
Evaluación *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico para prevenir la diarrea neonatal de terneros (DNT) en Uruguay

Trabajo de grado

Licenciatura en Bioquímica

Orientación Microbiología

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Tutor: Dr. Pablo Zunino

Co-tutora: Lic. Sofía Fernández

Depto. de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Estefanía Silveyra Flores

Uruguay, Diciembre 2016

1.- Agradecimientos

A Dios por acompañarme siempre e iluminar mi vida.

A mis padres Imelda y Washington por sus consejos, por sus valores, amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos queridos Claudina y Pablo, por ser mis mejores amigos, estar siempre y darme para adelante.

A Sofi Fernández por aceptar ser mi co-tutora, por haberme guiado en todo momento, por compartir conmigo sus conocimientos, enseñarme y ayudarme en todas las tareas del laboratorio y en la realización de mi tesis.

A Pablo Zunino por aceptar ser mi tutor, por abrirme las puertas del Instituto y confiar en mí, por haber estado siempre y por guiarme y ayudarme en la tesis.

A todos mis compañeros de la colonia por todos los momentos lindos compartidos por enseñarme y ayudarme en las tareas del laboratorio.

A mi Blanquita querida, Frenay, Carmen, Joaco, Hector, Juan, Gabriel, Judith y a todas las personas lindas que conocí en el instituto, por el cariño y sus palabras de aliento.

A Luis y Margara por su apoyo en mis primeros años de facultad y por esos momentos hermosos que pasamos juntos.

A lore Castelli por su cariño y ayuda en todo momento.

A mis compañeros de facu, a mis amigas y amigos por escucharme, por su amistad, y por apoyarme siempre.

A todas aquellas personas que han estado para darme una voz de aliento y alimentarme de pensamientos bonitos.

2.- ÍNDICE

1.- AGRADECIMIENTOS.....	pág.1
2.- ÍNDICE.....	pág.2
3.- RESUMEN.....	pág.4
4.- INTRODUCCIÓN.....	pág.5
4.1.- Diarrea neonatal de los terneros.....	pág.5
4.2.- Agentes etiológicos de la DNT.....	pág.5
4.3.- Prevención y tratamiento de la DNT.....	pág.7
4.4.- Probióticos.....	pág.8
4.5.-Criterios para la evaluación de probióticos de administración oral.....	pág.8
4.6.- Uso de probióticos en terneros.....	pág.10
4.7.- Mecanismo de acción de los probióticos.....	pág.10
4.8.-Microorganismos utilizados como probióticos.....	pág.10
5.- HIPÓTESIS.....	pág.12
6.- OBJETIVOS.....	pág.12
6.1.-Objetivo general.....	pág.12
6.2.- Objetivos específicos.....	pág.12
7.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	pág.13
7.1- Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	pág.13
7.2- Resistencia a pH ácido.....	pág.16
7.3- Resistencia a sales biliares.....	pág.16
7.4- Actividad antimicrobiana.....	pág.17
7.5- Formación de <i>biofilms</i>	pág.18
8.- RESULTADOS.....	pág.19
8.1- Resistencia a pH ácido.....	pág.19

8.2- Resistencia a sales biliarespág.21

8.3- Actividad antimicrobiana.....pág.23

8.4- Cuantificación de la producción de *biofilms*.....pág.25

9.- DISCUSIÓN.....pág.26

9.1- Resistencia a pH ácido.....pág.26

9.2- Resistencia a sales biliares.....pág.28

9.3- Actividad antimicrobiana.....pág.29

9.4- Cuantificación de la producción de *biofilms*.....pág.30

9.5- Cepas candidatas para ser utilizadas como probióticos.....pág.31

10.- Conclusión y perspectivas.....pág.32

11.- Bibliografía.....pág.33

3.- RESUMEN

La diarrea neonatal de los terneros (DNT) es una importante enfermedad que afecta a terneros recién nacidos bajo sistemas de crianza artificial, provocando severas pérdidas económicas y productivas. Una de las estrategias que se propone como alternativa al uso de antibióticos para prevenir y tratar esta enfermedad es la utilización de probióticos.

Los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas pueden ejercer beneficios sobre la salud del huésped.

Los microorganismos que más se han caracterizado como potenciales probióticos tanto en animales como en humanos son las bacterias del género *Lactobacillus*.

En el presente trabajo se realizó una caracterización *in vitro* de 52 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de muestras de heces de terneros sanos criados al pie de la madre, con el objetivo de seleccionar las mejores candidatas para ser utilizadas como probióticos en terneros bajo sistemas intensivos y semi-intensivos, a modo de prevenir la diarrea neonatal de los terneros (DNT) en Uruguay.

Las pruebas *in vitro* consistieron en: evaluar la capacidad de resistencia de las cepas a pH ácido y sales biliares, capacidad formadora de *biofilms* y actividad antimicrobiana frente a patógenos potenciales causantes de DNT.

De las 52 cepas de lactobacilos evaluadas, se registraron 45 resistentes a pH=2 durante 2hs, representando el 87% del total. Solo 7 cepas (13%) resultaron ser sensibles.

Del ensayo de resistencia a 0,30% de sales biliares durante 4hs, 43 fueron resistentes, representando el 83 % del total. Solo 9 cepas (17%) resultaron ser sensibles.

En cuanto al ensayo de actividad antimicrobiana frente a *E.coli* y *S.typhimurium* (patógenos causantes de DNT) todas las cepas de *Lactobacillus* spp. exhibieron actividad antimicrobiana.

En cuanto al ensayo de formación de *biofilms*, de las 52 cepas estudiadas 19 fueron no formadoras de *biofilms* (37%), mientras que 33 cepas, resultaron ser formadoras de *biofilms* (63%). Dentro de este grupo se registraron 9 formadoras fuertes (17%), 14 formadoras moderadas (27%) y 10 formadoras débiles (19%).

Según nuestros resultados, las cepas 6.12 (*L.amylovorus*), 7.1 (*L.johnsonii*), 9.2 (*L.reuteri*) y 2.1 (*L.johnsonii*) podrían ser buenas candidatas ya que demostraron tener las mejores propiedades para ser utilizadas como probióticos.

Palabras clave

DNT, probióticos, *Lactobacillus* spp.

4.- INTRODUCCIÓN

El sector lechero en nuestro país, se encuentra actualmente desafiado debido a la gran demanda de productos lácteos y a la disminución del área destinada a la ganadería. Para poder satisfacer esta demanda, se han desarrollado sistemas de crianza intensivos y semi-intensivos con el fin de obtener altos rendimientos productivos. En estos sistemas, por lo general, los terneros se separan tempranamente de sus madres (Sánchez et al., 2015), agrupados en altas concentraciones de animales y alimentados muchas veces con sustitutos lácteos (Signorini et al., 2012). Todo esto genera estrés en los animales, lo que asociado a una inadecuada transferencia de inmunidad a través del calostro en las primeras horas de vida, facilita la colonización intestinal de patógenos promoviendo la diarrea neonatal de los terneros (DNT) (Foster, 1997).

4.1.- Diarrea neonatal de los terneros

La DNT es una enfermedad multifactorial compleja que suele presentarse desde las 12 horas posparto hasta los primeros 35 días de vida, y se caracteriza por excreción de heces acuosas y profusas, deshidratación progresiva, acidosis, y en casos severos, muerte en pocos días (Odeón, 2001).

Es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en sistemas semi-intensivos e intensivos. En Argentina por ejemplo, donde este tipo de sistemas tiene una importancia significativa, se estima que su incidencia puede llegar a ser superior al 60% y la mortalidad hasta un 20% (Margueritte et al., 2005). En nuestro país, anualmente existen brotes de esta enfermedad, pero no se tienen datos precisos en cuanto a su incidencia y mortalidad.

La DNT acarrea severas pérdidas económicas debido a los altos costos en tratamientos veterinarios, demanda de tiempo y mano de obra, así como también pérdidas productivas por mortalidad del ternero, o retraso en su crecimiento (Bilbao et al., 2012; Signorini et al., 2012).

4.2.- Agentes etiológicos de la DNT

Si bien la causa de la diarrea neonatal puede ser de origen infeccioso o no infeccioso, son las primeras las que originan mayores problemas de mortalidad (Odeón, 2001). Los agentes etiológicos involucrados son varios (virus, parásitos y bacterias) y pueden atacar de forma individual o en forma combinada. Entre los agentes bacterianos más comunes asociados a la diarrea neonatal a nivel mundial, se encuentra *Escherichia coli* enterotoxigénica (F5 [K99] y F41) (Nguyen et al., 2000), aunque también se han encontrado recientemente *Salmonella* spp (Odeón, 2001) y *E.coli* verotoxigénica (O157:H7) (Dean-Nystrom et al., 1997).

Los agentes virales más comunes asociados a esta enfermedad son Rotavirus y Coronavirus, y entre los parásitos se encuentra *Cryptosporidium parvum* en primer lugar (Foster y Smith, 2009).

Es importante aclarar, que es posible encontrar estos agentes en muestras de heces de animales clínicamente sanos, por lo que la manifestación de la enfermedad dependerá no solo del agente etiológico, sino también de otros factores como el estado del ternero, la transferencia de inmunidad pasiva y de condiciones ambientales (Lorenz et al., 2011).

En Uruguay, tras un estudio realizado en conjunto por Santa Elena-Virbac, Facultad de Ciencias y el Instituto Clemente Estable sobre muestras fecales de terneros menores de 35 días con diarrea, provenientes de diferentes establecimientos lecheros de nuestro país, se identificaron a *E.coli*, Rotavirus y Coronavirus, como los principales agentes etiológicos, demostrándose además casos con infecciones mixtas (Acuña et al., 2013).

Tanto los virus como el parásito *C. parvum*, causan destrucción y atrofia de las vellosidades intestinales, lo que provoca mala absorción de azúcares contribuyendo a desencadenar la diarrea (Odeón, 2001; Young-il y Kyoung-jin, 2014). Sin embargo, las diarreas provocadas por estos agentes suelen ser autolimitadas y de baja mortalidad, particularmente las provocadas por Rotavirus y *C. parvum*, pero el pronóstico puede agravarse cuando hay coinfección con otros agentes principalmente bacterianos (Foster, 1997).

Las cepas de *E.coli* enterotoxigénicas (ETEC), pueden actuar como enteropatógenos primarios. Colonizan las células epiteliales del intestino delgado por medio de fimbrias, y allí producen enterotoxinas proteicas estables al calor (Sta o Stb) y/o lábiles al calor (Lt1 o Lt2) que se adhieren a la superficie del enterocito activando el sistema guanilato ciclasa y /o adenilciclasa respectivamente, con posterior aumento en los niveles de GMP_c y/o AMP_c intracelular. Como consecuencia, estos segundos mensajeros activan proteinquinasas específicas desencadenando la hipersecreción de agua y electrolitos, dando lugar a diarreas acuosas, profusas y sin pujo, con posterior debilitamiento, postración y muerte del animal, generalmente en un plazo de 24hs (Foster, 1997; Young-il y Kyoung-jin, 2014). Los terneros más afectados suelen tener entre 1 a 4 días de edad (Young-il y Kyoung-jin, 2014). El gen que codifica para la enterotoxina Sta, es la que mayormente se ha detectado en cepas de ETEC aisladas de terneros diarreicos, aunque existen algunos reportes en los que también se informa la presencia de LT y Stb (Picco et al., 2015).

Las cepas de *E.coli* verotoxigénicas (O157:H7), producen toxinas citotóxicas para las células, las verotoxinas (VT), que actúan en el colon preferentemente, causando diarreas, lesiones del tipo adhesión y borramiento (A/E) de las microvellosidades en el epitelio intestinal, y en algunos casos puede generar enterocolitis fibrinohemorrágica en terneros menores de 3 semanas de edad.

Sin embargo estas cepas no son patógenas en terneros mayores, pudiendo ser encontradas en muestras de heces de animales saludables (Dean-Nystrom et al., 1997).

En el caso de *Salmonella* spp., las cepas aisladas con mayor frecuencia en terneros menores de 3 semanas de edad con diarrea aguda y septicemia, pertenecen a las especies: *S. typhimurium* y *S. dublin* (Foster, 2009). Estos patógenos se adhieren inicialmente a la superficie del enterocito en la región del íleon terminal y colon, y luego penetran en el epitelio donde se multiplican, con el riesgo de diseminarse por sangre e infectar otros órganos. El mecanismo por el cual *Salmonella* induce diarrea no ha sido descrito detalladamente, aunque se ha reportado en algunas investigaciones que el proceso inflamatorio generado por la migración masiva de neutrófilos está implicado en el proceso, ya que provoca desprendimiento de la membrana basal de las células epiteliales favoreciendo la secreción de fluidos en el lumen intestinal (Santos et al., 2003). Los terneros afectados suelen presentar diarreas acuosas y mucoides con presencia de fibrina y sangre (Young-il y Kyoung-jin, 2014).

4.3.- Prevención y tratamiento de la DNT

En muchos casos la muerte de los terneros se da por la deshidratación y desbalance de electrolitos, y no como resultado de la multiplicación de los agentes infecciosos. Es por eso que la fluidoterapia se considera esencial a la hora de tratar terneros con diarrea. Sumado a la fluidoterapia, se recomienda la administración oral de protectores y adsorbentes gastrointestinales (Bilbao, 2013).

Los antibióticos, han sido de gran utilidad para prevenir y tratar diarreas bacterianas. Sin embargo, el uso indiscriminado de los mismos incluso como “promotores del crecimiento”, ha dado lugar a una creciente aparición y diseminación de resistencia bacteriana (Perelmuter et al., 2008). Estas resistencias podrían extenderse y llegar a la población humana a través de la cadena alimentaria poniendo en riesgo la salud, dado que la mayoría de los antibióticos que se utilizan para tratar y prevenir infecciones bacterianas en animales pertenecen a los mismos grupos químicos que los utilizados en la clínica (Torres y Zarazaga, 2002).

Por otra parte, al no respetarse los tiempos de retiro de los antibióticos, podrían permanecer residuos químicos en los productos de origen animal provocando efectos adversos en el consumidor como por ejemplo: diarreas, náuseas, fiebre y reacciones alérgicas (Falcón et al., 2009).

Además de estas consecuencias, la microbiota intestinal del animal puede ser alterada, al eliminar no solo bacterias patógenas sino también las beneficiosas aumentando la susceptibilidad a infecciones (Rofle, 2000., Lorenz et al., 2011; García et al., 2012). Debido a todas estas desventajas, la Unión Europea ha prohibido la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento desde enero del 2006 (Directiva 1831/2003/CEE en Calsamiglia et al., 2005). Su administración se recomienda solo en caso de que los terneros manifiesten diarrea aguda, con una marcada depresión anorexia y fiebre, o en

casos de que desarrollen una enfermedad sistémica, bajo el control de un profesional veterinario (Lorenz et al., 2011). En consecuencia, los productores han tenido que buscar otras estrategias para poder mejorar la salud animal y el desempeño productivo, orientando los esfuerzos en la prevención de la DNT.

Varios autores aseguran que una microbiota intestinal bien equilibrada, es crucial para la salud del huésped ya que es la principal línea de defensa contra la invasión de patógenos (Mohnl, 2011; Eckburg et al., 2005). Además es necesaria para complementar las necesidades nutricionales y mejorar la digestión de los alimentos, mejorando la producción animal (Mohnl, 2011). Sin embargo, diversos factores a los que están sometidos los terneros en los sistemas de crianza artificial, generan estrés en los animales provocando desbalances en su microbiota, favoreciendo la instalación de patógenos que colonizan y se extienden de forma descontrolada (Mohnl, 2011). Por lo tanto, una de las estrategias que se propone es la administración de probióticos, capaces de lograr el equilibrio adecuado de la microbiota intestinal, de modo de neutralizar e inhibir el desarrollo de patógenos potenciales causantes de enfermedades (García et al., 2012).

4.4.- Probióticos

Se denomina probióticos a microorganismos vivos (bacterias, hongos o levaduras) que al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped (FAO/WHO, 2001).

4.5. - Criterios para la evaluación de probióticos de administración oral:

Se han establecido una serie de requisitos que deben cumplir los microorganismos para ser considerados como probióticos, con el fin de garantizar su eficacia y beneficio en el hospedero (Castro y De Rovetto, 2006). Entre estos requisitos se destacan:

- 1- Formar parte de la microbiota intestinal del huésped.

La búsqueda de probióticos en general está orientada a microorganismos que formen parte de la microbiota intestinal de la especie animal a la que se suministrará, con el fin de garantizar su efectividad, inocuidad, permanencia y adaptabilidad (Lee y Salminen, 2009). Un estudio reveló la importancia de este criterio, ya que cepas de *Lactobacillus rhamnosus* aisladas de intestino humano fueron administradas en perros y su colonización resultó ser menor que en humanos, aunque no se observaron efectos adversos (Weese et al., 2002).

- 2- Ser resistentes al medio ácido del estómago y a las sales biliares en el duodeno.

Si las candidatas a probióticos van a ser administradas por vía oral, es imprescindible que sobrevivan las condiciones del tracto gastrointestinal, por lo que deberán ser resistentes al medio ácido del estómago y a las sales biliares en el duodeno de modo de llegar vivas al intestino y poder ejercer allí su efecto beneficioso (Morelli, 2000).

- 3- Producir sustancias antimicrobianas.

Se busca también que los probióticos sean capaces de producir sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno u otras sustancias difusibles de modo de inhibir el crecimiento de patógenos (Dunne et al., 2001).

- 4- Poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales y al mucus intestinal.

Las células caliciformes que se intercalan entre las células epiteliales del intestino secretan mucus, que oficia como barrera en el epitelio, por lo tanto, es de suma importancia que los futuros probióticos sean capaces de adherirse al mucus intestinal y a las células epiteliales subyacentes (Ouweland et al., 1999). Solo las cepas que puedan lograrlo podrán llevar a cabo una colonización efectiva y tendrán mayor probabilidad de formar *biofilms* (Merk et al., 2005).

- 5- Tener la capacidad de formar *biofilms*

Los *biofilms* se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos que ellos mismos secretan adheridos a una superficie inerte o a un tejido vivo (Gómez et al., 2013; Kleessen y Blaut, 2005). Suele asociarse a los *biofilms* con procesos patológicos. Sin embargo, su formación por parte de microorganismos probióticos, puede contribuir para neutralizar la colonización de agentes patógenos causantes de enfermedades (Lasa et al., 2005), aumentar la capacidad de resistencia de las cepas probióticas a condiciones hostiles del tracto gastrointestinal, tales como el ácido y la bilis, y prevenir su inmediata eliminación por movimientos peristálticos (Dertli et al., 2015). De esta manera al permanecer por más tiempo en el intestino estarán prolongando su efecto benéfico.

- 6- Modular el sistema inmune del huésped.

Se busca también que los candidatos a probióticos tengan la capacidad de modular el sistema inmunológico con el propósito de mejorar el funcionamiento del mismo (Isolauri et al., 2001).

Es importante que se evalúe la capacidad probiótica de cada cepa en particular, ya que las características probióticas no se pueden inferir a partir de su identificación (Dunne et al., 2001; Maldonado et al., 2015).

4.6.- Uso de Probióticos en Terneros

Varias investigaciones reportan resultados beneficiosos asociados a la administración de probióticos en terneros entre los que se destacan: disminución de la incidencia y severidad de la DNT y mejora de la salud en general (Signorini et al., 2012; Timmerman et al., 2005), aumento en la tasa de crecimiento, mayor eficiencia en el aprovechamiento del alimento y ganancia en peso (Lesmiester et al., 2004; Cruywagen et al., 1995; Timmerman et al., 2005), aumento en la producción (Berg, 1998) y mejor efecto profiláctico sobre la DNT en comparación con antibióticos (Kim et al., 2011).

4.7.- Mecanismo de acción de los probióticos:

Aunque varias investigaciones *in vivo* han comprobado los efectos beneficiosos de las cepas probióticas, no están claramente comprendidos los mecanismos de acción que sustentan estos beneficios. Se han propuesto varias hipótesis al respecto, basadas fundamentalmente en datos *in vitro* entre las que se incluyen (Collins, 1999; Isolauri et al., 2001; Bernet-Camard et al., 1997):

- 1) Son capaces de impedir la adhesión de las bacterias patógenas a la mucosa intestinal por bloqueo del sitio de unión o mediante obstrucción estérica.
- 2) Compiten con los patógenos por los nutrientes en el intestino.
- 3) Producen sustancias antimicrobianas como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, capaces de reducir el número de patógenos, afectando su metabolismo bacteriano o la producción de toxinas.
- 4) Disminuyen el pH intestinal debido fundamentalmente a la producción de ácidos orgánicos, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas.
- 5) Modulan el sistema inmunológico de la mucosa intestinal a través del control del balance de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, manteniendo un estado de “inflamación controlada” generando respuestas moderadas, constantes y sin causar daño al hospedero, en contraposición a las respuestas generadas por microorganismos patógenos las cuales se caracterizan por ser exageradas y perjudiciales.

4.8.- Microorganismos utilizados como probióticos

La mayoría de los microorganismos utilizados como probióticos tanto en animales como en humanos, pertenecen a un gran grupo de bacterias denominadas bacterias del ácido láctico (BAL), representado por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común (Axelsson, 2004). Las BAL han sido utilizadas en la industria alimentaria de forma segura durante siglos para elaborar productos fermentados, así como también mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos (Olivera, 2011).

En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporuladas, usualmente no móviles, microaerofílicas hacia la anaerobiosis, oxidasa y catalasa negativas. Una de las formas en las que se puede clasificar a las BAL, es en base a los productos generados durante la fermentación de los carbohidratos (Axelsson, 2004; Abdelaziz y Mubarak, 2010). El grupo llamado homofermentativo, produce ácido láctico como principal producto en el proceso. Dentro de este grupo se incluyen los géneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, y la mayoría de las especies de *Lactobacillus*. Por otro lado, el grupo llamado heterofermentativo, no sólo genera ácido láctico en el proceso, sino también otros productos, como acetato, etanol y CO₂. Dentro de este grupo se destacan los géneros: *Leuconostoc*, y algunos *Lactobacillus* (Olivera, 2011). Las bifidobacterias y las levaduras del género *Sccharomyces*, son también comúnmente empleados como probióticos, pero éstos no se incluyen dentro del grupo de las BAL (Axelsson, 2004; Perelmuter et al., 2008).

En particular los lactobacilos son considerados excelentes candidatos para ser utilizadas como probióticos, ya que son de carácter no patogénicos, inocuos, estables y viables, resistentes a cambios de pH, producen ácido láctico y otras sustancias antimicrobianas como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Zamudio y Zavaleta, 2003), y son componentes importantes de la microbiota intestinal de los seres humanos y de la mayoría de los animales (Endo et al., 2010; Soto et al., 2009; Vlkova et al., 2006). Se caracterizan por ser bacterias Gram positivas, cuya morfología varía desde largos y delgados bastones a cocobacilos. Se presentan comúnmente formando cadenas y en general son no móviles y no esporulados. Las colonias típicas de los lactobacilos en medios sólidos, por lo general son pequeñas, blanco-grisáceas, lisas o rugosas, con aspecto circular, convexas y de margen entero. Son oxidasa y catalasa negativas. Su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas, y a temperaturas de entre 30-40°C. Son microorganismos exigentes nutricionalmente. La mayoría de los especies son homofermentativas, aunque también existen especies heterofermentativas (Axelsson, 2004; Prasirtsaka et al., 2013). Son ampliamente reconocidos por sus efectos beneficiosos entre los que se destacan, mantener el adecuado equilibrio de la microbiota intestinal, inhibición de la colonización de bacterias patógenas y mejora del sistema inmune del huésped (Ripamonti et al., 2011).

5.- HIPÓTESIS:

Cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de heces de terneros sanos al pie de la madre, pueden ser candidatas para su utilización como probióticos en sistemas semi-intensivos e intensivos en Uruguay.

6.- OBJETIVOS:

6.1. - Objetivo general:

El objetivo general de este trabajo fue evaluar, mediante técnicas *in vitro*, el potencial probiótico de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de heces de terneros sanos al pie de la madre, para ser administradas a terneros en sistemas semi-intensivos e intensivos, con el fin de prevenir la diarrea neonatal en Uruguay.

6.2.- Objetivos específicos:

- 1) Evaluar la resistencia a pH ácido y a sales biliares de las diferentes cepas de *Lactobacillus*spp.
- 2) Evaluar la capacidad de las cepas de *Lactobacillus* spp. de inhibir el crecimiento de patógenos potencialmente implicados en la DNT.
- 3) Evaluar la capacidad de formación de *biofilms* de las cepas de *Lactobacillus* spp.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS

7.1- Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.

Cepas	Género/especie
TP 1.1	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
TP 1.3A	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 1.3B	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 1.6	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 2.1	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
TP 3.1A	<i>Lactobacillus crispatus</i>
TP 3.1B	<i>Lactobacillus crispatus</i>
TP 4.1	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
TP 4.2	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 4.5	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
TP 4.6	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 4.7	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 4.8	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
TP 5.1B	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 5.2AA	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 5.2AB	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 5.2BA	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 5.3	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 5.6	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
TP 6.1	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 6.4A	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 6.6 A	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 6.7	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 6.8	<i>Lactobacillus johnsonii</i>

Continuación. **Tabla 1.** Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.

Cepas	Género/especie
TP 6.9	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
TP 6.10	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 6.11B	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
TP 6.12	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
TP 6.13	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
TP 7.1	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
TP 7.6	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
TP 8.2	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 8.6B	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
TP 8.7	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
TP 9.2	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 9.7	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 10.1	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 10.2	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 10.4	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 10.5	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 10.6	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 10.7	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 10.8	<i>Lactobacillus gasseri</i>
TP 10.9	<i>Lactobacillus mucosae</i>
TP 10.10	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 10.11	<i>Lactobacillus reuteri</i>
TP 10.13	<i>Lactobacillus reuteri</i>
3.PO1.1	<i>Lactobacillus reuteri</i>
3.PO1.10	<i>Lactobacillus reuteri</i>
3.PO1.11	<i>Lactobacillus reuteri</i>
1.223.9	<i>Lactobacillus reuteri</i>
2001.13	<i>Lactobacillus reuteri</i>
LbP2	<i>Lactobacillus murinus</i> (Perelmuter et al., 2008)
52.3	<i>Escherichia coli</i> (Umpiérrez et al., 2016)
61.1	<i>Escherichia coli</i> (Umpiérrez et al., 2016)
S.t	<i>Salmonella typhimurium</i> (Colección del Depto. de Microbiología, IIBCE).
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC ¹ 53103)

¹American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)

Las cepas de *Lactobacillus* spp. (excepto LGG y LbP2), fueron aisladas en instancias anteriores en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) a partir de heces de terneros sanos al pie de la madre de entre 1 y 6 meses de edad pertenecientes a 3 establecimientos ganaderos distintos de nuestro país, utilizando el medio de cultivo Mann Rogosa Sharpe agar (MRS). Los aislamientos que reunieron las características del género *Lactobacillus* en base a sus características morfológicas y bioquímicas: bacilos Gram (+), y pruebas de catalasa y oxidasa (-), fueron luego identificadas molecularmente mediante PCR amplificando un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S y posterior secuenciación y comparación del producto amplificado con las bases de datos Genbank y Ribosomal Data Base Project (RDP).

La cepa LbP2, corresponde a un aislamiento realizado a partir de materia fecal de perro (Perelmuter et al., 2008), mientras que la LGG es un aislado de intestino humano (ATCC 53103).

Las cepas de *E. coli* 52.3 y 61.1, fueron aisladas a partir de heces de terneros menores de 35 días en tambos lecheros de Colonia y Paysandú respectivamente, que presentaban un cuadro diarreico. Fueron analizadas molecularmente por nuestro grupo de laboratorio, encontrándose factores de virulencia asociados a la DNT (Umpiérrez et al., 2016).

S. typhimurium, es una cepa que pertenece a una colección del Departamento de Microbiología del IIBCE.

Los lactobacilos se cultivaron rutinariamente en medio Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) (En g/l de: peptona de caseína 10,0; extracto de carne 10,0; extracto de levadura 4,0; D (+)-glucosa 20,0; dipotasio hidrógenofosfato 2,0; Tween 80, 1,0; Diamonio hidrogenocitrato 2,0; sodio acetato 5,0; magnesio sulfato 0,2; manganeso sulfato 0,04; pH=5,7 ± 0,2 a 25°C) en forma de caldo o suplementado con agar (1,5% m/v) cuando se requirió el uso de medio sólido. La incubación se realizó a 37°C durante 24-48hs, en condiciones de microaerofilia o en anaerobiosis.

Para la conservación de los lactobacilos a largo plazo, se utilizó caldo MRS con un 20% de glicerol, a -80°C.

Las cepas de *E. coli* y *S. typhimurium*, se cultivaron en medio Brain Heart Infusión (BHI) (En g/l: infusión de cerebro 12,5; infusión de corazón de res 5,0; proteosa peptona 10,0; glucosa 2,0; cloruro de sodio 5,0; fosfato disódico 2,5; pH=7,4 ± 0,2 a 25°C) en forma de caldo o suplementado con agar (1,5% m/v) cuando se necesitaba el medio sólido. La incubación se realizó a 37°C durante 24-48hs, en condiciones de aerobiosis.

Para el ensayo de *biofilms*, las cepas fueron cultivadas en caldo TSB modificado (mTSB) que consistió en: 15g/l TSB (Tryptic Soy Broth) + 20g/l proteosa peptona.

TSB (en g/l: digerido pancreático de caseína 17,0; digerido enzimático de soja 3,0; cloruro de sodio 5,0; hidrógeno fosfato dipotásico 2,5; glucosa 2,5; pH= 7,3 ± 0,2 a 25 ° C).

Proteosa Peptona: digerido enzimático de proteína alta en proteosas. La incubación se realizó a 37°C durante 48hs, en condiciones estáticas y de microaerofilia.

7.2- Resistencia a pH ácido

Para evaluar la capacidad de las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. para sobrevivir en medios ácidos, se utilizó el procedimiento descrito por Maragkoudakis et al., 2006 con algunas modificaciones. Brevemente, cultivos *overnight* (18hs) de lactobacilos en caldo MRS se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos. El *pellet* obtenido, se lavó 2 veces con PBS (Phosphate-Buffered Saline) y se resuspendió en el mismo buffer para preparar suspensiones bacterianas de aproximadamente 6×10^8 ufc/ml. Posteriormente, 100µl de esa suspensión fueron inoculados en una placa de plástico de 96 pocillos, conteniendo 900µl de caldo MRS sin ajustar (pH=5,7) como control, y caldo MRS ajustado a pH=2,0 con HCl 5M, similar a las condiciones del pH gástrico. Finalmente la placa fue incubada a 37°C en microaerofilia durante 2hs.

Se realizó conteo de colonias bacterianas a tiempo 0 y luego de 2hs de incubación a pH=2 y a pH=5,7 por el método de recuento en placas de agar MRS. El ensayo se realizó por triplicado. Se utilizó como control la cepa LGG (*Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin).

La resistencia al medio ácido se estimó, al comparar el número de colonias bacterianas en agar MRS luego de 2hs de incubación en caldo MRS a pH=2, con respecto al número de colonias bacterianas en agar MRS al inicio del ensayo.

Cuando la diferencia entre el recuento obtenido a t=0hs y t=2hs fue menor a 2 órdenes de magnitud, las cepas se consideraron resistentes (R). Por el contrario, cuando la diferencia resultó mayor se las consideró sensibles (S).

7.3- Resistencia a sales biliares

La resistencia de las cepas de *Lactobacillus* spp. a sales biliares, fue evaluada según Maragkoudakis et al., 2006, con modificaciones.

Al igual que en el caso anterior, cultivos *overnight* (18hs) de lactobacilos en caldo MRS se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos. El *pellet* obtenido, se lavó 2 veces con PBS (Phosphate-Buffered Saline) y se resuspendió en el mismo buffer para preparar suspensiones bacterianas de aproximadamente 6×10^8 ufc/ml. Posteriormente, 100µl de esa suspensión fueron inoculados en una placa de 96 pocillos conteniendo 900µl de caldo MRS ajustado a pH=7,0 con NaOH 5M sin sales biliares como control, y caldo MRS ajustado a pH=7,0 suplementado con 0,3% de sales biliares (Sigma Aldrich, Missouri, EE.UU.). Finalmente la placa fue incubada a 37°C en microaerofilia durante 4hs.

Se realizó conteo de colonias bacterianas a t=0hs y luego de 4hs de incubación a pH=7 con el agregado de sales biliares, al igual que el control, por el método de recuento en placas de agar MRS. El ensayo se realizó por triplicado. Se utilizó como control la cepa LGG (*Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin).

La resistencia a sales biliares se estimó, al comparar el número colonias bacterianas en agar MRS luego de la incubación con 0,3% de sales biliares durante 4hs, con respecto al número de colonias bacterias en agar MRS al inicio del ensayo (t=0hs).

Al igual que en el ensayo anterior, cuando la diferencia entre el recuento obtenido a t=0hs y t=4hs fue menor a 2 órdenes de magnitud, las cepas se consideraron resistentes (R). Por el contrario, cuando la diferencia fue mayor se las consideró sensibles (S).

7.4- Actividad antimicrobiana

Con el fin de evaluar la capacidad de las diferentes cepas de lactobacilos para inhibir el crecimiento de *E.coli* y *S.typhimurium* (patógenos bacterianos aislados de terneros con DNT), se utilizó la técnica “spot on the lawn” (gota sobre la superficie), según el procedimiento descrito por Jacobsen et al., 1999, con modificaciones.

Brevemente, cultivos *overnight* (18hs) de lactobacilos en caldo MRS se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 x g. El sedimento bacteriano obtenido, se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en caldo MRS para preparar suspensiones bacterianas de aproximadamente 6×10^7 ufc/ml.

Posteriormente se sembró una gota de 2µl de la suspensión sobre placas de petri conteniendo 15 ml de agar MRS, las que fueron luego incubadas durante 24hs a 37°C en condiciones de microaerofilia.

Trascurrido ese tiempo, y una vez que se observó crecimiento microbiano, se cubrió la placa crecida con 8ml de agar BHI soft (0,8%) inoculado con 100µl de un cultivo *overnight* del patógeno indicador en caldo BHI. Una vez solidificada esta segunda capa, se procedió a incubar las placas nuevamente a 37°C durante 48hs en microaerofilia, para permitir el crecimiento de las cepas patógenas. Luego de la incubación se midieron los halos de inhibición. La actividad antimicrobiana se verificó, por la presencia de zonas sin crecimiento alrededor de las colonias de lactobacilos. El ensayo se realizó por triplicado. La cepa (LbP2) *Lactobacillus murinus* fue utilizada como control positivo (Perelmuter et al., 2008).

7.5- Formación de *biofilms*

La capacidad formadora de *biofilms* de las cepas de *Lactobacillus* spp., fue evaluada según el procedimiento descrito por Lebeer et al., 2007 con algunas modificaciones.

Primeramente se centrifugaron cultivos *overnight* (18hs) de *Lactobacillus* spp. en caldo MRS durante 10 minutos a $10.000 \times g$. El sedimento bacteriano obtenido, se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en caldo mTSB (15g/l TSB + 20g/l Proteosa Peptona) para preparar suspensiones bacterianas de aproximadamente 6×10^7 ufc/ml. Posteriormente, se tomaron 200 μ l de esa suspensión, y se transfirieron a una microplaca de poliestireno de 96 pocillos, la cual fue incubada en estufa a 37°C durante 48hs en condiciones estáticas y de microaerofilia.

Para cuantificar la producción de *biofilms*, primeramente se retiró el medio junto con las bacterias no adheridas y se realizaron dos lavados con PBS. Las bacterias adheridas a la placa, fueron teñidas con 200 μ l de cristal violeta (filtrado) durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, se retiró el colorante y se lavó el exceso 2 veces con PBS, hasta no observarse color en el líquido de enjuague y se dejó secar la placa al aire durante 30 min. Finalmente, el cristal violeta asociado al *biofilm* se disolvió con 200 μ l de etanol 95% y se midió inmediatamente la densidad óptica (DO) de cada pocillo a 570nm en el espectrofotómetro de placas Varioskan Flash Plate Reader disponible en el IIBCE. Cada cepa fue evaluada en 2 experimentos independientes por triplicado.

Como control negativo, se utilizó medio mTSB estéril y como control positivo fue utilizada la cepa 4.8 (*Lactobacillus amylovorus*) ya que la misma demostró tener la capacidad de formar fuertes *biofilms* cuando se puso a prueba en todos los ensayos.

Las cepas fueron clasificadas en las siguientes categorías basadas en la DO, siguiendo el criterio de Stepanovic et al., 2000 :

Punto de corte (DOc)= media del control negativo más tres desvíos estándar.

$$DOc = 0,13 + 3(0,039) = 0,2$$

$DO \leq DOc$	}	$DO \leq 0,2$	No formador de <i>biofilms</i>
$DOc < OD \leq 2 \times ODc$		$0,2 < DO \leq 0,5$	Formador débil de <i>biofilms</i>
$2 \times ODc < OD \leq 4 \times DOc$		$0,5 < DO \leq 1$	Formador moderado de <i>biofilms</i>
$4 \times DOc < OD$		$1 < DO$	Formador fuerte de <i>biofilms</i>

8.- RESULTADOS

8.1- Resistencia a pH ácido

En la **Tabla 2**. Se muestran los recuentos bacterianos correspondientes a las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. expresados como \log_{10} ufc/ml (media y desvío estándar de triplicados) a tiempo 0hs y luego de 2hs de incubación en caldo MRS a pH=2,0 y la diferencia entre dichos recuentos.

A modo de control, se registran los recuentos bacterianos luego de 2hs de incubación en caldo MRS a pH=5,7.

Tomando en cuenta el criterio establecido anteriormente, de las 52 cepas de lactobacilos evaluadas, 45 resultaron ser resistentes (R) a pH=2 durante 2hs, representando el 87 % del total. Solo 7 cepas (13%) resultaron ser sensibles (S), al igual que la cepa LGG utilizada como control. Dentro del grupo de las cepas resistentes (R), se destaca la cepa 6.13 (*Lactobacillus johnsonii*) cuyo recuento luego de 2hs se redujo solo 0,08 órdenes de magnitud con respecto al recuento inicial.

En el medio MRS sin modificar (pH=5,7), todas las cepas bacterianas mantuvieron su crecimiento en el rango de 10^6 - 10^7 ufc/ml luego de 2hs de incubación.

Tabla 2. Resistencia a pH ácido de las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp.

CEPAS n=53	Recuentos t=0hs \log_{10} (ufc/ml) MRS pH=2,0	Recuentos t=2hs \log_{10} (ufc/ml) MRS pH=2,0	(Recuentos t=0hs- Recuentos t=2hs) MRS pH=2,0	Recuentos t=2hs \log_{10} (ufc/ml) MRS pH=5,7 (control)
1.1 (R)	6.18 ± 0,07	5.71 ± 0,03	0.47 ± 0.10	6.30
1.3A (R)	6.99 ± 0,01	5.53 ± 0,05	1.46 ± 0,06	7.18
1.3B (S)	6.49 ± 0,01	3.81 ± 0,02	2.68 ± 0,03	6.48
1.6 (R)	6.14 ± 0,15	5.79 ± 0,05	0.35 ± 0.20	6.48
2.1 (R)	6.79 ± 0,01	5.32 ± 0,04	1.47 ± 0.05	6.78
3.1A (S)	6.77 ± 0,03	< 1.00 ± 0,00	>5.77 ± 0.03	6.70
3.1B (S)	6.35 ± 0,05	< 1.00 ± 0,00	>5.35 ± 0.05	6.48
4.1 (R)	6.47 ± 0,07	5.78 ± 0.07	0.69 ± 0.14	6.65
4.2 (R)	7.87 ± 0.01	7.00 ± 0.00	0.87 ± 0.01	7.92
4.5 (S)	6.28 ± 0.09	3.77 ± 0.07	2.51 ± 0.16	6.60
4.6 (S)	7.14 ± 0.06	4.25 ± 0.02	2.89 ± 0.08	7.26
4.7 (R)	6.83 ± 0.02	6.64 ± 0.02	0.19 ± 0.04	7.04
4.8 (S)	6.33 ± 0.06	4.00 ± 0.04	2.33 ± 0.10	6.58
5.1B (R)	7.31 ± 0.03	5.98 ± 0.02	1.33 ± 0.05	7.48
5.2AA (R)	7.53 ± 0.03	6.76 ± 0.01	0.77 ± 0.04	7.52
5.2AB (R)	7.39 ± 0.04	6.03 ± 0.02	1.36 ± 0.06	7.40
5.2BA (R)	7.90 ± 0.01	6.00 ± 0.00	1.90 ± 0.01	7.90

R= Resistente; S= Sensible

En negrita se destacan las cepas Resistentes

Continuación. **Tabla2.** Resistencia a pH ácido de las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp.

CEPAS	Recuentos t=0hs log ₁₀ (ufc/ml) MRS pH=2,0	Recuentos t=2hs log ₁₀ (ufc/ml) MRS pH=2,0	(Recuentos t=0hs- Recuentos t=2hs) MRS pH=2,0	Recuentos t=2hs log ₁₀ (ufc/ml) MRS pH=5,7 (control)
5.3 (R)	6.38 ± 0.07	6.07 ± 0.02	0.31 ± 0.09	6.48
5.6 (R)	6.41 ± 0.11	4.66 ± 0.06	1.75 ± 0.17	6.70
6.1 (S)	6.37 ± 0.10	3.75 ± 0.05	2.62 ± 0.15	6.58
6.4A (R)	7.72 ± 0.02	7.00 ± 0.00	0.72 ± 0.02	7.79
6.6A (R)	7.72 ± 0.02	7.00 ± 0.00	0.72 ± 0.02	7.83
6.7 (R)	6.91 ± 0.04	5.39 ± 0.13	1.52 ± 0.17	6.97
6.8 (R)	6.06 ± 0.06	5.44 ± 0.14	0.62 ± 0.20	6.60
6.9 (R)	6.36 ± 0.10	4.76 ± 0.05	1.60 ± 0.15	6.70
6.10 (R)	6.38 ± 0.11	4.74 ± 0.09	1.64 ± 0.20	6.72
6.11B (R)	6.22 ± 0.05	5.76 ± 0.14	0.46 ± 0.19	6.26
6.12 (R)	6.46 ± 0.02	5.93 ± 0.02	0.53 ± 0.04	6.48
6.13 (R)	6.82 ± 0.02	6.74 ± 0.04	0.08 ± 0.06	6.88
7.1 (R)	6.26 ± 0.07	5.25 ± 0.01	1.01 ± 0.08	6.70
7.6 (R)	6.03 ± 0.02	5.40 ± 0.04	0.63 ± 0.06	6.00
8.2 (R)	6.14 ± 0.13	6.03 ± 0.02	0.11 ± 0.15	6.18
8.6B (R)	6.01 ± 0.02	4.78 ± 0.07	1.23 ± 0.09	6.20
8.7 (R)	6.48 ± 0.04	5.73 ± 0.05	0.75 ± 0.09	6.48
9.2 (R)	7.48 ± 0.03	6.99 ± 0.01	0.49 ± 0.04	7.48
9.7 (R)	7.21 ± 0.06	6.63 ± 0.03	0.58 ± 0.09	7.18
10.1 (R)	7.39 ± 0.04	7.03 ± 0.02	0.36 ± 0.06	7.45
10.2 (R)	7.24 ± 0.04	6.50 ± 0.01	0.74 ± 0.05	7.18
10.4 (R)	7.05 ± 0.02	6.23 ± 0.03	0.82 ± 0.05	7.00
10.5 (R)	7.13 ± 0.08	6.42 ± 0.02	0.71 ± 0.10	7.18
10.6 (R)	7.29 ± 0.03	6.42 ± 0.07	0.87 ± 0.10	7.40
10.7 (R)	7.50 ± 0.04	6.60 ± 0.11	0.90 ± 0.15	7.45
10.8 (R)	7.59 ± 0.03	6.71 ± 0.03	0.88 ± 0.06	7.54
10.9 (R)	7.56 ± 0.01	7.00 ± 0.00	0.56 ± 0.01	7.57
10.10 (R)	7.26 ± 0.05	6.48 ± 0.06	0.78 ± 0.11	7.30
10.11 (R)	7.12 ± 0.05	6.46 ± 0.02	0.66 ± 0.07	7.26
10.13 (R)	7.37 ± 0.06	6.36 ± 0.06	1.01 ± 0.12	7.40
3PO1.1 (R)	7.54 ± 0.01	6.79 ± 0.01	0.75 ± 0.02	7.53
3PO1.10 (R)	7.51 ± 0.03	6.96 ± 0.01	0.55 ± 0.04	7.53
3PO1.11 (R)	7.08 ± 0.07	6.09 ± 0.09	0.99 ± 0.16	7.23
1223.9 (R)	7.49 ± 0.06	6.98 ± 0.02	0.51 ± 0.08	7.60
2001.13 (R)	7.13 ± 0.11	6.09 ± 0.09	1.04 ± 0.20	7.30
LGG (S)	6.72 ± 0.02	<1.00 ± 0.00	>5.72 ± 0.02	6.72

R= Resistente; S= Sensible

En negrita se destacan las cepas Resistentes

8.2- Resistencia a sales biliares

En la **Tabla 3**. Se muestran los recuentos bacterianos correspondientes a las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. expresados como \log_{10} ufc/ml (media y desvío estándar de triplicados) a tiempo 0hs y luego de 4hs de incubación en caldo MRS a pH=7,0 suplementado con 0,3% de sales biliares, así como la diferencia de dichos recuentos.

A modo de control, se registran los recuentos bacterianos luego de 4hs de incubación en caldo MRS a pH=7,0 sin la suplementación con sales biliares.

Según el criterio establecido, de las 52 cepas de lactobacilos evaluados, 43 resultaron ser resistentes (R) en MRS a pH=7 suplementado con 0,3% de sales biliares durante 4hs, al igual que la cepa control (LGG), representando el 83 % del total. Solo 9 cepas (17%) resultaron ser sensibles (S).

Dentro del grupo de las cepas resistentes (R) se destaca la cepa 6.8 (*L. johnsonii*) cuyo recuento luego de 4hs se redujo solo 0,12 órdenes de magnitud con respecto al recuento inicial.

En el medio MRS a pH=7 sin sales biliares (control) todas las cepas bacterianas mantuvieron su crecimiento en el rango de 10^6 - 10^7 ufc/ml luego de 4hs de incubación.

Tabla 3. Resistencia a sales biliares de las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp.

Cepas n=53	Recuentos t=0hs \log_{10} (ufc/ml) MRS pH=7,0 + 0,30% de sales biliares	Recuentos t=2hs \log_{10} (ufc/ml) MRS pH=7,0 + 0,30% de sales biliares	(Recuentos t=0hs – Recuentos t=4hs) MRS pH=7,0+0,30% de sales biliares	Recuentos t=4hs \log_{10} (ufc/ml)MRS pH=7,0 sin sales biliares (control)
1.1 (S)	7.12 ± 0.05	4.72 ± 0.07	2.40 ± 0.12	7.41
1.3A (R)	6.99 ± 0.01	5.49 ± 0.05	1.50 ± 0.06	7.56
1.3B (R)	6.51 ± 0.03	4.61 ± 0.03	1.90 ± 0.06	6.57
1.6 (S)	6.14 ± 0.13	4.05 ± 0.06	2.09 ± 0.19	6.48
2.1 (R)	7.11 ± 0.09	6.66 ± 0.03	0.45 ± 0.12	7.43
3.1A (S)	7.06 ± 0.08	<2.00 ± 0.00	>5.06 ± 0.08	7.26
3.1B (S)	6.13 ± 0.12	<2.00 ± 0.00	>4.13 ± 0.12	6.63
4.1 (R)	6.74 ± 0.06	5.80 ± 0.05	0.94 ± 0.11	7.20
4.2 (R)	7.80 ± 0.02	5.84 ± 0.03	1.96 ± 0.05	7.88
4.5 (S)	6.74 ± 0.04	<2.00 ± 0.00	>4.74 ± 0.04	6.85
4.6 (R)	7.16 ± 0.05	5.80 ± 0.02	1.36 ± 0.07	7.23
4.7 (R)	7.11 ± 0.09	6.10 ± 0.09	1.01 ± 0.18	7.48
4.8 (S)	6.95 ± 0.02	<2.00 ± 0.00	>4.95 ± 0.02	6.97
5.1B (R)	7.46 ± 0.03	6.97 ± 0.04	0.49 ± 0.07	7.75
5.2AA (R)	7.28 ± 0.06	6.91 ± 0.02	0.37 ± 0.08	7.48

R= Resistente; S= Sensible

En negrita se destacan las cepas Resistentes

Continuación **Tabla 3.** Resistencia a sales biliares de las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp.

Cepas	Recuentos t=0hs log ₁₀ (ufc/ml) MRS pH=7,0 + 0,30% de sales biliares	Recuentos t=4hs log ₁₀ (ufc/ml) MRS pH=7,0 + 0,30% de sales biliares	(Recuentos t=0hs- Recuentos t=4hs) MRS pH=7,0+ 0,30% de sales biliares	Recuentos t=4hs log ₁₀ (ufc/ml)MRS pH=7,0 sin sales biliares
5.2AB (R)	7.09 ± 0.08	6.57 ± 0.06	0.52 ± 0.14	7.38
5.2BA (R)	7.78 ± 0.03	6.35 ± 0.05	1.43 ± 0.08	7.74
5.3 (R)	6.79 ± 0.07	6.00 ± 0.10	0.79 ± 0.17	6.88
5.6 (S)	6.87 ± 0.02	<2.00 ± 0.00	>4.87 ± 0.02	6.93
6.1 (R)	6.82 ± 0.02	5.71 ± 0.03	1.11 ± 0.05	6.86
6.4A (R)	7.73 ± 0.02	7.55 ± 0.07	0.18 ± 0.09	7.93
6.6A (R)	7.83 ± 0.02	7.31 ± 0.06	0.52 ± 0.08	7.90
6.7 (R)	7.86 ± 0.02	7.08 ± 0.07	0.78 ± 0.09	7.93
6.8 (R)	7.13 ± 0.05	7.01 ± 0.03	0.12 ± 0.08	7.46
6.9 (R)	7.66 ± 0.03	7.10 ± 0.08	0.56 ± 0.11	7.76
6.10 (R)	7.23 ± 0.05	6.83 ± 0.02	0.40 ± 0.07	7.34
6.11B (S)	6.41 ± 0.11	4.04 ± 0.07	2.37 ± 0.18	6.70
6.12 (R)	7.09 ± 0.05	6.29 ± 0.06	0.80 ± 0.11	7.48
6.13 (R)	6.90 ± 0.01	5.86 ± 0.04	1.04 ± 0.05	7.49
7.1 (R)	7.17 ± 0.09	6.71 ± 0.06	0.46 ± 0.15	7.52
7.6 (R)	6.26 ± 0.13	5.79 ± 0.02	0.47 ± 0.15	6.65
8.2 (R)	6.34 ± 0.04	5.85 ± 0.06	0.49 ± 0.10	6.45
8.6B (R)	6.10 ± 0.09	4.59 ± 0.10	1.51 ± 0.19	6.40
8.7 (R)	6.70 ± 0.02	6.22 ± 0.19	0.48 ± 0.21	7.70
9.2 (R)	7.62 ± 0.02	6.39 ± 0.09	1.23 ± 0.11	7.65
9.7 (R)	6.38 ± 0.07	5.08 ± 0.07	1.30 ± 0.14	6.63
10.1 (R)	7.62 ± 0.02	6.25 ± 0.07	1.37 ± 0.09	7.72
10.2 (R)	7.66 ± 0.02	6.69 ± 0.05	0.97 ± 0.07	7.70
10.4 (R)	7.35 ± 0.05	6.35 ± 0.05	1.00 ± 0.10	7.43
10.5 (R)	7.63 ± 0.03	6.38 ± 0.07	1.25 ± 0.10	7.65
10.6 (R)	7.38 ± 0.07	6.62 ± 0.03	0.76 ± 0.10	7.40
10.7 (R)	7.63 ± 0.02	6.70 ± 0.04	0.93 ± 0.06	7.66
10.8 (R)	6.95 ± 0.04	6.37 ± 0.13	0.58 ± 0.17	7.15
10.9 (S)	7.86 ± 0.02	5.16 ± 0.08	2.70 ± 0.10	7.98
10.10 (R)	7.78 ± 0.01	6.61 ± 0.03	1.17 ± 0.04	7.74
10.11 (R)	7.88 ± 0.01	6.40 ± 0.05	1.48 ± 0.06	7.90
10.13 (R)	7.69 ± 0.02	6.94 ± 0.02	0.75 ± 0.04	7.67
3PO1.1 (R)	7.41 ± 0.04	5.64 ± 0.04	1.77 ± 0.08	7.41
3PO1.10 (R)	7.46 ± 0.04	6.97 ± 0.01	0.49 ± 0.05	7.49
3PO1.11 (R)	7.37 ± 0.03	5.83 ± 0.02	1.54 ± 0.05	7.48
1223.9 (R)	7.83 ± 0.03	6.81 ± 0.03	1.02 ± 0.06	7.85
2001.13 (R)	7.64 ± 0.04	6.72 ± 0.06	0.92 ± 0.10	7.65
LGG (R)	7.63 ± 0.03	6.10 ± 0.09	1.53 ± 0.12	7.63

8.3- Actividad antimicrobiana

Todas las cepas de *Lactobacillus* spp. exhibieron actividad antimicrobiana contra las cepas de *E.coli* y *S.typhimurium*, dando lugar a halos de inhibición de diversos tamaños (**Tabla.4**).

Las cepas de *L. reuteri* 1.3B, 4.2, 5.1B, 5.2AA, 6.4A, 3PO1.1, 3PO1.10, 3PO1.11 y 2001.13 (seleccionadas en negrita) fueron las que presentaron los mayores halos de inhibición frente a los 3 patógenos empleados.

En términos generales fue posible observar que nuestras cepas ejercieron un mayor efecto inhibitorio sobre el patógeno *S. typhimurium* (en promedio 19 ± 6 mm) que sobre las cepas de *E.coli* 52.3 y 61.1 (en promedio 15 ± 4 mm).

Tabla 4: Actividad antimicrobiana *in vitro* de las cepas de *Lactobacillus* spp. frente a microorganismos patógenos. Se presentan los diámetros (en mm) del halo de inhibición (media y desvío estándar de triplicados).

Cepas	<i>E.coli</i> 52.3	<i>E.coli</i> 61.1	<i>S.typhimurium</i>
1.1	17 ± 2	17 ± 1	27 ± 4
1.3A	13 ± 1	15 ± 3	18 ± 1
1.3B	23 ± 2	30 ± 1	16 ± 3
1.6	15 ± 1	12 ± 3	21 ± 4
2.1	14 ± 2	19 ± 1	26 ± 3
3.1A	16 ± 0	18 ± 2	24 ± 5
3.1B	13 ± 0	14 ± 6	22 ± 3
4.1	11 ± 1	11 ± 1	9 ± 1
4.2	25 ± 1	19 ± 1	25 ± 4
4.5	12 ± 2	15 ± 4	25 ± 4
4.6	10 ± 0	10 ± 1	10 ± 1
4.7	11 ± 1	13 ± 1	11 ± 1
4.8	13 ± 1	12 ± 2	24 ± 3
5.1B	28 ± 0	17 ± 2	22 ± 8
5.2AA	21 ± 3	17 ± 3	18 ± 2
5.2AB	19 ± 2	14 ± 1	28 ± 5
5.2BA	16 ± 2	17 ± 1	16 ± 1
5.3	14 ± 2	13 ± 2	14 ± 0
5.6	11 ± 1	18 ± 2	11 ± 1
6.1	15 ± 2	16 ± 2	11 ± 0
6.4A	23 ± 1	22 ± 2	23 ± 2
6.6A	16 ± 5	15 ± 5	23 ± 4
6.7	15 ± 2	7 ± 1	11 ± 1
6.8	9 ± 1	15 ± 1	16 ± 0

En negrita se destacan las cepas que presentaron los mayores halos de inhibición.

Continuación **Tabla 4**: Actividad antimicrobiana *in vitro* de las cepas de *Lactobacillus* spp. frente a microorganismos patógenos. Se presentan los diámetros (en mm) del halo de inhibición (media y desvío estándar de triplicados)

Cepas	<i>E.coli</i> 52.3	<i>E.coli</i> 61.1	<i>S.typhimurium</i>
6.9	12 ± 1	14 ± 1	16 ± 1
6.10	15 ± 1	15 ± 2	11 ± 2
6.11B	16 ± 1	14 ± 1	18 ± 2
6.12	15 ± 1	15 ± 1	25 ± 6
6.13	11 ± 1	15 ± 1	21 ± 1
7.1	14 ± 2	15 ± 1	20 ± 2
7.6	14 ± 1	12 ± 2	21 ± 2
8.2	11 ± 1	16 ± 2	17 ± 1
8.6B	13 ± 2	16 ± 2	16 ± 0
8.7	17 ± 1	14 ± 1	24 ± 6
9.2	13 ± 2	18 ± 1	17 ± 1
9.7	12 ± 3	13 ± 2	15 ± 1
10.1	12 ± 0	11 ± 1	16 ± 3
10.2	13 ± 1	11 ± 2	18 ± 1
10.4	12 ± 1	12 ± 2	14 ± 2
10.5	16 ± 1	15 ± 1	29 ± 2
10.6	15 ± 1	12 ± 1	20 ± 0
10.7	10 ± 1	11 ± 2	16 ± 2
10.8	12 ± 2	10 ± 1	11 ± 2
10.9	11 ± 1	10 ± 1	15 ± 1
10.10	16 ± 0	16 ± 0	26 ± 3
10.11	10 ± 0	12 ± 0	11 ± 4
10.13	10 ± 0	13 ± 2	15 ± 1
3PO1.1	20 ± 3	23 ± 1	26 ± 4
3PO1.10	23 ± 2	23 ± 6	22 ± 3
3PO1.11	19 ± 2	14 ± 1	32 ± 3
1223.9	15 ± 3	15 ± 2	28 ± 4
2001.13	18 ± 3	31 ± 3	25 ± 9
LbP2	23 ± 1	28 ± 3	29 ± 1

En negrita se destacan las cepas que presentaron los mayores halos de inhibición.

8.4- Cuantificación de la formación de *biofilms*:

En este ensayo, los resultados fueron muy variables entre las diferentes cepas de lactobacilos (**Fig. 5**).

De las 52 cepas estudiadas 19 fueron no formadoras de *biofilms* (37%), mientras que 33 cepas resultaron ser formadoras de *biofilms* (63%). Dentro de este grupo se registraron 9 formadoras fuertes de *Biofilms* (17%), 14 formadoras moderadas (27%) y 10 formadoras débiles (19%).

Dentro del grupo de formadoras fuertes de *Biofilms* se destaca la cepa 4.6 (*Lactobacillus gasseri*) con el mayor valor de Absorbancia a 570nm (2,00 UA).

Abs (570nm)

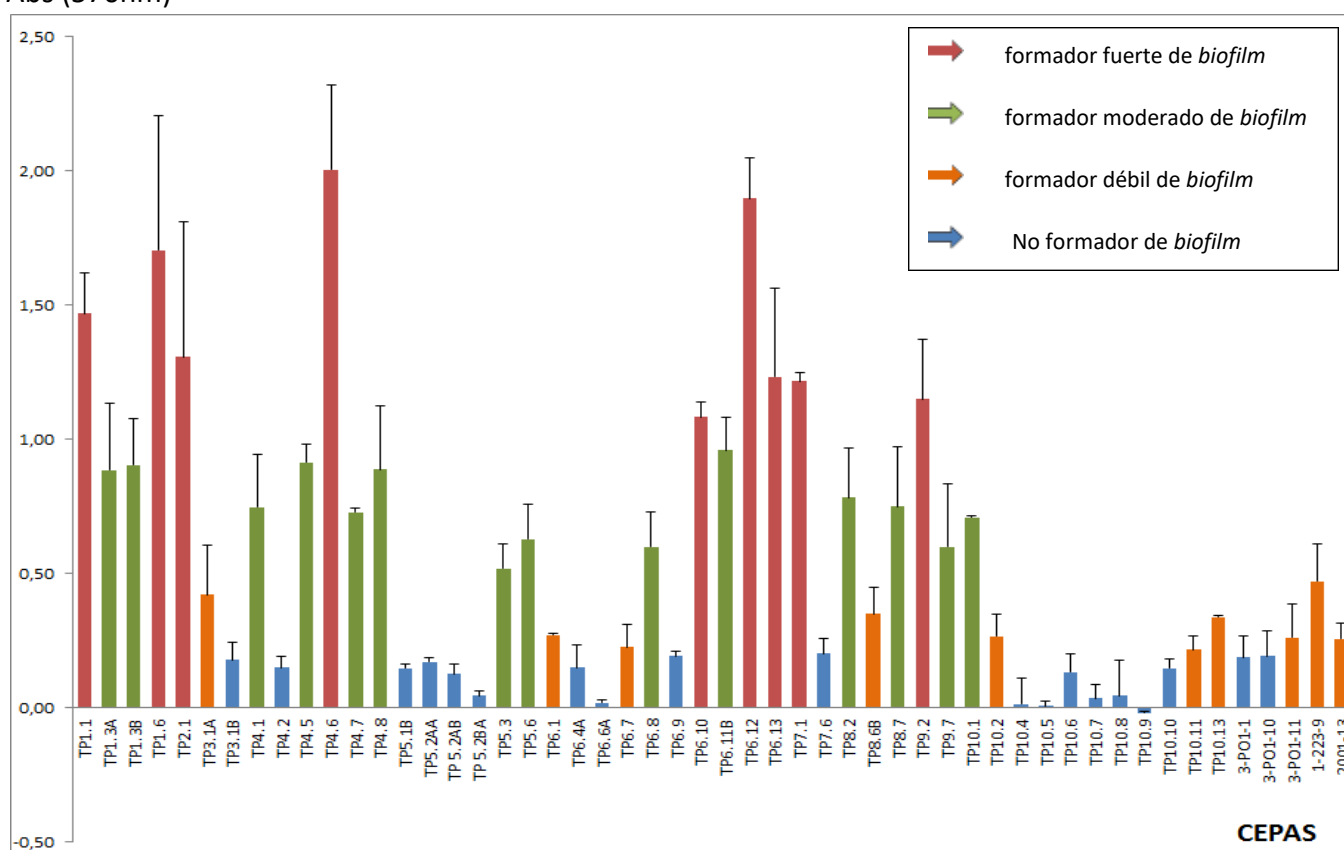


Figura 5. Cuantificación de la formación de *biofilms* de las cepas de lactobacilos.

(Se presenta la Abs promedio de 2 experimentos independientes por triplicado de las diferentes cepas de lactobacilos y sus respectivas desviaciones estándar).

9.- DISCUSIÓN

En los últimos años el uso de probióticos se ha convertido en una alternativa prometedora para disminuir la utilización de antibióticos para mejorar la salud animal y el desempeño productivo. La mayoría de las cepas que han sido caracterizadas como posibles candidatas para uso probiótico tanto en animales como en humanos, pertenecen al género *Lactobacillus* (Ripamonti et al., 2011; Perelmuter et al., 2008; Bujnakova et al., 2014; Maldonado et al., 2012; Jacobsen et al., 1999). Por lo tanto, en el presente trabajo se procuró realizar una evaluación parcial *in vitro* de un conjunto de cepas de lactobacilos aisladas de materia fecal de terneros sanos al pie de la madre, con el objetivo de seleccionar las mejores candidatas para uso probiótico de manera de prevenir la diarrea neonatal de los terneros en Uruguay.

9.1- Resistencia a pH ácido

El primer obstáculo que deben superar los candidatos a probióticos antes de llegar al intestino es la acidez producida por el estómago. Se ha reportado que el pH del cuajar del ternero se encuentra entre 2 a 2,8 durante el ayuno (Quintero, 2007) y el tiempo que demora un alimento en el cuajar durante la digestión gástrica es de aproximadamente 1h y 30 minutos sobre todo cuando el alimento ingerido es líquido (Maldonado y Nader-Macías, 2015). Por lo tanto, en el presente trabajo, se evaluó la capacidad de las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. de sobrevivir a un pH 2, durante 2hs. Exponer a las bacterias a este pH es considerado un criterio de selección drástico para las células, ya que varios estudios revelan que muchas especies de lactobacilos son totalmente resistentes a pH de 4,6 pero a valores de pH más bajos sobre todo cuando son expuestos a pH=2, disminuyen considerablemente su viabilidad (De Angelis et al., 2006; Rondón et al., 2008; Hood y Zottola, 1988; Prasad et al., 1998). No obstante, constituye un criterio de selección importante ya que el pH del cuajar del ternero puede llegar a ese valor.

Sin embargo, de las 52 cepas evaluadas en este estudio, 45 fueron resistentes (R) y solo 7 fueron sensibles (S) a la exposición a pH=2 durante 2hs. Cabe destacar que dentro del grupo de las cepas resistentes, 32 registraron una disminución en los recuentos menor a 1 orden de magnitud con respecto al recuento inicial (**Tabla.2**), con lo cual las convierte en candidatas potenciales para su utilización como probióticos. Los resultados de este estudio son comparables con los obtenidos por cepas de lactobacilos aisladas a partir de heces de cerdo en las que se registraron valores altos de supervivencia bacteriana luego de la exposición a pH=2,0 durante 90 minutos ($10 \log_{10}$ ufc/ml t=0hs - $9,8 \log_{10}$ ufc/ml, t=2hs); (De Angelis et al., 2006). También coinciden con los obtenidos en

un estudio en el que fueron analizadas cepas de lactobacilos en condiciones similares a las nuestras aisladas de alimentos fermentados y de intestino humano (Ren et al., 2014).

En nuestro trabajo la cepa LGG utilizada como control, no se logró recuperar luego de la incubación a pH=2 durante 2hs, lo cual fue observado también por otros autores (Li et al., 2016; Singh et al., 2012). Se ha reportado que esta cepa suele crecer en intervalos de pH=3 a 7,0 durante 4hs, pero no es capaz de crecer a pH menores a 3 (Li et al., 2016).

Uno de los principales mecanismos por los cuales los lactobacilos logran resistir a medios ácidos, es por la utilización de bombas de extracción de protones F1F0-ATPasas cuya función es remover protones del medio intracelular de manera de establecer la homeostasis del pH interno. La cantidad de protones transportados por los diferentes lactobacilos depende de la cantidad de F1F0-ATPasas, cuanto mayor sea el número de estas enzimas y más bajo su pH óptimo, más resistente será el microorganismo (Corcoran et al., 2005; Cotter y Hill, 2003).

En nuestro estudio fue posible observar diferentes tolerancias a ácidos entre especies y aún entre cepas de la misma especie (**Tabla 2**), lo que confirma que los mecanismos involucrados en la capacidad de supervivencia en medios ácidos son variables y dependientes de cada cepa.

La matriz de los alimentos consumidos junto con los probióticos pueden tener un efecto protector en la viabilidad de la cepas durante su exposición al medio ácido del estómago (Valerio et al., 2006). En una investigación se demostró, que cuando se adicionaba leche desnatada reconstituida al medio con pH ácido, la resistencia de las bacterias aumentaba considerablemente, mientras que cuando no se adicionaba leche, la supervivencia bacteriana era relativamente baja. Los autores consideraron que este efecto era el resultado del aumento del pH a causa del agregado de leche o al efecto protector de su matriz (De Angelis et al., 2006). En nuestro estudio los resultados fueron muy alentadores aún sin tener en cuenta este punto en el ensayo *in vitro*, pero de suma importancia para determinar cuan capaces son de resistir aún en condiciones extremas.

9.2- Resistencia a sales biliares

Otro obstáculo que deben superar los candidatos a probióticos en el tracto intestinal es la secreción de sales biliares en el duodeno. Estos compuestos, se caracterizan por ser moléculas anfipáticas cuya función es emulsificar y solubilizar los lípidos de la dieta para que puedan ser absorbidos a través de la mucosa intestinal, pero también actúan como potentes agentes antimicrobianos sobre la población bacteriana, fundamentalmente sobre bacterias Gram positivas. Disgregan las membranas lipídicas, desnaturalizan proteínas, acidifican el medio intracelular y pueden causar estrés oxidativo en el ADN a través de la generación de radicales libres de oxígeno (Begley et al., 2005).

Hay poca información disponible sobre la tolerancia de las bacterias Gram negativas a las sales biliares, pero se cree que son más resistentes que las bacterias Gram positivas porque cuentan con una membrana externa rica en lipopolisacáridos que actúan como barrera frente a estos agentes (Begley et al., 2005).

Las concentraciones fisiológicas relevantes de sales biliares a tomar en cuenta en el intestino, van de 0,10 a 0,30 % m/v (Bujnakova et al., 2014). Varios autores consideran que 0,30 % es la concentración adecuada para la selección de bacterias probióticas para terneros (Bujnakova et al., 2014; Sánchez et al., 2015; Ripamonti et al., 2011). Por lo tanto en nuestro trabajo se sometieron a las cepas de lactobacilos a esta concentración de sales biliares durante 4hs. Luego de la incubación, 43 cepas fueron resistentes en comparación con la cepa control (LGG) y solo 9 fueron sensibles de un total de 52 (**Tabla 3**). Dentro del grupo de las cepas resistentes se registraron altos índices de supervivencia, obteniéndose en 24 de ellas valores de resistencia menor a 1 orden de magnitud con respecto al recuento inicial, por lo cual estas cepas podrían ser candidatas potenciales para su utilización como probióticos. Cabe destacar que las cepas utilizadas en este trabajo fueron aisladas a partir de heces de terneros sanos por lo que se supone que ya han sido adaptadas a las condiciones del tracto gastrointestinal por lo que no es sorprendente que resistan y que se hayan obtenido altos índices de resistencia a pH ácido y a sales biliares.

Nuestros resultados son comparables con los de un estudio realizado en iguales condiciones que las nuestras sobre cepas aisladas de intestino de terneros y pollos (Bujnakova et al., 2014).

Se pudieron observar distintos valores de tolerancia a sales biliares entre diferentes especies de lactobacilos y aún entre cepas de la misma especie, lo cual fue observado también por otros autores (Lankaputhra, 1995; Maldonado y Nader-Macías, 2015). Esto sugiere que los mecanismos de resistencia a sales biliares son también variables entre especies y cepas. Estos mecanismos no ha sido completamente dilucidados pero se cree que cumplen un rol importante en su resistencia, las bombas de extracción de sales biliares, enzimas hidrolasas de sales biliares, cambios en la arquitectura/composición de la membrana celular y la pared celular (Ruiz et al., 2013).

La supervivencia de los lactobacilos puede verse favorecida *in vivo* al ser consumidos junto con un alimento, ya que las bacterias quedarían menos expuestas a las sales biliares (Sánchez et al., 2015). Por otro lado, se sabe que estos compuestos forman micelas con lípidos de la dieta por lo que su actividad antibacteriana podría ser menor que en las soluciones de sales biliares puras (Marteu et al., 1997). En nuestro estudio no fueron tomados en cuenta estos datos ya que el propósito fue evaluar la capacidad de supervivencia de los lactobacilos en condiciones extremas de manera de seleccionar las mejores cepas para uso probiótico.

9.3- Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana *in vitro* es una característica deseable en los probióticos, ya que permite inferir la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos *in vivo*.

Los patógenos seleccionados para realizar esta prueba fueron: *E.coli* debido a que es el principal agente implicado en la DNT en Uruguay y *S.typhimurium*, que aunque no tiene los índices más altos de prevalencia en nuestro país, una vez instalada la infección puede generar grandes pérdidas de mortalidad en los terneros debido a su carácter invasivo (Acuña et al., 2013).

Los resultados fueron alentadores ya que todas las cepas de lactobacilos evaluadas demostraron tener actividad antimicrobiana frente a los patógenos estudiados. Estos resultados son comparables con los obtenidos en una investigación en la que se evaluó la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas de materia fecal de terneros sobre diferentes patógenos, entre ellos *E.coli* y *Salmonella* spp. (Sánchez et al., 2015).

En nuestro estudio no se evaluó la naturaleza de las sustancias antagónicas que producen las cepas de lactobacilos, sin embargo en varias investigaciones se reporta que en esta actividad están involucrados compuestos tales como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas (Perlemuter et al., 2008; Rondón et al., 2008; De Angelis et al., 2006; Sánchez et al., 2015).

En términos generales las cepas de *L. reuteri* fueron las que presentaron los mayores halos de inhibición. Esto podría deberse a que estas cepas además de producir ácidos orgánicos, bacteriocinas y/o peróxido de hidrógeno como la mayoría de las especies de lactobacilos, son capaces de producir otro agente antimicrobiano, la reuterina, el cual se genera durante el metabolismo del glicerol. Este compuesto pudo haber actuado en sinergia con los demás agentes antimicrobianos potenciando de esta manera el efecto inhibitorio. La actividad antimicrobiana de la reuterina es extraordinariamente amplia, afectando patógenos potenciales como los utilizados en este estudio así como también *Clostridium*, *Listeria*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, levaduras, mohos y protozoos (Axelsson et al., 1989; Vásquez et al., 2009). Su amplio espectro de inhibición es debido a que su blanco es la enzima ribonucleotido reductasa que participa en la síntesis de ADN (Vásquez et al., 2009). Los ácidos orgánicos son otro de los principales compuestos según datos *in vitro* producidos en la actividad antimicrobiana por los lactobacilos (Perlemuter et al., 2008; Rondón et al., 2008; De Angelis et al., 2006; Sánchez et al., 2015). Estos compuestos además de actuar como potentes antimicrobianos disminuyen el pH intestinal creando un ambiente desfavorable para varios tipos de bacterias incluyendo *Salmonella* spp, *Escherichia coli* y *Campylobacter* sp (Rondón et al., 2008). La forma no disociada de los ácidos orgánicos debido a su naturaleza lipofílica, puede atravesar las membranas celulares y disociarse en el interior celular. El anión modifica el material genético y el catión acidifica el citoplasma. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma, se transportan hacia el exterior mediante bombas de protones por lo que las reservas energéticas de la célula disminuyen hasta agotarse, cuando esto ocurre, las bombas de protones dejan de funcionar por lo que el pH disminuye en el interior celular provocando desnaturalización de proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales, comprometiendo de este modo su viabilidad (Vásquez et al., 2009; Suskovic et al., 2010).

Otro de los componentes antimicrobianos secretados por los lactobacilos son las bacteriocinas, estas moléculas de naturaleza proteica son capaces de generar poros en las membranas de bacterias

sensibles originando la pérdida de iones K^+ , ATP y en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas, como consecuencia, disminuye el potencial de membrana, las reservas energéticas y la síntesis de ADN, ARN y proteínas, causando la muerte celular (Vásquez et al., 2009). Su blanco de acción es principalmente sobre bacterias Gram (+), incluyendo: *Lysteria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, entre otros (Balciunas et al., 2013). Aunque también se han registrado bacteriocinas que afectan bacterias Gram negativas tales como: *Pseudomonas*, *E.coli* y *Salmonella* (Ragazzo et al., 2009; Owusu et al., 2013).

Cuando el oxígeno está presente, los lactobacilos pueden producir metabolitos del oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos compuestos pueden oxidar los grupos sulfhídricos, causando la desnaturalización de enzimas y oxidar los lípidos de las membranas, aumentando su permeabilidad. Por otra parte el H_2O_2 puede ser un precursor para la producción de radicales libres que pueden atacar diversos componentes celulares, tales como: lípidos, proteínas y DNA de bacterias Gram (+), Gram (-) y levaduras (Vásquez et al., 2009). Sin embargo, el efecto del H_2O_2 podría ser menor sobre las bacterias patógenas utilizadas en este estudio ya que tanto la *S.typhimurium* como *E.coli*, son microorganismos catalasa positivos, capaces de descomponer el H_2O_2 en agua y oxígeno.

9.4- Cuantificación de la producción de *biofilms*

La capacidad de adherencia de las cepas a superficies inanimadas, puede proveer indicios para predecir su capacidad de adherirse *in vivo* (Perelmuter et al., 2008). Las bacterias que logran adherirse podrán formar microcolonias las cuales posteriormente darán lugar a un *biofilm* (Watnick y Kolter, 2000). Se han registrado en algunas investigaciones una correlación positiva entre la adherencia a las superficies bióticas y la formación de *biofilms* en superficies abióticas (Martin et al., 2008; Pompilio et al., 2010,2008), por lo tanto puede ser posible que las cepas evaluadas en nuestro estudio que presenten alta capacidad formadora de *biofilms* sobre las placas de poliestireno, tengan también la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.

El método utilizado en este estudio no solo nos permitió demostrar la existencia o ausencia de *biofilms*, sino también poder cuantificarlo mediante la medida de su densidad óptica (DO) para poder clasificar a las cepas, en formadoras fuertes, moderadas, débiles y no formadoras, de manera de poder seleccionar las mejores para ser utilizadas como probióticos.

Los resultados obtenidos fueron muy variables aún entre miembros de una misma especie, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Jones y Versalovic, 2009; Leeber et al., 2007).

Nueve cepas de las 52 evaluadas resultaron ser formadoras fuertes de *biofilms* lo cual las convierte en candidatas potenciales ya que podrían permanecer por más tiempo en el intestino y prolongar de esta manera su efecto beneficioso en el huésped.

En nuestro caso no se estudió la influencia de componentes relacionados con el ambiente intestinal sobre la producción de *biofilms*. Sin embargo, se ha reportado en ensayos *in vitro* que el pH, la osmolaridad, las sales biliares y las mucinas pueden modular la producción de *biofilms* (Leeber et al., 2007).

9.5- Cepas candidatas para ser utilizadas como probióticos:

Según nuestros resultados 24 de las 52 cepas evaluadas cumplieron con todos los criterios establecidos en éste trabajo para ser consideradas como probióticos (**Tabla 5**), ya que resistieron las condiciones establecidas en el tractogastrointestinal (TGI), formaron *biofilms* y demostraron tener actividad antimicrobiana frente a los patógenos de *E.coli* y *S.typhimurium*.

Tabla 5. Cepas candidatas a probióticos en el presente trabajo.

Cepas	Resistencia PH=2	Resistencia 0,30% S.biliares	Actividad antimicrobiana Vs <i>E. coli</i> 52.3	Actividad antimicrobiana Vs <i>E. coli</i> 61.1	Actividad antimicrobiana Vs <i>S.typhimurium</i>	<i>biofilms</i>
1.3A (<i>L. reuteri</i>)	1.46 ± 0.06	1.50 ± 0.06	13±1	15±3	18±1	Moderado
2.1 (<i>L. johnsonii</i>)	1.47 ± 0.05	0.45 ± 0.12	14±2	19±1	26±3	Fuerte
4.1 (<i>L. johnsonii</i>)	0.69 ± 0.14	0.94 ± 0.11	11±1	11±1	9±1	Moderado
4.7 (<i>L. gasseri</i>)	0.19 ± 0.04	1.01 ± 0.18	11±1	13±1	11±1	Moderado
5.3 (<i>L. gasseri</i>)	0.31 ± 0.09	0.79 ± 0.17	14±2	13±2	14±0	Moderado
6.7 (<i>L. gasseri</i>)	1.52 ± 0.17	0.78 ± 0.09	15±2	7±1	11±1	Débil
6.8 (<i>L. johnsonii</i>)	0.62 ± 0.20	0.12 ± 0.08	9±1	15±1	16±0	Moderado
6.10 (<i>L. gasseri</i>)	1.64 ± 0.20	0.40 ± 0.07	15±1	15±2	11±2	Fuerte
6.12(<i>L. amylovorus</i>)	0.53 ± 0.04	0.80 ± 0.11	15±1	15±1	25±6	Fuerte
6.13 (<i>L. johnsonii</i>)	0.08 ± 0.06	1.04 ± 0.05	11±1	15±1	21±1	Fuerte
7.1 (<i>L. johnsonii</i>)	1.01±0.08	0.46 ± 0.15	14±2	15±1	20±2	Fuerte
8.2 (<i>L. gasseri</i>)	0.11 ± 0.15	0.49 ± 0.10	11±1	16±2	17±1	Moderado
8.6B(<i>L. amylovorus</i>)	1.23 ± 0.09	1.51 ± 0.19	13±2	16±2	16±0	Débil
8.7 (<i>L. amylovorus</i>)	0.75 ± 0.09	0.48 ± 0.21	17±1	14±1	24±6	Moderado
9.2 (<i>L. reuteri</i>)	0.49 ± 0.04	1.23 ± 0.11	13±2	18±1	17±1	Fuerte
9.7 (<i>L. gasseri</i>)	0.58 ± 0.09	1.30 ± 0.14	12±3	13±2	15±1	Moderado
10.1 (<i>L. reuteri</i>)	0.36 ± 0.06	1.37 ± 0.09	12±0	11±1	16±3	Moderado
10.2 (<i>L. reuteri</i>)	0.74 ± 0.05	0.97 ± 0.07	13±1	11±2	18±1	Débil
10.11 (<i>L. reuteri</i>)	0.66 ± 0.07	1.48 ± 0.06	10±0	12±0	11±4	Débil
10.13 (<i>L. reuteri</i>)	1.01 ± 0.12	0.75 ± 0.04	10±0	13±2	15±1	Débil
3P01.11(<i>L. reuteri</i>)	0.99 ± 0.16	1.54 ± 0.05	19±2	14±1	32±3	Débil
1223.9 (<i>L. reuteri</i>)	0.51 ± 0.08	1.02 ± 0.06	15±3	15±2	28±4	Débil
2001.13 (<i>L. reuteri</i>)	1.04 ± 0.20	0.92 ± 0.10	18±3	31±3	25±9	Débil

10.- Conclusión y perspectivas

Dentro del grupo de las 24 cepas (**Tabla 5**) las mejores candidatas para ser utilizadas como probióticos en terneros bajo sistemas intensivos y semi-intensivos en Uruguay podrían ser las cepas: 6.12 (*L. amylovorus*), 2.1 (*L. johnsonii*), 7.1 (*L. johnsonii*), y 9.2 (*L. reuteri*) teniendo en cuenta su capacidad de resistencia a las condiciones del TGI, alta capacidad formadora de *biofilms* y significativa actividad antimicrobiana frente a los 3 patógenos estudiados.

Sin embargo, sería conveniente continuar con las pruebas *in vitro* para evaluar el potencial probiótico de las cepas. En particular, es importante que se determine la capacidad de adherencia bacteriana sobre células epiteliales y mucus intestinal, ya que se consideran requisitos fundamentales para estimar la colonización de las cepas en el intestino y la relación con su actividad probiótica.

11.- BIBLIOGRAFÍA

Abdelaziz, S. y Mubarak, M. (2010) Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Raw Cow Milk, White Cheese and Rob in Sudan. *Pakistan Journal of Nutrition*. **9**(12):1203-1206.

Acuña, P., Umpiérrez, A., Bengochea, V., Berois, M., Reolon, E., Zunino, P. (2013). Identificación de *Escherichia coli*, *Rotavirus* y *Coronavirus Bovino* asociado a la diarrea neonatal de los terneros en Uruguay. Póster presentado en XLI Jornadas de Buiatría. Paysandú. Uruguay.

Axelsson, L., Chung, T., Dobrogosz, W. y Lindgren, S. (1989) Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. **2**:131-136.

Axelsson, L. (2004) Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. editors. *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. 3rd Edition. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 1–66.

Balciunas, E., Castillo, F., Todorov, S., Franco, B., Converti, A., Pinheiro de Souza, R. (2013) Novel biotechnological application of bacteriocins: A review. *Food Control* **32**(1):134-142.

Begley, M., Gahan, C., Hill, C. (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**:625-651.

Berg, R. (1998) Probiotics, prebiotics or “conbiotics”? *Trends in Microbiol.* **6**:89-92.

Bernet-Camard, M., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J., Servin, A., Hudault, S. (1997) The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a non-bacteriocin antibacterial substance(s) active *in vitro* and *in vivo*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2747-2753.

Bilbao, G., Pinto de Almeida Castro, A., Badaracco, A., Rodríguez., Monteavaro, C., Parreño, V. (2012). Diarrea neonatal del ternero. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Buenos Aires, Argentina. Instituto de Virología, CICV y A-INTA, Buenos Aires, Argentina. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/bovinos_leche/70-diarrea.pdf.

Bilbao, G. Diarrea en los terneros: Pautas de manejo para reducir la mortandad en la gauchera. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Tandil. Buenos Aires. Disponible el 1/4/2013 en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/manejo/articulos/diarrea-terneros-pautas-manejo-t4776/124-p0.htm>.

Bujnakova, D., Strakova, E., Kmet, V. (2014) In vitro evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe*. **29**:118-127.

- Calsamiglia, S., Castillejos, L., Busquet, M.** (2005) Estrategias nutricionales para modificar la fermentación rumial en vacuno lechero. Depto. Ciencias Animales idels Aliments. **161**:1-25.
- Castro, L. y De Rovetto, C.** (2006) Probióticos: utilidad clínica. Colombia Médica. **37**(4):308-314.
- Collins, M., Gibson, G.** (1999) Probiotics, prebiotics, and symbiotic: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am. J. Clin. Nutr. **69**(5):1052-1057.
- Corcoran, B., Stanton, C., Fitzgerald, G y Ross, R.** (2005) Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. Applied and Environmental Microbiology. **71**(6): 3060–3067.
- Cotter, P., and Hill, C.** (2003) Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **67**(3):429–453.
- Cruywagen, C., Jordaan, I. y Venter, L.** (1995) Effect of lactobacillus acidophilus supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. J. Dairy Sci. **79**(3):483-486.
- De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A., Gobbetti, M.** (2006) Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. Research in Microbiology. **157**:792–801.
- Dean-Nystrom, E., Bosworth, B., Cray, W., Moon, H.** (1997) Pathogenicity of Escherichia coli O157:H7 in the intestines of neonatal calves. Infect Immun. **65**(5):1842–1848.
- Dertli, E., Mayer, M. y Narbad, A.** (2015) Impact of the exopolysaccharide layer on *biofilms*, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. BMC Microbiol. **15**(1):1-9.
- 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., Shanahan, F., Collins, J.** (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am. J. Clin. Nutr. **73**(suppl):386S-92S.
- Eckburg, P., Bik, E., Bernstein, C., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S., Nelson, k., Relman, D.** (2005) Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. Science. **308**(5728):1635-1638.
- Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Dicks, L.** (2010) Diversity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in feces of herbivores, omnivores and carnivores. Anaerobe. **16**(6):590-6.
- Falcón, N., Ortega, C., Gorniak, S., Villamil, L., Ríos, C., Simón, M.** (2009) El problema de la resistencia a antibióticos en salud pública. Grupo de trabajo: Residuos y Consecuencias del uso de Drogas en Medicina Veterinaria. Proyecto Sapuvetnet III: "Contribuyendo a los objetivos del milenio a través del concepto de Una salud". pp. 75-88.

FAO/WHO (2001) Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina. Disponible en: www.fao.org/3/a-a0512e.pdf.

Foster, C. (1997) Estudio Anatómico e Histopatológico de las Patologías Digestivas en terneros de crianza artificial muertos en el primer mes de vida. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia-Chile.84p.

Foster, D., Smith, G. (2009) Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet. Clin. North Am Food Anim Pract.* **25**(1):13-36.

García, M., López de Varona, Y Carcassés, A. (2012) Empleo de probióticos en los animales. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulos/empleo-probioticos-animales-t4125/165-p0.htm>.

Gómez, J., Gómez-Lus, M., Bas, P., Ramos, C., Cafini, F., Ramón, J., Prieto, J. (2013) ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? *Rev Esp Quimioter.* **26**(2):97-102.

Hood, S., Zottola, E. (1988) Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *Journal of Food Science.* **53**:1514-1516.

Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. (2001) Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr.* **73**(suppl):444S–50S.

Jacobsen, C., Rosenfeldt, N., Hayford, A., Moller, P., Michaelsen, K., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., Jakobsen, M. (1999) Screening of probiotics 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.

Jones, S. y Versalovic, J. (2009) Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. **9**(35): 1-9.

Kim, M., Lee, H., Park, J., Kang, S. y Choi, Y. (2011) Effect of feeding direct-fed microbial as an alternative to antibiotics for the prophylaxis of calf diarrhea in holstein calves. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.* **24** (5): 643-649.

Kleessen, B. and Blaut, M. (2005) Modulation of gut mucosal biofilms. *British Journal of Nutrition.* **93**(Suppl): S35–S40.

Lankaputhra, W. y Shah, N. (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products J.* **30**:2-7.

- Lasa, I., del Pozo, J., Penadés, R., Leiva, J.** (2005) *Biofilms* bacterianos e infección. An. Sist. Sanit. Navar. **28**(2):163-175.
- Lee, Y. y Salminen, S.** (2009) Handbook of probiotics and prebiotics . Second Edition. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, Nueva Jersey.
- Lebeer, S., Verhoeven, T., Perea, M., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.** (2007) Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. Appl. Environ. Microbiol. **73**:6768–6775.
- Lesmeister, K., Heinrichs, A. y Gabler, M.** (2004) Effects of supplemental yeast culture on rumen development, growth character and blood parameters in neonatal dairy calves. J. Dairy Sci. **87**(6):1832-1839.
- Li, R., Zhang, Y., Polk, B., Tomasula, P., Yan, F. y Liu, L.** (2016) Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG *in vitro* and *in vivo* by a new encapsulation system. J Control Release. Author manuscript. **230**: 79–87.
- Lorenz, I., Fagan, J. y More, S.** (2011) Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. Ir Vet J. **64**(9).
- Maldonado, N. y Nader-Macías, M.** (2015) Functional Properties (Acid and Bile Tolerance) and Antibiotic Susceptibility of Lactic Acid Bacteria Isolated from Newborn Calves for the Design of a Probiotic Product. Int J Vet Sci Res **1**(1): 011-022.
- Maldonado, N., de Ruiz, C., Otero, M., Sesma, F., Nader-Macías, M.** (2012) Lactic acid bacteria isolated from young calves - Characterization and potential as probiotics. Research in Veterinary Science. **92**(2):342-349.
- Maragkoudakisa, P., Zoumpopoulou, G., Miarisa, C., Kalantzopoulou, G., Pot, B. y Tsakalidou, F.** (2006) Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. International Dairy Journal. **16**: 189–199.
- Margueritte, J., Mattion, N., Blackhall, J., Fernández, F., Parreño, V., Vagnozzi, A., Odeón, A., Combessies, G.** (2005) Diarrea neonatal en terneros de rodeos de cría: su prevención y tratamiento. Sitio Argentino de producción animal. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/destete/34-diarrea_neonatal_en_terneros.pdf.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., Huis in't Veld, JH** (1997) Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **80**(6):1031-7.

- Martín, R., Soberón, N., Vanechoutte, M., Flórez, A., Vázquez, F., Suárez, J.** Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *Int Microbiol.* **11**(4):261- 266.
- Merk, K., Borelli, C., Korting, H.** (2005) Lactobacilli – bacteria–host interactions with special regard to the urogenital tract. *Int. J.Med. Microbiol.* **295**(1): 9-18.
- Mohnl, M.** (2011) Microflora gastrointestinal y su influencia en el hospedante. *Biomin Newsletter.* Vol. 5. N° 56. Disponible el 06/07/2011 en: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/microflora-gastrointestinal-influencia-hospedante-t3442/165-p0.htm>.
- Morelli, L.** (2000) In vitro Selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr Issues Intest Microbiol.* **1**(2):59-67.
- Nguyen, T., Vo, T., Vu-Khac, H.** (2011) Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. *J Vet Sci.* **12**(2):159-164.
- Odeón, A.** (2001) Diarrea neonatal de los terneros; Etiopatogenia, Tratamiento y Control. Grupo de Sanidad Animal, EEA Balcarce. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/35-diarrea_neonatal_de_terneros.pdf.
- Olivera, J.** (2011) Caracterización Tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Unidad de tecnología de alimentos. Facultad de Agronomía. Universidad de la República.pp.43.
- Ouwenhand, A., Niemi, P., Salminen, S.** (1999) The normal faecal microflora does not affect the adhesion of probiotic bacteria in vitro. *FEMS Microbiology Letters.***177** (1):35-38.
- Owusu, J.,Tano, K., Akabanda, F., Nielsen, D. y Jespersen, L.** (2013) Partial Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus reuteri* 2-20B and *Pediococcus acidilactici* 0-11A Isolated from Fura, a Millet-Based Fermented Food in Ghana. *Journal of Food Research.* **2**(1): 50-58.
- Perelmuter, K., Fraga, M., Zunino, P.** (2008) *In vitro* activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. *Journal of Applied Microbiology.* **104**: 1718-1725.
- Picco,N., Alustiza,F., Bellingeri,R.,Grosso,M., Motta,C., Larriestra,A., Vissio,C., Tiranti,K., Terzolo,H., Moreira, A., Vivas,A.** (2015) Molecular screening of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from dairy neonatal calves in Cordoba province, Argentina. *Rev. Argent Microbiol.* **47**(2):95-102.
- Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D’Antonio, D., Savini, V., Di Bonaventura, G.** (2008) Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS Microbiol Lett.* **287**(1):41-47.
- Pompilio, A., Crocetta,V., Confalone, P., Nicoletti, M., Petrucca, A., Guarnieri, S.** (2010) Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol.* **10**(102):1-5.

- Prasad, J., Gill, H., Smart, J., Gopal, P.** (1998) Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *International Dairy Journal*. **8**: 993-1002.
- Prasirtsaka, B., Tanasupawatb, S., Boonsombatc, R., Kodamac, K. y Thongchulc, N.** (2013) Characterization of lactic acid producing bacteria from Thai sources. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **3**(01): 033-038.
- Quintero, B.** (2007) Sustitutos lecheros en la alimentación de terneros. *Redvet*. Vol. VIII, Nº 5. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507.html>.
- Ragazzo, J., Sánchez, L., Gutiérrez, P., Luna, G., Gómez, B. y Calderón, M.** (2009) Inhibition of *Salmonella* spp. isolated from mango using bacteriocin-like produced by lactobacilli. Inhibición de *Salmonella* spp. aislada de mango usando sustancias tipo bacteriocinas producidas por lactobacilos. *CyTA – Journal of Food*. **7**(3):181–187.
- Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Du, S., Ye, F., Liu, C., Liu, H., Wang, M., Li, Y., Sun, Y., Li, X., Tian, M., Jin, N.** (2014) In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Clinical microbiology. Anaerobe*. **30**: 1-10.
- Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S., Rebucci, R., Savoini, G., Simone, S., Stenico, A., Tirloni, E.** (2011) Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*. **17**:97-105.
- Rofle, R.** (2000) The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *J. Nutr.* **130**:396S-402S.
- Rondón, A., Samaniego, L., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M., Laurencio, M., Pérez, M.** (2008) Aislamiento, Identificación y Caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **6**(1): 56-63.
- Ruiz, L., Margolles, A. y Sánchez, B.** (2013) Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **396** (4):1-8.
- Sánchez, L., Omura, M., Lucas, A., Pérez, T., Llanes, M., Ferreira., C.** (2015) Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev. Salud Anim.* **37**(2): 94-104.
- Santos, R., Tsolis, R., Baumler, A., Adams, L.** (2003) Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. **36**(1):3-12.
- Signorini, M., Soto, L., Zbrun, M., Sequeira, G., Rosmini, M., Frizzo, L.** (2012) Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Research in Veterinary Science* **93**:250–258.

- Singh, S., Sharma, R., Malhotra, S., Pothuraju, R., Shandilya, U. y Kumar, A.** (2012) Probiotic Attributes of *Lactobacillus rhamnosus* of Dairy Origin and Effectiveness of Almond in Stimulation of its Growth in vitro. *Indian J. Dairy Sci.* **65**(4): 305-313.
- Soto, L., Frizzo, L., Bertozzi, E., Avataneo, E., Sequeira, G. y Rosmini, M.** (2010) Molecular Microbial Analysis of Lactobacillus Strains Isolated from the Gut of Calves for Potential Probiotic Use. *Veterinary Medicine International. Veterinary medicine international.* 2010.7p.
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M.** (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods.* **40**(2):175-179.
- Suskovic, J., Kos, B., Beganovic, J., Lebos, A., Habjanic, K. y Matosic, S.** (2010) Antimicrobial Activity. The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48** (3) 296–307.
- Timmerman, H., Mulder, L., Everts, H., van Espen, D., van der Wal, E., Klaassen, G., Rouwers, S., Hartemink, R., Rombouts, F., Beynen, A.** (2005) Health and growth of veal calves fed milk replacer with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* **88** (6):2154-65.
- Torres, C. y Zarazaga, M.** (2002) Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? *Gac Sanit.* **16**(2):109-12.
- Umpiérrez, A., Acquistapace, S., Fernández, S., Oliver, M., Acuña, P., Reolón, E. y Zunino, P.** (2016) Prevalence of Escherichia coli adhesión-related genes in neonatal calf diarrhea in Uruguay. *Journal of Infection in Developing Countries.* **10** (5): 472-477.
- Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S., Morelli, L., Visconti, A. y Lavermicocca, P.** (2006) In Vitro and In Vivo Survival and Transit Tolerance of Potentially Probiotic Strains Carried by Artichokes in the Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology.* **72**(4): 3042–3045.
- Vásquez, S., Suárez, H. y Zapata, S.** (2009) Utilización de sustancias antimicrobianas Producidas por Bacterias Acido Lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chil Nutr.* **36**(1):64:71.
- Vlková E, Trojanova I, Rada V.** (2006) Distribution of bifidobacteria in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiol .* **51**:325-8.
- Watnick P. y Kolter R.** (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.* **182**(10): 2675–2679.
- Weese, J. y Anderson, M.** (2002) Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *Can. Vet. J.* **43**(10):771-774.
- Young-il, C. y Kyoung-jin, Y.** (2014) An overview of calf diarrhea –infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* **15**(1):1-17.

Zamudio, K. y Zavaleta, A. (2003) Estudio potencial de Lactobacilos aislados de fuentes naturales. Ciencia e investigación. **6**(1):30-35.