. faecalis* y *E. faecium* están normalmente presentes en las heces de los animales y en los insectos. Si bien están presentes en las plantas, su cantidad desciende durante el invierno y aumenta durante la primavera y el verano probablemente diseminados por la acción de los insectos (Teuber, 1993).

La microbiota natural del intestino es una

población compleja de microorganismos que ejercen una gran influencia sobre el huésped (Rosmini *et al.*, 2004). Cerca del 90% de la microbiota intestinal que coloniza el tubo digestivo es permanente, el 10% restante es transitoria (Pascual *et al.*, 1996). La utilización de cepas microbianas indígenas probióticas, aisladas a partir de distintas regiones anatómicas de los animales de diferentes edades, o incluso de los alimentos que estos consumen, es una herramienta potencial para mejorar las condiciones sanitarias y de producción de las explotaciones intensivas (Rosmini *et al.*, 2004).

En particular, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. reuteri* y *E. faecalis* y *E. faecium* resultan de especial interés para este trabajo porque existen evidencias de su posible potencial probiótico cuando son administrados a los animales (Huber, 1997; Mulder *et al.*, 1997; Klaenhammer, 1998; Klein *et al.*, 1998; Ouwehand & Salminen, 1998).

CONCLUSIONES

Las técnicas aplicadas han demostrado ser adecuadas para la identificación de las bacterias ácido lácticas que forman parte de la microbiota de los terneros criados en los tambos en condiciones artificiales.

La diversidad de bacterias encontradas en los animales estudiados coincide con las observaciones realizadas por otros autores en áreas geográficas diferentes, tanto en estudios realizados en bovinos jóvenes como en otras especies animales.

La mayoría de los aislamientos fueron obtenidos a partir de diferentes porciones del tubo digestivo de terneros sanos criados en condiciones artificiales dentro de un área geográfica bien identificada, por lo cual podrían ser considerados parte de la micro-

biota indígena local.

Si se demuestran las propiedades probióticas de los gérmenes identificados, podrán ser utilizados en terneros criados en condiciones similares con fines nutricionales y sanitarios, aprovechando el efecto de especificidad de hospedador.

BIBLIOGRAFÍA

- BISWAS, S. R.; P. RAY; M. C. JOHNSON & B. RAY.** 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1265-1267.
- CASAS, I.; F. W. EDENS & W. J. DOBROGOSZ** 1998. *Lactobacillus reuteri*. An effective probiotic for poultry and other animals. (pp. 475-518) En: Salminen, S. y Von Wright, A. (eds.), Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects (2ed.). Ed. Marcel Dekker, New York.
- COLLINS, F. M. & P. B. CARTER.** 1978. Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. Infect. Immun. 21: 41-47.
- DE MAN, J. D.; M. ROGOSA & M. E. SHARPE.** 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., 23: 130-135.
- DUNNE, C.; L. MURPHY; S. FLYNN; L. O'MAHONY; S. O'HALLORAN; M. FEENEY; D. MORRISSEY; G. THORNTON; G. FITZGERALD; CH. DALY; K. BARRY; E. M. QUIGLEY; G. C. O'SULLIVAN; F. SHANAHAN & J. K. COLLINS.** 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and human clinical trials (pp. 279-292). En: Konings, W.N., Kuipers, O.P. y Huis in't Veld, J.H. (Eds.). Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- ELLINGER, D. K.; L. D. MULLER & P. J. GLANTZ.** 1978. Influence of feeding fermented colostrum and *Lactobacillus acidophilus* on faecal microflora and selected blood parameters of young dairy calves. J. Dairy Sci. 61(Suppl.1): 119-122.
- FOX, S. M.** 1988. Probiotics: intestinal inoculants for production animals. Vet. Med.-US. 83, 8, 806-810.
- FULLER, R.** 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol., 66: 365-378.
- FULLER, R.** 1997. Introduction. (pp. 1-9). En: Fuller, R. (ed.). Probiotics: 2. Applications and Practical Aspects. London, Chapman & Hall.
- GILLILAND, S. E.; B. B. BRUCE; L. J. BUSH & T. E. STALEY** 1980. Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. J. Dairy Sci. 63: 964-972.
- HAVENAAR, R.; B. TEN BRINK & J.H. HUIS in't VELT.** 1992. Selection of strains for probiotic use. (pp. 209-224). En: Fuller, R. (ed.). Probiotics: The Scientific Basis. Londres, Chapman & Hall.
- HUBER, J. T.** 1997. Probiotics in cattle. (pp. 162-186). En: Fuller, R. (ed.), Probiotics 2, Applications and practical aspects. Ed. Chapman & Hall, London.
- KLAENHAMMER, T. R.** 1998. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. Int. Dairy J. 8: 497-505.
- KLEIN, G.; A. PACK; Ch. BONAPARTE & G. REUTER.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 41: 103-125.
- KURZAK, P.; M. A. EHRMANN & R. F. VOGEL.** 1998. Diversity of lactic acid bacteria associated with ducks. Syst. Appl. Microbiol. 21: 588-592.
- LEWINGTON, J.; S. D. GREENAWAY & B. J. SPILLANE.** 1987. Rapid small scale preparation of bacterial genomic DNA, suitable for cloning and hybridization analysis. Lett.

- Appl. Microbiol. 5: 51-53.
- McCARTNEY, A. L.** 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Brit. J. Nutr.* 88 (Suppl. 1): S29-S37.
- MITSUOKA, T.** 1992. The human gastrointestinal tract. (pp. 69-114). En: Wood, B.J. (ed.). *The Lactic acid bacteria*, Vol. 1, *The Lactic acid bacteria in health and disease*. Ed. Elsevier, New York.
- MULDER, R. W.; R. HAVENAAR & J. H. HUIS in 't VELD.** 1997. Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry. (pp. 187-207). En: Fuller, R. (ed.). *Probiotics 2, Applications and practical aspects*. Ed. Chapman & Hall, London.
- OUWEHAND, A. C. & S.J. SALMINEN.** 1998. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* 8: 749-758.
- PASCUAL, M.; M. GARRIGA & J. M. MONFORT.** 1996. Los probióticos en la alimentación animal. *Eurocarne* 44:91-96.
- RAIBAUD, P.** 1992. Bacterial interactions in the gut. (pp. 9-28). En: Fuller, R. (ed.). *Probiotics: Scientific Basis*. Ed. Chapman & Hall, London.
- ROSMINI, M. R.; G. J. SEQUEIRA; I. GUERRERO LEGARRETA; L. E. MARTÍ; R. DALLA SANTINA; L. FRIZZO & J. C. BONAZZA.** 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev. Mexicana Ing. Química.* 3: 187-197.
- SEALE, D. R.** 1986. Bacterial inoculants as silage additives. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 61: 9s-26s.
- SMORAGIEWICZ, W.; M. BIELEKA; A. BABUCHOWSKI & H. DUBEAU.** 1993. Les probiotiques. *Can. J. Microbiol.* 39: 1089-1095.
- STILES, M. E. & W. H. HOLZAPFEL.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- TEUBER, M.** 1993. Lactic acid bacteria. (pp. 326-366). En: Rebru, H.B. & G. Reed (ed.). *Biotechnology (2e.)*. Ed. Velt Verlagegerueinshalt, Weiheim, BRD.
- VOGEL, R. F.; M. MÜLLER; P. STOLZ & M. A. EHRMANN.** 1996. Ecology in sourdoughs produced by traditional and modern technologies. *Adv. Food Sci.* 18:152-159.
- WILLIAMS, J. G. K.; A. R. KUBELIK; K. J. LIVAK; J. A. RAFALSKI & S. V. TINGEY.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.