

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LAS CAPACIDADES PROBIÓ- TICAS MICROBIANAS ORIENTADAS AL DISEÑO DE INÓCULOS PROBIÓTICOS MULTIESPECIE PARA SER UTILIZADOS EN LA CRIANZA DE TERNEROS

**FRIZZO, L. S.¹; SOTO, L. P.¹; BERTOZZI, E.¹;
SEQUEIRA, G.¹; MARTI, L. E.¹; & ROSMINI, M. R.¹**

RESUMEN

El uso de microorganismos autóctonos con capacidad probiótica es una herramienta alternativa para el tratamiento y prevención de algunas patologías animales. La eficacia de las cepas seleccionadas debe ser comprobada antes de que estas sean suministradas a los animales. Para ello, se utilizan una serie de criterios que permiten determinar *in vitro* algunas propiedades probióticas. Es conveniente que el inóculo a utilizar en los animales esté formado por una mezcla de varias cepas, de forma que entre ellas puedan complementar sus efectos expresando sus propiedades probióticas en forma sinérgica. El objetivo de este estudio fue caracterizar un grupo de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de terneros lactantes sanos, mediante pruebas *in vitro* para considerar su posterior aplicación durante la alimentación en la etapa de crianza de los terneros. Se observó la producción de una sustancia antimicrobiana por parte de *P. acidilactici* DSPV 006T la cual podría generar efectos benéficos durante el tránsito intestinal que contribuyan al balance de la microbiota. La capacidad de autoagregación de *L. salivarius* DSPV 315T junto la gran performance de crecimiento y sobrevivencia a los jugos gástricos de *L. casei* DSPV 318T hacen que estas 3 cepas posean características que permitan predecir ventajas competitivas, frente a las otras estudiadas, al momento en que tengan que actuar en los animales. Estas propiedades demuestran que las cepas son buenos exponentes para ser incorporados a la dieta de los terneros como un inóculo probiótico multiespecie.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, terneros, propiedades probióticas, probióticos multiespecies

1.- Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805 (S3080HOF) Esperanza, Santa Fe.

E-mail: lfrizzo@fcv.unl.edu.ar

Manuscrito recibido el 24 de octubre de 2006 y aceptado para su publicación el 11 de diciembre de 2006.

SUMMARY

***In vitro* evaluation of the microbial probiotic capacities focused to design of multispecies probiotic inocula to be used in breeding of calves.**

The use of indigenous microorganisms with probiotic capacity is an alternative tool for the treatment and prevention of some animal pathologies. The efficacy of the chosen strains must be verified before these are given to the animals. For it, a series of criteria are used to determine some *in vitro* probiotic properties. It is suitable that the inoculum to be used in the animals is formed by a mix of several strains, so that they could complement their effects and express sinergically their the probiotic properties. The aim of this study was to characterize a group of lactic acid bacteria isolated from nursing healthy calves, by means of *in vitro* assay to be considered for administration during the feeding in the breed stage of calves. The antimicrobial substance produced by *P. acidilactici* DSPV 006T can generate beneficial effects during the intestinal transit and contribute to the balance of the microbiota. The autoaggregation capacity of *L. salivarius* DSPV 315T and the higher performance of growth and the survival to the gastric juices of *L. casei* DSPV 318T suggests that these three strains possess characteristics that allow to predict competitive advantages compared to other organisms in actual conditions of use in animals. These properties suggest that the strains are good exponents to be incorporated into the diet of the calves as a multispecies probiotic inoculum.

Key words: lactic acid bacteria, calves, probiotic properties, multispecies probiotics.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren efectos benéficos al hospedador (FAO/WHO, 2001). La supervivencia durante el tránsito gastrointestinal de las bacterias ingeridas es importante para la selección y desarrollo de inóculos probióticos, así como para entender mejor los posibles mecanismos de la función probiótica de los microorganismos (Marteau *et al.*, 1997).

El uso de los microorganismos autóctonos con capacidad probiótica es una alternativa terapéutica para el tratamiento y prevención de algunas patologías animales (Rosmini *et al.*, 2004). Las cepas probióticas pueden ser seleccionadas teniendo en cuenta su condición de habitante intestinal normal (Gusils *et al.*, 2002). Si bien este concepto dirigiría la búsqueda de los exponentes microbianos hacia el tracto gastrointestinal

(contenido y mucosas) resulta interesante comprobar el comportamiento de aquellos microorganismos que se encuentran en el ambiente cercano a los animales. Esto se debe a que es muy difícil confirmar la fuente de un microorganismo y no está aclarado totalmente el origen de la microbiota intestinal (FAO/WHO, 2001).

La especificidad de especie animal es un factor importante que interfiere en la colonización y en la adhesión *in vivo* por parte de los microorganismos. Esto indica que las cepas bacterianas aisladas desde la microbiota indígena de una determinada especie no coloniza necesariamente el mismo sitio en otra especie animal. Sin embargo, debido a que el desempeño de los microorganismos probióticos puede variar entre los animales de una misma especie, es conveniente que el inóculo a utilizar esté formado por una mezcla de varias cepas (Gardiner *et al.*, 2004) ya que la funcionalidad de un inóculo

probiótico multicepa puede ser más efectiva y consistente que la de un monocepa (Timmerman *et al.*, 2004). Una ventaja de los inóculos integrados por varias cepas es la posibilidad de complementar sus efectos expresando sus propiedades probióticas en forma sinérgica. Por otra parte, es más probable que la colonización de un ecosistema complejo como el gastrointestinal ocurra con inóculos probióticos multiespecies que con preparaciones monocepa.

La eficacia de las cepas seleccionadas debe ser comprobada antes de incorporarlas a un producto alimenticio y suministrarla a los animales. Para ello, son utilizados una serie de criterios que permiten determinar *in vitro* algunas propiedades probióticas. La estabilidad a la bilis y a la acidez son propiedades que todas las cepas deberían reunir si se espera que ellas tengan efectos benéficos en el tracto intestinal (Nousiainen & Setälä, 1998).

Los microorganismos ingeridos están expuestos, durante su tránsito gastrointestinal, a factores estresantes que comprometen su supervivencia (Marteau *et al.*, 1997). Esto determina la necesidad de contar con métodos *in vitro* confiables que permitan seleccionar cepas prediciendo la supervivencia de lactobacilli en el tubo digestivo (Jacobsen *et al.*, 1999).

Las condiciones ácidas del estómago son una barrera natural que previene el paso de la mayoría de los microorganismos hacia el intestino. Aunque pocas bacterias pueden tolerar un ambiente ácido (pH 3), las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen la habilidad de sobrevivir y crecer en ambientes con bajo pH. Además, la producción de ácidos orgánicos por las BAL disminuye el pH de su entorno y las coloca en una situación ventajosa frente a microorganismos sensibles al pH bajo. Después del pasaje a través de las condiciones ácidas del estómago, los micro-

organismos incorporados a la dieta deben ser capaces de sobrevivir a los efectos tóxicos de la bilis en el intestino (Gotcheva *et al.*, 2002). Este efecto estresante sobre las cepas de *Lactobacillus* es complejo porque la concentración de bilis y el tiempo de residencia varía en cada parte del tracto gastrointestinal. Además, la resistencia a la bilis puede ser incrementada debido al efecto protector de algunos componentes de los alimentos.

Una propiedad valiosa para considerar su aplicación en la dieta de los terneros lactantes es la capacidad que tienen las BAL para controlar los efectos adversos que producen algunos patógenos intestinales (Frizzo *et al.*, 2005). El desarrollo de productos probióticos eficaces sugiere que las cepas deberían poseer actividad antimicrobiana porque esta característica hace que las BAL, cuando se administran en cantidad adecuada, tengan potencial para generar una barrera frente a los patógenos. Esto ayudaría a mantener en balance la microbiota intestinal durante una etapa crítica como es el período de crianza. Si bien algunas cepas han mostrado efectos benéficos administrándolas en forma terapéutica, el suministro de microorganismos junto a la alimentación a manera de profilaxis desde el nacimiento permite incorporar y establecer las cepas seleccionadas que integran el inóculo junto a la microbiota de los terneros. Esta colonización temprana de las BAL benéficas en el ecosistema intestinal permitiría la acción del inóculo en situaciones fisiológicas y coloca al ternero en una posición ventajosa ante la invasión de algún patógeno.

El objetivo de este estudio fue caracterizar un grupo de BAL aisladas a partir de terneros lactantes sanos mediante pruebas *in vitro* para considerar su posterior aplicación durante la alimentación en la etapa de crianza de los terneros.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS

Los microorganismos usados fueron obtenidos en un estudio anterior (Schneider *et al.*, 2004) mediante aislamiento desde la saliva y las diferentes partes del intestino (duodeno, yeyuno y colon) de terneros lactantes de entre 5 y 25 d de vida, criados en guacheras de los establecimientos lecheros, y de la vagina de vacas que estaban próximas al parto. Todos los establecimientos donde se tomaron muestras estaban en el área de influencia de la FCV-UNL. La identificación se hizo por técnicas de biología molecular (16S-rDNA-PCR) (Schneider *et al.*, 2004). Las BAL indígenas utilizadas en el estudio se encuentran listadas en el cuadro 1.

CUANTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

Las BAL se multiplicaron en caldo MRS (Biokar, Francia) durante 18 h a 37 °C para obtener un cultivo madre de cada una de las cepa en estudio. Con el fin de establecer un método rápido de cuantificación se realizaron diluciones decimales a partir de cada cultivo madre. A estos cultivos y a sus diluciones decimales se le realizaron

las determinaciones de densidad óptica a 560 nm (DO_{560}) con un espectrofotómetro (Metrolab 330, UV Vis) y, paralelamente, se efectuaron los recuentos en placas para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC). Para cada cepa se construyó su curva estándar de calibración a partir del logaritmo de las UFC y de las lecturas de DO_{560} obtenidas (fig. 1). La curva se utilizó para evaluar la capacidad de las cepas para producir biomasa.

CRECIMIENTO EN BILIS

El estudio de la resistencia a la bilis se llevó a cabo de acuerdo con la metodología utilizada por Walker & Gilliland (1993). Las BAL fueron multiplicadas en caldo MRS con 0% (control), 0,3%, 0,5% y 1% de bilis bovina (Britania, Argentina). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h y el crecimiento se midió por DO_{560} . Los resultados se expresaron como \log_{10} UFC/ml utilizando las ecuaciones del modelo para cuantificar los microorganismos.

TOLERANCIA A JUGOS GÁSTRICOS SIMULADOS (JGS)

Cuadro 1. Bacterias ácido lácticas indígenas utilizadas en el estudio.

Especie	Cepa	Origen
<i>Lactobacillus farciminis</i>	DSPV 003T	Saliva
<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSPV 006T	Duodeno
<i>Enterococcus faecium</i>	DSPV 022T	Vagina
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSPV 301T	Saliva
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSPV 311T	Colon
<i>Lactobacillus salivarius</i>	DSPV 315T	Yeyuno
<i>Lactobacillus casei</i>	DSPV 318T	Saliva

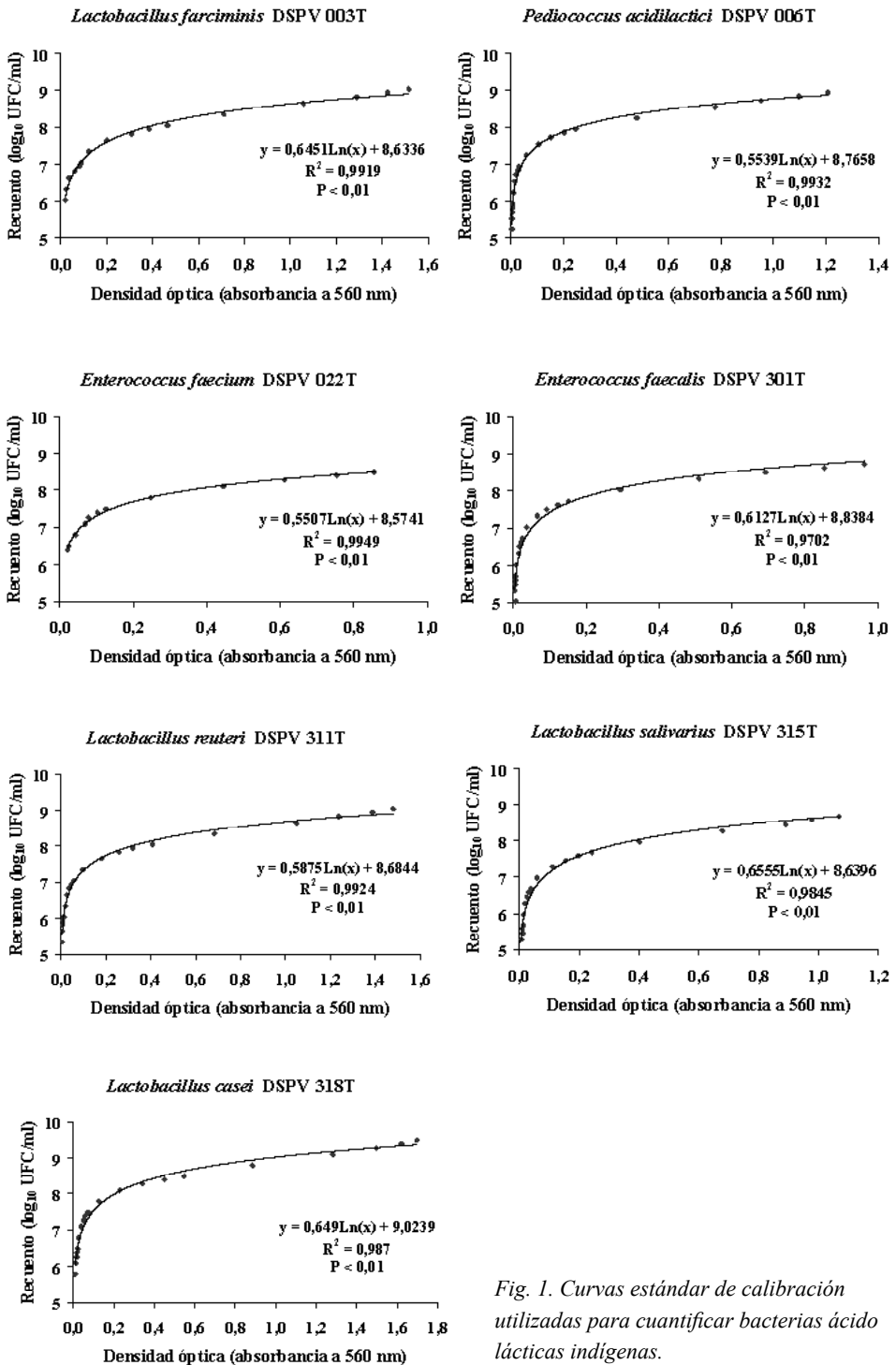


Fig. 1. Curvas estándar de calibración utilizadas para cuantificar bacterias ácido lácticas indígenas.

El ensayo de tolerancia a los jugos gástricos se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones de Charteris *et al.* (1998). El JGS consistió en una solución de pepsina (Riedel-de Haën, Alemania) (0,3% p/v) y NaCl (0,5% p/v) ajustada a pH 3. Cultivos frescos de cada cepa fueron centrifugados a 4000g durante 10 min. El pellets se lavó dos veces con PBS pH 6,5 y 1 ml de la suspensión celular se resuspendió en 5 ml de JGS y en PBS pH 6,5 (control). Se realizaron recuentos de células viables en agar MRS a tiempo 0. Las suspensiones se incubaron durante 3 h a 37 °C y se repitieron los recuentos.

En ambos casos las placas fueron incubadas durante 48 h a 37 °C en atmósfera anaeróbica.

PRUEBA DE AGREGACIÓN

El ensayo de agregación se llevó a cabo de acuerdo a la técnica utilizada por Reniero *et al.* (1992). Los cultivos, incubados 18 h a 37 °C en MRS, de las BAL utilizadas fueron lavados tres veces con agua destilada y resuspendidos en el volumen inicial con una solución Ringer ¼. Los sobrenadantes de cada una de las cepas fueron esterilizados por filtración y agregados a la suspensión a una concentración final del 10% (v/v) e incubados a temperatura ambiente. La agregación se consideró positiva cuando partículas visibles, similares a la arena y formadas por las células agregadas, se depositaron en el fondo del tubo dejando el sobrenadante limpio en un período máximo de 2 h a temperatura ambiente.

PRUEBA DE COAGREGACIÓN

El ensayo de coagregación se realizó de acuerdo al procedimiento utilizado por Kmet *et al.* (1995) y fueron utilizadas las cepas que

mostraron actividad de agregación positiva. Se prepararon suspensiones en PBS de las BAL y de las cepas indicadoras utilizadas: *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella dublin* DSPV 595T. Se mezclaron 250 µl de los cultivos, incubados 18 h a 37 °C en MRS, de las BAL lavadas y resuspendidas en agua junto a 250 µl de *Escherichia coli* ATCC 25922 o *Salmonella dublin* DSPV 595T lavadas con agua (multiplicadas a 37 °C durante 18 h en BHI (Britania, Argentina)). A la mezcla se le agregó 500 µl de PBS (pH = 6,0). La prueba se consideró positiva cuando se hizo visible la sedimentación de las células sobre el fondo del tubo en un período máximo de 2 h a temperatura ambiente. Se desarrollaron controles con suspensiones en PBS de las BAL y los patógenos utilizados.

HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR

Para evaluar la hidrofobicidad en la superficie bacteriana se realizó un ensayo en base a las indicaciones de Kmet & Lucchini (1997). Cada una de las BAL tomadas de un cultivo fresco en caldo MRS a 37 °C ($DO_{560} = 0,6$) y lavadas con PBS, fueron mezcladas con la misma cantidad de n-hexadecano (Merck, Alemania) a temperatura ambiente. Después de un tiempo de separación de 60 min, se midió la DO_{560} de la fase acuosa. El porcentaje de hidrofobicidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hidrofobicidad} = \frac{(\text{DO}_{560} \text{ antes de mezclar} - \text{DO}_{560} \text{ después de mezclar}) \times 100}{\text{DO}_{560} \text{ antes de mezclar}}$$

Así, la disminución en la DO fue usada como medida de la hidrofobicidad de la superficie celular y se expresó como porcentaje. Además, estos resultados se expresaron como

\log_{10} UFC utilizando las ecuaciones del modelo para cuantificar los microorganismos (fig. 1).

DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA E INTERACCIÓN ENTRE CEPAS

La detección de la actividad inhibitoria se realizó utilizando el método de difusión en agar (Bhunja *et al.*, 1988). Sobre 10 ml de medio MRS (1,5% de agar) solidificado en una placa de Petri se colocó una delgada lámina de 8 ml de medio MRS (0,8% de agar) inoculado con 0,3 ml de una dilución 1/10 del cultivo de la cepa blanco u objetivo. Las placas se colocaron a 4 °C durante 1 h y se prepararon hoyos de 5 mm de diámetro sobre la capa de agar superior. Cuando se utilizaron micro-organismos patógenos y alterantes como cepa blanco, fue empleado el agar BHI o agar tripticasa soya en esta parte del ensayo.

Por otro lado, las BAL se cultivaron en caldo MRS durante 18 h a 37 °C. Los sobrenadantes de los cultivos frescos obtenidos por centrifugación fueron ajustados a pH 5,8 y pH 6,5 y esterilizados por filtración para obtener así el extracto libre de células (ELC). Este fue utilizado en un volumen de 25 μ l para rellenar cada hoyo, de los mencionados anteriormente. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 h y se examinaron en busca de halos de inhibición alrededor de los hoyos. Los resultados se informaron como positivos o negativos sobre la presencia o ausencia de zona de inhibición.

Como microorganismos blanco se utilizaron *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella dublin* DSPV 595T. Además, las propias BAL fueron empleadas como blanco para determinar la inhibición entre ellas, y por lo tanto, su interacción. Como microorganismo control (productor de bacteriocina) se utilizó una

cepa de *Lactococcus lactis* y como control blanco (cepa sensible) se utilizó una cepa de *Lactobacillus sake*. Los microorganismos patógenos y alterantes se cultivaron en caldo Tripticasa soya (Britania, Argentina) y BHI durante 18-24 h a 37 °C. Todas las cepas utilizadas estaban almacenadas a -80° C con 35% de glicerol como crioprotector y antes de su utilización fueron activadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cuantificar las cepas se empleó un modelo logarítmico de regresión. Los datos representados por variables continuas fueron analizados utilizando un ANOVA mediante el Programa Statgraphics Plus para Windows ver. 3.0. Cuando las diferencias resultaron significativas se aplicó el test de Tukey de comparaciones múltiples de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El modelo logarítmico utilizado ajustó en forma significativa ($P < 0,01$) y permitió cuantificar las cepas estudiadas. Además, fue posible evaluar la capacidad de los microorganismos para generar biomasa. *L. casei* DSPV 318T fue quien produjo mayor concentración microbiana por unidad de volumen. Esta es una característica que adquiere mucha importancia cuando se deben producir los microorganismos a escala industrial.

La resistencia a la bilis es una característica importante que permite a los *Lactobacillus* sobrevivir y crecer en el tracto intestinal. Cuando se administran a los terneros cepas con baja y alta tolerancia a la bilis, la cepa resistente causa mayor incremento en el número de lactobacilli facultativos que la que posee menor tolerancia (Nousiainen & Setälä, 1998). No hubo diferencias significativas entre las cepas estudiadas. Todas

Cuadro 2. Ensayos de agregación, coagregación, hidrofobicidad, tolerancia a jugos gástricos simulados y de crecimiento en bilis bovina de las bacterias ácido lácticas indígenas estudiadas.

	Agregación ¹	Coagregación ²		Hidrofobicidad ³	Crecimiento en bilis ⁴			Toleranc
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T		0,3 %	0,5 %	1,0 %	
<i>Lactobacillus farciminis</i> DSPV 003T	-	-	-	5,49 %	0,08	0,06	0,14	0,11
<i>Pediococcus acidilactici</i> DSPV 006T	-	-	-	2,83 %	0,34	0,33	0,27	-0,09
<i>Enterococcus faecium</i> DSPV 022T	-	-	-	14,20 %	0,07	0,00	-0,03	0,04
<i>Enterococcus faecalis</i> DSPV 301T	-	-	-	11,39 %	0,01	-0,03	-0,02	0,08
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 311T	-	-	-	15,71 %	0,22	0,31	0,06	-0,03
<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV 315T	+	-	-	13,83 %	0,00	-0,05	-0,05	0,10
<i>Lactobacillus casei</i> DSPV 318T	-	-	-	6,89 %	0,17	0,22	0,22	0,14

1: (-) agregación bacteriana negativa; (+) agregación bacteriana positiva.

2: (-) coagregación bacteriana negativa; (+) coagregación bacteriana positiva.

3: porcentaje de hidrofobicidad y su resultado equivalente expresado en Log₁₀ UFC/ml retenidos en la fase no acuosa.

4: Disminución del crecimiento comparado con el desarrollo estándar sin bilis (transformados a Log₁₀ UFC/ml).

5: Disminución entre los recuentos de células viables a tiempos 0 y 3 h (Log₁₀ UFC/ml).

las cepas indígenas mostraron tolerancia a la bilis bovina siendo *L. salivarius* DSPV 315T la que presentó el mejor crecimiento en presencia de este inhibidor (Cuadro 2). La resistencia a la bilis es indicativa de la capacidad de las cepas para sobrevivir a la toxicidad que la bilis ejerce durante el pasaje a través del intestino delgado, e incrementa el potencial de estos microorganismos para ser incorporados en la dieta de los terneros.

La tolerancia ácida es una propiedad que cualquier cepa debería poseer para sobrevivir durante el pasaje gástrico y de esa manera arribar al intestino en mayor número y en mejores condiciones. Por este motivo, es un importante criterio de selección de cepas probióticas (Charteris *et al.*, 1998). Las cepas estudiadas mostraron una alta capacidad de sobrevivir cuando fueron expuestas a soluciones gástricas de pH tan bajo como 3 y *L. casei* DSPV 318T fue quien mejor toleró la solución gástrica (Cuadro 2). Los componentes del alimento y los constituyentes no ácidos de la secreción gástrica podrían tener un efecto protector en la viabilidad de las cepas durante su exposición a las condiciones ácidas del estómago, que no son tenidos en cuenta en la prueba *in vitro* utilizada. Esto hace atractivo realizar pruebas *in vivo* para evaluar el comportamiento en esas condiciones. Aunque la tolerancia de las cepas 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, es decir sin este tipo de protectores, porque la tolerancia a la misma implica una mayor capacidad de los microorganismos para sobrevivir.

En los pasos iniciales de la adhesión microbiana es fundamental que exista una interacción hidrofóbica entre la célula bacteriana y el sustrato de contacto. Todas las cepas utilizadas en el ensayo mostraron una superficie celular extremadamente hidrofí-

lica (Cuadro 2). De todas maneras, un valor bajo de hidrofobicidad no indica que la cepa tenga menores posibilidades de adherirse al epitelio intestinal ya que los dominios hidrofílicos podrían también estar implicados en el proceso de adhesión (Savage, 1992). Los mecanismos de adhesión pueden requerir la participación de distintos constituyentes de superficie que interactúan de manera secuencial para vencer las fuerzas repulsivas (Gusils *et al.*, 2002).

La capacidad de agregación es una característica que puede utilizarse para iniciar el estudio de las interacciones microbianas. Existe una asociación entre la habilidad de los lactobacilos para adherirse al epitelio intestinal, la actividad de agregación y la hidrofobicidad de su superficie (Wadstrom *et al.*, 1987). Sólo una cepa, *L. salivarius* DSPV 315T, fue capaz de autoagregar. Aunque no hubo coagregación frente a los patógenos utilizados, su capacidad de agregar la distingue de otras porque hace posible su acción ante microorganismos patógenos formadores de biofilm.

Las propiedades antagónicas que ocurren en el intestino, entre los microorganismos que lo pueblan, pueden ocurrir por diversos motivos: ante el descenso del pH del lumen a causa de la producción de ácidos orgánicos de cadena corta, al competir por nutrientes específicos, al disminuir el potencia redox del ambiente intestinal y ante la producción de peróxido de hidrógeno y/o compuestos inhibitorios específicos como las bacteriocinas (Dunne *et al.*, 1999). Si las BAL probióticas son metabólicamente activas durante su pasaje a través del intestino, es muy probable que se produzcan algunas de estas sustancias (Ouweland *et al.*, 1999). *Pediococcus acidilactici* DSPV 006T produjo una sustancia capaz de inhibir microorganismos de los géneros *Pseudomonas* y *Enterococcus*. Este hecho impide la incor-

Cuadro 3. Detección de actividad inhibitoria e interacción entre bacterias ácido lácticas indige-

		Cepa objetivo											
		<i>Lactobacillus farciminis</i> DSPV 003T	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSPV 006T	<i>Enterococcus faecium</i> DSPV 022T	<i>Enterococcus faecalis</i> DSPV 301T	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 311T	<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV 315T	<i>Lactobacillus casei</i> DSPV 318T	<i>Lactobacillus sake</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella dublin</i> DSPV 595T	
Cepa productora	ELC pH 5,8	<i>Lactobacillus farciminis</i> DSPV 003T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		<i>Pediococcus acidilactici</i> DSPV 006T	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
		<i>Enterococcus faecium</i> DSPV 022T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Enterococcus faecalis</i> DSPV 301T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 311T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV 315T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Lactobacillus casei</i> DSPV 318T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
	ELC ¹ pH 6,5	<i>Lactobacillus farciminis</i> DSPV 003T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Pediococcus acidilactici</i> DSPV 006T	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	
		<i>Enterococcus faecium</i> DSPV 022T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Enterococcus faecalis</i> DSPV 301T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Lactobacillus reuteri</i> DSPV 311T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Lactobacillus salivarius</i> DSPV 315T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Lactobacillus casei</i> DSPV 318T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>Lactococcus lactis</i>	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	

¹: Extracto libre de células. Sobrenadante del cultivo.

(-) Inhibición negativa del crecimiento, (+) Inhibición positiva del crecimiento.

poración conjunta de las cepas indígenas de los géneros *Pediococcus* y *Enterococcus* en un mismo inóculo multiespecie. Ninguna cepa fue capaz de inhibir *Escherichia coli* o *Salmonella dublin* bajo las condiciones probadas (Cuadro 3). Los resultados indican que la sustancia inhibidora producida por la cepa indígena podría ser similar a una bacteriocina, pues el método utilizado permite excluir el efecto del ácido. No obstante, deberían realizarse otros ensayos para confirmar esta hipótesis. La capacidad de generar sustancias antimicrobianas juega un rol significativo en la habilidad de los probióticos para competir con la microbiota residente y modificarla benéficamente.

En general, las cepas mostraron un comportamiento a las pruebas *in vitro* que las hace buenos exponentes para ser incorporados a la dieta de los terneros como un inóculo probiótico multiespecie. La producción de una sustancia antimicrobiana por parte de *P. acidilactici* DSPV 006T puede generar efectos benéficos durante el tránsito intestinal que contribuyan al balance de la microflora. La capacidad de autoagregación de *L. salivarius* DSPV 315T junto a la gran performance de crecimiento y sobrevivencia a los jugos gástricos de *L. casei* DSPV 318T hacen que estas 3 cepas posean características que permitan predecir ventajas competitivas frente a las otras al momento en que tengan que actuar en los animales. Estos resultados sugieren que las cepas pueden permanecer viables en un alto número durante el tránsito gástrico e intestinal y, de esta manera, complementar sus efectos en forma sinérgica al expresar sus propiedades probióticas. Resulta necesario realizar otros estudios que permitan evaluar el comportamiento *in vivo* del inóculo seleccionado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica (proyecto PICT n° 08-06970) y por la Universidad Nacional del Litoral (proyecto CAI+D n° 14-1-11). L. S. Frizzo y L. P. Soto son becarios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina).

BIBLIOGRAFÍA

- BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M. C. & RAY, B.** 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol., 65:261-268.
- CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L. & COLLINS, J. K.** 1998. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J. Appl. Microbiol., 84:759-768.
- 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., 76:279-292.
- FAO/WHO.** 2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Expert consultation report: Córdoba, Argentina: Food and agriculture organization of the United Nations and World Health Organization, 1-4 October.
- FRIZZO, L.; PERALTA, C.; ZBRUN, V.; BERTOZZI, E.; SOTO, L.; MARTI, E.; DALLA SANTINA, R.; SEQUEIRA, G.**

- & ROSMINI, M. R.** 2005. Respuesta de ratones inoculados con bacterias lácticas de origen bovino a un desafío con *Salmonella dublin*. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias, 4:41-53.
- GARDINER, G. E.; CASEY, P. G.; CASEY, G.; BRENDAN LYNCH P.; LAWLOR, P. G.; HILL, H.; 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.
- 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.
- GUSILS, C.; BUJAZHA, M. & GONZÁLEZ, S.** 2002. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. Interciencia, 27:409-413.
- JACOBSEN, C. N.; ROSENFELDT NIELSEN, V.; HAYFORD, A. E.; MØLLER, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PÆRREGAARD, A.; SANDSTRÖM, 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.
- KIELY, L. J. & OLSON, N. F.** 2000. The physi-chemical surface characteristics of *Lacto-bacillus casei*. Food Microbiol., 17:277-291.
- KMET, V.; CALLEGARL, M. L.; BOTTAZZI, V. & MORELLI, L.** 1995. Aggregation-promoting factor in pig intestinal *Lactobacillus* strains. Lett. Appl. Microbiol., 21:351-353.
- KMET, V. & LUCCHINI F.** 1997. Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. FEMS Immun. Med. Microbiol., 19:111-114.
- MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R. & HUIS IN'T VELD, J. H. J.** 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. J. Dairy Sci., 80:1031-1037.
- NOUSIAINEN, J. & SETÄLÄ, J.** 1998. Lactic acid bacteria as animal probiotics. In Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects (Eds. S. Salminen and A. von Wright), pp 437-473. Marcel Dekker, New York.
- OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C. & SALMINEN, S.** 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. Int. Dairy J., 9:43-52.
- 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.
- 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. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 3:187-197.
- 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.
- 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.
- TIMMERMAN, H. M.; KONING, C. J. M.; MULDER, L.; ROMBOUTS, F.M. & BEYNEN A. C.** 2004. Monostrain, multistrain

and multispecies probiotics -a comparison of functionality and efficacy. Int. J. Food Microbiol., 96:219-233.

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.

WALKER, D.K. & GILLILAND, S.E. 1993. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. J. Dairy Sci., 76:956-961.