

Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77

In vitro evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus acidophilus* SS80 and *Streptococcus thermophilus* SS77



<http://opn.to/a/bKVKc>

Juan Emilio Hernández-García ¹, Laureano Sebastián-Frizzo ^{2,3}, Juan Carlos Rodríguez-Fernández ¹, Gregory Valdez-Paneca ¹, María Virginia-Zbrun ^{2,3}, Ibrahim Calero-Herrera ¹

¹Universidad de Sancti Spíritus. “José Martí Pérez”. Departamento de Medicina Veterinaria-Facultad de Ciencias Veterinaria UNISS-FCA, Cuba.

²Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (ICIVET-CONICET/UNL). Argentina.

³Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. UNL-FCV. Argentina.

RESUMEN: El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar *in vitro* las propiedades probióticas de las cepas de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77 para uso animal. Las cepas fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas, de hemólisis, de resistencia a diferentes pH, a concentraciones de sales biliares, y prueba de antagonismo microbiano frente a cinco patógenos de animales y autoagregación, coagregación e hidrofobicidad. Los resultados mostraron que ambas cepas producen peróxido de hidrógeno, lipasa y lecitinasa. *S. thermophilus* SS77 fue positivo a proteólisis de la caseína; sin embargo, las cepas no produjeron aminas biógenas desde los aminoácidos Lisina, Tirosina y Triptofano. Además, *S. thermophilus* SS77 utilizó la Alanina a partir de las 36 h, mientras que *L. acidophilus* SS80 usó Histidina a partir de las 72 h. Las dos cepas resultaron negativas a la prueba de hemólisis y difieren significativamente en los valores de pH alcanzados en leche descremada en polvo a partir de las 2 h. Crecieron a pH 6,5 y 5,5 y resistieron al jugo gástrico simulado por 3 h, con porcentajes de supervivencia por encima de 98 %. La cepa de *L. acidophilus* SS80 creció solo con 0,3 % de bilis (% p/v), mientras que *S. thermophilus* SS77 con 0,3 %, 0 % y 1 % (% p/v). Se produjo inhibición del crecimiento sobre todas las cepas patógenas evaluadas; resultó más efectiva *Lactobacillus acidophilus* SS80. Ambas cepas resultaron positivas a la prueba de autoagregación, coagregación e hidrofobicidad con valores superiores a 48 %. Se concluye que ambas cepas tienen potencial para ser utilizadas como aditivos probióticos en la alimentación animal.

Palabras clave: aditivo zootécnico, bacterias acidolácticas, *Lactobacillus acidophilus* SS80, probiótico, *Streptococcus thermophilus* SS77.

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate *in vitro* the probiotic properties of *Lactobacillus acidophilus* SS80 and *Streptococcus thermophilus* SS77 strains for animal use. Strains were characterized by biochemical tests, hemolysis, resistance to different pH, bile salt concentrations, microbial antagonism test against five animal pathogens, and auto-aggregation, co-aggregation and hydrophobicity tests. The results showed that both strains produce hydrogen peroxide, lipase and lecithinase. *S. thermophilus* SS77 was positive to casein proteolysis; however, the strains did not produce biogenic amines from the amino acids Lysine, Tyrosine and Tryptophan. In addition, *S. thermophilus* SS77 used alanine from 36 h on, whereas *L. acidophilus* SS80 used histidine from 72 h on. Both strains were negative to the hemolysis test and differed significantly in the pH values reached in skimmed milk powder after 2 h. They grew at pH 6.5 and 5.5 and resisted the simulated gastric juice for 3 h, with survival rates above 98 %. The strain of *L. acidophilus* SS80 grew only at 0.3 % bile (% w / v), while *S. thermophilus* SS77 did it at 0.3 %, 0 % and 1 % (% w / v). Growth inhibition occurred on all pathogenic strains evaluated, being *Lactobacillus acidophilus* SS80 more effective. Both strains were positive to the auto-aggregation, co-aggregation and hydrophobicity tests with values higher than 48 %. It is concluded that both strains have potential to be used as probiotic additives in animal feeding.

Key words: zootechnical additive, lactic acid bacteria, *Lactobacillus acidophilus* SS80, probiotic, *Streptococcus thermophilus* SS77.

*Autor para correspondencia: Juan Emilio Hernández-García. E-mail: juanemilio@uniss.edu.cu

Recibido: 13/12/2018

Aceptado: 15/02/2019

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el uso de microorganismos en la profilaxis y terapia de enfermedades es objeto de gran interés y controversia científica (1). En la actualidad se reconoce la importancia y eficacia de la terapia biótica (probióticos y prebióticos) como herramientas en el tratamiento de diversas enfermedades en los animales y el hombre (2).

La morbilidad y la mortalidad en neonatos de las diferentes especies animales representan las mayores pérdidas financieras; dentro de las causas resalta el síndrome diarreico, el cual es más pronunciado en sistemas intensivos y condiciones tropicales donde los factores estresantes son más intensos (3). Estos efectos se han atenuado con el uso de antibióticos, pero a consecuencia de la antibiorresistencia que generan con su uso sistemático se han buscado diversas alternativas, entre ellas sobresale la utilización de los probióticos (4).

El término probiótico está definido como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un papel benéfico en la salud del hospedero” (5). Estos microorganismos deben ser capaces de sobrevivir al paso por el tracto digestivo, resistiendo la acción de los jugos gástricos y la bilis; además, deben tener capacidad de colonizar y proliferar en este medio. Desde esas perspectivas, se evalúan diferentes bacterias ácido lácticas (BAL) y se incorporan en el alimento (6).

Dentro de las BAL, los géneros más utilizados para la obtención de alimentos y bebidas fermentadas son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y, del género *Streptococcus*, la especie *S. thermophilus* es la que con más frecuencia se emplea como microorganismo benéfico (7).

Se han descrito diversos mecanismos de acción como característicos de los probióticos: las propiedades de adhesión, la competencia por nutrientes y sitios de colonización, la producción de metabolitos antimicrobianos, los cambios en las condiciones del ecosistema intestinal y la modulación de la respuesta inmune del hospedero (8,9).

En Cuba se han desarrollado diversos ensayos *in vivo* para evaluar el efecto probiótico de BAL en animales (10). Algunos de estos trabajos se han desarrollado con las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* desarrolladas sobre medios naturales y con las que se han obtenido resultados positivos (11).

También se han reportado en el país ensayos *in vitro* de BAL por otros autores (12). No obstante, no se han publicado experimentos *in vitro* con las cepas de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77. El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* propiedades probióticas de las cepas de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77, previamente utilizadas como aditivos en animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Las cepas de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77 pertenecen al cepario del Departamento de Veterinaria de la Universidad de Sancti Spiritus “José Martí Pérez”. Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Alimento del Departamento de Salud Pública Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina (UNL). Los microorganismos mencionados previamente se obtuvieron inicialmente por aislamiento desde un preparado liofilizado del Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia (IIIA) de Cuba en los medios Man Rogosa Sharpe (MRS), *Lactobacillus Anaerobic MRS* con Vancomicina y Verde de Bromocresol, (LAMVAB), y medio *Streptococcus thermophilus* (ST). Los cultivos puros se mantuvieron en caldo MRS. Los aislamientos se conservaron a -80°C en caldo MRS con 20 % de glicerol estéril para ser conservado por largos periodos.

Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La capacidad de las cepas para producir H₂O₂ se determinó siguiendo la metodología descrita por McLean y Rosenstein (13). Los cultivos bacterianos se sembraron en duplicado por estría sobre agar MRS suplementado con 2,5 mg/mL de Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma) y 0,01

mg/mL de Peroxidasa de rábano (HRP) (Sigma). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 48 h en condiciones de anaerobiosis. En presencia de H₂O₂, la enzima HRP oxida al TMB (incolore) para dar lugar a la formación de un pigmento azul. La tonalidad de la coloración azul se consideró una medida semicuantitativa de la cantidad de H₂O₂ producido y liberado al medio por la cepa (14). La intensidad de la coloración azul fue incluida dentro de una de las siguientes categorías: azul claro o azul oscuro y, por la rapidez en la aparición, en Rápido (+++), Intermedio (++) , Lento (+) y Negativo (-).

Descarboxilación de aminoácidos

La actividad amino-descarboxilasa de las cepas se realizó mediante un método cualitativo (15), que consistió en un medio líquido base con la siguiente composición: Peptona de caseína 0,5 %, Extracto de levadura 0,3 %, D(+)-Glucosa 0,1 %, Púrpura de bromocresol 0,0016 % (Mallinckrodt Baker, Inc). A 0,9 % del medio base se le agregó 0,5 % del aminoácido a testar, en este caso L Arginina, L Histidina, L Lisina, L Tirosina y L Triptofano (Biopack, Argentina). Luego se ajustó el pH del medio a 6,7 ± 0,1 a 25°C. Los tubos duplicados se inocularon con 10 µL de cultivo y se incubaron 72 horas a 37°C. El color del medio al momento de la siembra era de color púrpura. El medio inicialmente pasa a amarillo al acidificarse y retorna a púrpura si la cepa descarboxila los aminoácidos; el pH del medio aumenta. Prueba positiva: color del medio púrpura. Cepa productora de aminas biógenas. Prueba negativa: color del medio amarillo. La cepa no produce aminas biógenas con el aminoácido probado.

Hidrólisis de la caseína de la leche (proteólisis)

Para examinar la actividad proteolítica se siguió la metodología descrita por Harrigan (16) con algunas modificaciones. Se prepararon dos medios de cultivo: medio 1) agar leche descremada, que consistió en leche en polvo descremada al 5 % y agar al 1,3 % (Britania); medio 2) agar-leche que se preparó de la siguiente manera, se disolvió leche en polvo descremada al 2 % en agua destilada y agar (Britania) a una concentración de 1,3 % en agua de peptona; se esterilizaron por separado la leche

y el medio peptonado, se dejaron enfriar a 60°C y luego se mezclaron y repartieron en placas Petri. Se prepararon placas con perforaciones de 6 mm de diámetro que se rellenaron con 20 µL de los cultivos y placas sin perforaciones que se sembraron por estrías. Se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 a 72 h. La presencia de un halo transparente alrededor de las colonias y pocillos se consideró como reacción positiva de proteólisis de la caseína. El ensayo se realizó por triplicado y en dos momentos diferentes.

Actividad lecitinasa y lipasa

Para examinar la producción de las enzimas lecitinasa y lipasa de las cepas, se siguió la metodología descrita por MacFaddin (17). Se utilizó el medio de cultivo agar Tripteina de Soya (Britania®) enriquecido con 10 % de yema de huevo. Se prepararon dos placas con perforaciones de 6 mm de diámetro que fueron inoculadas con 20 µL de cultivos y se utilizaron placas sin perforaciones que se sembraron por estrías. Se utilizó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 a 72 h. Un halo opaco, opalescente (blanco lechoso) rodeando las colonias en perforación se consideró como prueba lecitinasa positiva; un brillo aceitoso, iridiscente, sobre las colonias y alrededor de ellas en la placa sembrada por estrías, se interpretó como actividad lipasa positiva.

Actividad hemolítica

La actividad hemolítica de las cepas se realizó sobre Agar Columbia con 5 % de sangre de Caballo (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia), según el método estándar con ligeras modificaciones (18). La incubación se realizó a 37°C por 48 h. Las cepas fueron evaluadas según la zona de hemólisis alrededor de la colonia, como positivas o negativas y de acuerdo al tipo de hemólisis: β- hemólisis cuando apareció una zona clara de hemólisis alrededor de la colonia, α- hemólisis una zona verde alrededor de la colonia y gamma (γ) cuando la zona alrededor de la colonia no era clara. Se utilizó como control positivo la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Monitoreo de pH en leche descremada en polvo (LDP)

Para el desarrollo del ensayo (19), se prepararon en tubos Falcon de 20 mL de capacidad 10 mL de leche descremada en polvo con una concentración final de sólidos de 125 g/L. Posteriormente, se esterilizaron en calor fluido durante 20 min, dejando enfriar a 45°C y bajo flujo laminar, inoculándose con cultivo fresco de las dos cepas individuales y en simbiosis a razón de 250 µL. Los tubos se incubaron a 37°C, se realizaron lecturas a tiempo 0 y cada una hora, a partir de las dos horas, hasta observar estabilidad en el pH. El ensayo se realizó por triplicado y las mediciones se realizaron un pH metro Altronix TPX III (Taiwan).

Cinética de crecimiento a diferentes pH

Se prepararon tubos Falcon de 20 mL de capacidad con 10 mL de medio caldo MRS; se ajustó el pH con ácido fosfórico a pH 6,5, pH 5,5, pH 4,5 y pH 3,5. La esterilización de los medios de cultivo con diferentes pH se realizó en autoclave a 121°C durante 15 min. El ensayo de cinética de crecimiento se realizó en microplacas de 96 pocillos (Costar 3599, Corning). Para esto, se depositaron en cada pocillo 240 µL de los medios y 30 µL de inóculo de un cultivo de 18 h de cada cepa en estudio. El crecimiento microbiano se realizó a 37°C durante 24 h. Las lecturas se realizaron cada 30 min a 630 nm mediante el Lector multimodal de microplacas Sinergy HT BioTEK (BioTEK Instrumentos-USA). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tolerancia a jugo gástrico simulado (JGS)

El ensayo de tolerancia a los jugos gástricos se realizó con ajustes a la metodología descrita por Bao (20). El JGS consistió en una solución de pepsina (Riedel-de Haën, Alemania) (0,35 % p/v) y NaCl (0,2 % p/v); una mitad (50 %) ajustada a pH 3 con ácido clorhídrico y la otra restante a pH 6,5. La esterilización se realizó por filtración (0,22 µM). Las suspensiones de JGS se inocularon a 1 % con cultivos de 18 h de cada cepa y mezclados durante 10 s. El JGS con pH 3 se incubó durante 3 h a 37°C. Se realizaron recuentos de células viables en agar MRS a

tiempo 0 (N_0), (JGS pH 6,5) y se repitieron los recuentos pasadas las 3 h (N_1). En ambos casos las placas se incubaron durante 48 h a 37°C en atmósfera de anaerobiosis. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. El porcentaje de supervivencia se calculó mediante la siguiente ecuación: % SP = $\text{Log UFC } N_1 / \text{Log UFC } N_0 \times 100$. Donde N_1 representa el total de células viables después del tratamiento y N_0 el número inicial de microorganismos inoculados.

Crecimiento en bilis

La tolerancia a sales biliares se llevó a cabo de acuerdo con la metodología utilizada por Uriot *et al.* (21) en microplacas de 96 pocillos. Las cepas se multiplicaron en caldo MRS en presencia de 0,3 %, 0,5 % y 1 % de bilis bovina (Britania, Argentina); se adicionaron 240 µL en cada pocillo y 30 µL del cultivo de 18 h de las cepas en estudio. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 h y las lecturas se realizaron cada 30 min a 630 nm mediante el Lector multimodal de microplacas Sinergy HT BioTEK (BioTEK Instrumentos-USA). Todas las determinaciones fueron por triplicado.

Prueba de Antagonismo microbiano

Técnica de “mota en césped” (*spot on the lawn*)

La capacidad para inhibir el crecimiento de determinados microorganismos patógenos se valoró mediante el método denominado “mota en césped” “agar spot” (22). Como cepas indicadoras se emplearon cepas patógenas del cepario del Laboratorio de Alimentos del Departamento de Salud Pública, FCV, UNL (*Salmonella enterica* serotipo Dublin 595, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 289, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*). Las cepas BAL se multiplicaron en caldo MRS por 18-24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, se transfirieron 10 µL del cultivo a tres puntos o *spots* (10 µL en cada *spot*) en una placa de agar MRS (Merk), incubando a 37°C durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis. Simultáneamente, se prepararon cultivos en medio líquido de cada uno de los microorganismos indicadores, inoculando 3-4 colonias en 50 mL de caldo BHI (Merck) e incubando 12-16 h. Al completar las 24 h de

incubación, las placas con los *spots* de BAL se recubrieron con 7 mL de agar BHI semisólido, caldo BHI (Merk) suplementado con agar bacteriológico (Conda) al 0,7 %, atemperado a 40°C y suplementado a 1 % con el cultivo líquido de cada uno de los microorganismos indicadores. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y en condiciones de aerobiosis. La medición de los halos de inhibición se realizó con una regla graduada. Se consideró que existía inhibición cuando el halo fue superior o igual a 10 mm.

Ensayo de autoagregación y coagregación con patógenos intestinales

Los ensayos de autoagregación y coagregación con patógenos intestinales se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Maldonado *et al.* (23). Se emplearon los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serotipo Dublin. Las pruebas se consideraron positivas cuando se hizo visible la sedimentación de las células sobre el fondo del tubo en un periodo 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 la determinación de la hidrofobicidad de la superficie celular, se empleó la técnica de partición en solventes orgánicos (23,24). Los valores de por ciento de hidrofobicidad obtenidos permiten clasificar a las cepas con una hidrofobicidad alta (51-100 %), media (30- 50 %) y baja (0-29 %) (24).

Análisis estadístico

Los datos se tabularon y se analizaron con el programa estadístico SPSS 11.5. Se empleó un análisis de varianza de clasificación simple, una prueba T para grupos independientes y comparación de Proporciones, considerando en todos los casos un nivel de significación de 5 %.

Para el procesamiento estadístico de las variables discretas se utilizó la Prueba de

hipótesis para proporciones y para las variables continuas un Análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y la prueba de Rangos múltiples de Tukey. Previamente, se valoró la distribución normal de los datos mediante el *test* de Kolmogorov-Smirnov para la bondad de ajuste y se aplicó la prueba de Levene para evaluar la Homocedasticidad. Se utilizaron los software estadísticos SPSS 15.0.1 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de peróxido de hidrógeno

La [Tabla 1](#) evidencia que las dos cepas resultaron positivas a la prueba de peróxido de hidrógeno; la cepa *L. acidophilus* SS80 fue superior por la intensidad de la coloración y rapidez con que apareció la reacción.

Descarboxilación de aminoácidos

En las primeras 12 horas las dos cepas no utilizaron los aminoácidos incluidos en el ensayo. La cepa *Streptococcus thermophilus* SS77 fue capaz de utilizar la Alanina a partir de las 36 h, mientras que la cepa de *L. acidophilus* SS80 lo hizo con la Histidina a partir de las 72 h. Las cepas evaluadas no usaron el resto de los aminoácidos en los tiempos evaluados ([Tabla 2](#)).

Actividad enzimática

S. thermophilus SS77 mostró actividad de las tres enzimas, *L. acidophilus* SS80 solo fue positivo a la lipasa y lecitinasa ([Tabla 3](#)).

Monitoreo de pH en leche descremada en polvo (LDP)

La [Tabla 4](#) muestra que la cepa *L. acidophilus* SS80 produjo a las 7 h un pH más bajo (pH 3,78) que *S. thermophilus* SS7 (pH 5,71), valores que difieren entre sí. Cuando se crecieron las cepas en simbiosis, el pH mostró valores intermedios (pH 4,17) y difirió significativamente ($p < 0,05$) al alcanzado por las cepas independientes.

Tabla 1. Producción de peróxido de hidrógeno por las cepas evaluadas./Production of hydrogen peroxide by the strains evaluated.

Cepas	Rapidez de aparición	Tonalidad	Resultados
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SS80	+++	Azul oscuro	Positiva
<i>Streptococcus thermophilus</i> SS77	++	Azul claro	Positiva

Leyenda: +++ = Rápido; ++ = Intermedio; + = Lento; - = Negativo

Cinética de crecimiento a diferentes pH y tolerancia a JGS

Las dos cepas fueron capaces de crecer a pH 6,5 y 5,5, no así en pH 4,5 y 3,5 (Tabla 5); sin embargo, toleraron el JGS donde enfrentaron un pH 3; se observó que no existen diferencias significativas entre los conteos y mostraron porcentaje de supervivencia de 98,9 % y 99,7 %

para *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77, respectivamente (Tabla 6).

Crecimiento en bilis

Solamente la cepa de *S. thermophilus* SS77 fue capaz de crecer en todas las concentraciones de bilis evaluadas (Tabla 7).

Actividad antimicrobiana

La Tabla 8 muestra los resultados de la actividad antagónica de las dos cepas BAL frente

Tabla 2. Utilización de aminoácidos por las cepas evaluadas. /Use of amino acids by the strains evaluated.

Aminoácido	<i>Lactobacillus acidophilus</i> SS80								<i>Streptococcus thermophilus</i> SS77							
	Tiempo de lectura (h)								Tiempo de lectura (h)							
	12	24	36	48	60	72	84	96	12	24	36	48	60	72	84	96
Alanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Histidina	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tirosina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptofano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Leyenda: + resultado positivo a la utilización del aminoácido. - negativo a la prueba.

Tabla 3. Presencia de enzimas proteolítica y lipolíticas. /Presence of proteolytic and lipolytic enzymes.

Cepas	Proteólisis	Lipasa	Lecitinasa
<i>L. acidophilus</i> SS80	-	+	+
<i>S. thermophilus</i> SS77	+	+	+

Leyenda: + actividad enzimática positiva; - actividad enzimática negativa

Tabla 4. Variación del pH en leche descremada en polvo (LDP) para las cepas *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77. n=3. /pH variation in skimmed milk powder (SMP) for strains *L. acidophilus* SS80 and *S. thermophilus* SS77. n = 3

Cepas	0h	2h	3h	4h	5h	6h	7h
<i>L. acidophilus</i> SS80	6,74 ^a ±0,032	5,78 ^{ba} ±0,025	4,44 ^b ±0,078	4,25 ^b ±0,050	4,02 ^b ±0,053	3,78 ^b ±0,184	3,78 ^b ±0,178
<i>S. thermophilus</i> SS77	6,98 ^a ±0,010	6,91 ^{ab} ±0,100	6,75 ^b ±0,05	6,72 ^b ±0,042	6,68 ^b ±0,057	6,43 ^b ±0,07	5,71 ^b ±0,032
Simbiosis de cepas	6,77 ^a ±0,005	5,49 ^b ±0,081	4,60 ^b ±0,015	4,40 ^b ±0,046	4,21 ^b ±0,025	4,16 ^b ±0,011	4,17 ^b ±0,015

Leyenda: Valores expresados en Media ± DS. Superíndices diferentes, en una fila, denotan diferencias significativas entre horas en una misma cepa (p<0,05), Toh vs T7h. Subíndices diferentes, en columna 7h, denota diferencias significativas entre cepas (p<0,05).

Tabla 5. Resultado de crecimiento a diferentes pH de las cepas evaluadas. /Growth results of the strains evaluated at different pH.

Cepas	Crecimiento			
	pH 6,5	pH 5,5	pH 4,5	pH 3,5
<i>L. acidophilus</i> SS80	+++	+++	-	-
<i>S. thermophilus</i> SS77	+++	+++	-	-

Leyenda: +++ Abundante crecimiento; ++ crecimiento medio; + poco crecimiento; - sin crecimiento

a los cinco patógenos estudiados “mota en césped” (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serotipo Dublin, *Escherichia coli* 289, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. El mayor efecto inhibitorio lo exhibieron ambas cepas sobre *Listeria monocytogenes*. Los valores de los halos de inhibición de *L. acidophilus* SS80 fueron mayores que los encontrados con la cepa *S. thermophilus* SS77; no obstante, de acuerdo a la clasificación ambas cepas son inhibitoras.

En el cruzamiento de las cepas por el método de “mota en césped”, estas mostraron halo de inhibición inferior a los encontrados en el

enfrentamiento a los patógenos, no existiendo diferencias significativas entre ellas (Tabla 9).

Prueba de autoagregación, coagregación e hidrofobicidad

Las cepas de *S. thermophilus* SS77 y *L. acidophilus* SS80 a los 120 min mostraron capacidad de autoagregar y coagregar; la coagregación para ambas cepas fue más compacta en el caso de la *Escherichia coli* 298. Las dos cepas utilizadas en el ensayo mostraron valores medio de hidrofobicidad y no existieron diferencias significativas entre ellas (Tabla 10).

Tabla 6. Tolerancia a jugo gástrico simulado (JGS). n=3./ *Tolerance to simulated gastric juice (SGJ).n=3.*

Cepas	Recuentos a tiempo cero (N ₀) Log ₁₀ UFC/mL	Recuentos después de 3 h de incubación (N ₁) Log ₁₀ ufc/mL	%SP
<i>L. acidophilus</i> SS80	6,43 ^a ± 0,230	6,36 ^a ± 0,317	98,9
<i>S. thermophilus</i> SS77	7,42 ^a ± 0,120	7,40 ^a ± 0,130	99,7

Leyenda: Valores expresados en medias± DS. Superíndices diferentes, en una fila, denota diferencias significativas entre ensayos (p<0,05).

Tabla 7. Resultado de crecimiento a diferentes concentraciones de bilis./*Growth result at different bile concentrations.*

Cepas	Crecimiento a diferentes concentraciones de bilis (% p/v)			
	0,0	0,3	0,5	1,0
<i>L. acidophilus</i> SS80	+++	++	-	-
<i>S. thermophilus</i> SS77	+++	+++	+++	+++

Leyenda: +++ Abundante crecimiento; ++ crecimiento medio; + poco crecimiento; - sin crecimiento

Tabla 8. Resultados de la actividad antagonista (medias de los halos de inhibición en mm) de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77 frente a diferentes cepas patógenas indicadoras. n=3./ *Results of the antagonistic activity (inhibition halo averages in mm) of L. acidophilus SS80 and S. thermophilus SS77 against different pathogen strains. n=3.*

Cepas	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. enterica</i> serotipo Dublin 595	<i>Escherichia coli</i> 289	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>L. acidophilus</i> SS80	18,33 ±0,404	18,07 ^a ±0,503	19,07 ^a ±0,305	16,00 ±0,755	16,70 ^a ±0,655
<i>S. thermophilus</i> SS77	18,06 ±0,503	16,20 ^b ±0,655	16,73 ^b ±0,305	15,30 ±0,624	15,13 ^b ±0,550

Leyenda: Valores expresados en medias ± DS. Diferentes letras superiores en una fila denota diferencias significativas entre ensayos (p<0,05).

Tabla 9. Enfrentamiento entre las cepas (medias de los halos de inhibición en mm). n=3. / *Confrontation between strains (inhibition halo averages in mm). n=3.*

<i>S. thermophilus</i> SS77 vs <i>L. acidophilus</i> SS80	12,50 ^a ±0,500
<i>L. acidophilus</i> SS80 vs <i>S. thermophilus</i> SS77	11,70 ^a ±0,500

Leyenda: Valores expresados en medias ± DS. Diferentes letras superiores en una fila denotan diferencias significativas entre ensayos (p<0,05).

Tabla 10. Resultados a la prueba de adherencia microbiana a hidrocarburos (ensayo de hidrofobicidad), autoagregación y coagregación. n=3./Results of the microbial adhesion to hydrocarbons (MATH) test, auto-aggregation and co-aggregation. n=3.

Cepas	Autoagregación	Coagregación		% Hidrofobicidad
		<i>Escherichia coli</i>	<i>S. enterica</i> serotipo Dublin	
<i>L. acidophilus</i> SS80	+	+++	++	48,3 ^a ±0,361
<i>S. thermophilus</i> SS77	+	+++	++	48,53 ^a ±0,252

Leyenda: + Autoagregación positiva, ++ fenotipo coagregante no compacto, +++ fenotipo coagregante compacto. Valores expresados en medias ± DS. Diferentes letras superiores en una fila denotan diferencias significativas entre ensayos ($p < 0,05$).

Producción de aminas

Las cepas de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77 mostraron baja capacidad de producción de aminas biógenas (AB): de los cinco aminoácidos ensayados solo utilizaron uno, pasadas las 36 horas. Este es otro indicador de seguridad en la evaluación de cepas candidatas a probióticos, partiendo de que altas concentraciones de aminas en los alimentos, pueden ingresar en la cadena alimentaria y ser responsables de varios problemas toxicológicos en humanos (25). No obstante, la formación de AB ha estado asociada a cepas de *Lactobacillus* spp., tales como *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. alimentarius*, *L. reuteri*, y *L. sakei* (26). En productos cárnicos fermentados fueron descritos con baja actividad de producción de AB cepas de *L. casei*, *L. fermentum* y *L. reuteri* (27). Tarrah *et al.* (28) realizaron un estudio *in vitro* de cepas de *S. thermophilus* y estas manifestaron diferencias en la producción de AB, por lo que los autores concluyeron que es una característica dependiente de la cepa (28).

Actividad enzimática

La cepa de *L. acidophilus* SS80 no mostró actividad proteolítica, correspondiendo con lo planteado por Peres Cátia *et al.* (29), quienes reportaron cepas que exhibían baja actividad de la enzima. La variación encontrada entre cepas puede estar dada por componentes de la pared celular o del medio en que se desarrollan las cepas. La actividad proteolítica de las cepas es un indicador a tener en cuenta para evaluar su actividad probiótica, específicamente referente a la liberación de péptidos bioactivos, los cuales se generan durante la fermentación del alimento o en el proceso de la digestión (30). Estos péptidos bioactivos incluyen algunas secuencias de

aminoácidos que ejercen una actividad biológica específica en el consumidor (31).

Actividad hemolítica

Dentro de los indicadores recomendados por la FAO/WHO (32) para evaluar los probióticos, la actividad hemolítica es uno de los criterios de seguridad debido a su relación con la virulencia de las cepas. Las dos cepas evaluadas no revelaron actividad hemolítica. Estos resultados coinciden con los encontrados por Kalui *et al.* (33), quienes reportaron actividad hemolítica negativa en estudios del género *Lactobacillus*.

Monitoreo de pH en leche descremada en polvo (LDP)

Los resultados obtenidos en el monitoreo del pH cada 2 h difieren con lo planteado por Bauman y Longo (34), pues estos encontraron un crecimiento más rápido de *S. thermophilus*. La conversión de lactosa en ácido láctico se encuentra directamente relacionada con el descenso del pH y es provocado, principalmente, por *L. acidophilus* SS80. Los valores de pH del medio disminuyeron a valores por debajo de 5 en 18 h, lo que se corresponde con otros estudios donde las cepas de lactobacilos redujeron el pH a valores $\leq 5,5$ en 24 h (35,36). Es de esperar que con estas características las cepas trabajadas ejerzan alguna acción benéfica, ya que se conoce que la mayoría de los enteropatógenos tienen inhibición del crecimiento a valores cercanos a pH 5,5 (37,38).

Tolerancia a condiciones de stress

La tolerancia a las sales de bilis y bajo pH son propiedades esenciales requeridas por las BAL para sobrevivir en el tracto digestivo y expresar sus propiedades benéficas (39). En el presente estudio, las cepas de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77 crecieron en pH 6,5 y 5,5 y

resistieron un pH 3 durante tres horas; sin embargo, las concentraciones de bilis 0,5 % y 1 % inhibieron el crecimiento de *L. acidophilus* SS80. En otros estudios se encontraron mejores crecimientos en el medio MRS cuando ajustaron el pH superior a 5; a pH 3 la mayoría de las cepas redujeron el crecimiento significativamente, incluso la cepa testigo de *L. acidophilus* LA5 que disminuyó en 2 log (40). Concentraciones de 0,3 % de bilis es el punto crítico de resistencia para las cepas a evaluar, mientras que en la predicción de la supervivencia de probióticos, después de su administración vivos por vía oral, el pH del jugo gástrico a pH 2 durante 3 h es a menudo utilizado como una condición extrema para simular las condiciones en el estómago (41); límite muy similar al que las cepas evaluadas toleraron.

El nivel de supervivencia observado en el trabajo por las cepas de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77 es superior al observado en otros estudios (29,42). En pruebas de selección de BAL se reportaron también cepas resistente a sales biliares (0,5 %, 1 %, 2 % y 3 %), pH (2,5, 3,5 y 7,6) y temperatura de 38 a 45°C (35).

Actividad antibacteriana

La producción de sustancias inhibitoras se ha reportado para todo el género *Lactobacillus* y otros géneros como *Lactococcus*, *Streptococo*, *Lactobacillus*, *Leuconstoc* y *Pediococcus*, así como *Enterococcus* (43). En este estudio todas las cepas patógenas se inhibieron por *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77, lo que demuestra la interacción de factores con efecto inhibitor (44). En trabajo de caracterización, mediante pruebas *in vitro* de cepas BAL procedentes de fuente animal para considerar su posterior aplicación como probiótico en animales, se encontró que la mayoría de las cepas evaluadas exhibieron actividad antagónica contra los patógenos *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* (24,45). Resulta significativo el efecto inhibitor sobre patógenos implicados en procesos diarreicos y casos de toxiinfecciones alimentarias, como lo son *Salmonela*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. No obstante, no se tiene un completo análisis de la naturaleza de las sustancias antagónicas que producen las cepas evaluadas. Se describe por varios autores que en

esta actividad pueden estar presentes los ácidos orgánicos, como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído y sustancias de naturaleza proteica antimicrobiana, llamadas bacteriocinas (35,43).

Pruebas de hidrofobicidad, agregación y coagregación

Otra propiedad importante de los probióticos que debe ser evaluada es su capacidad para permanecer y colonizar el tracto gastrointestinal. La hidrofobicidad se basa en la propiedad que presentan las paredes celulares de las bacterias de conjugarse a los hidrocarburos. En general, se sugiere que este método puede emplearse gracias a la naturaleza hidrofóbica que presentan las adhesinas de la superficie celular (37). Los porcentajes de hidrofobicidad que mostraron las cepas de *L. acidophilus* SS80 y *S. thermophilus* SS77, 48,4 % y 48,8 % respectivamente, fue de media según la clasificación utilizada (46). En estudios de lactobacilos de productos fermentados se encontraron cepas que mostraron valores de hidrofobicidad y autoagregación <60 % (40) y entre 55,03 % y 30 % para cepas de origen intestinal (37): mientras que Sanchez y Tropms (24) reportan valores de hidrofobicidad de cepas de *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp. por encima de 82 % y para *Lactococcus* sp. y *Pediococcus* sp. inferiores al 50 %. Resultados con rangos similares también reportaron Frizzo *et al.* (47).

En los pasos iniciales de la adhesión microbiana es fundamental que exista una interacción hidrofóbica entre la célula bacteriana y el sustrato de contacto. 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. Los mecanismos de adhesión pueden requerir la participación de distintos constituyentes de superficie que interactúan, de manera secuencial, para vencer las fuerzas repulsivas (48,49). Según estos resultados, ambas cepas presentan posibilidades de adherirse a la mucosa intestinal y, por tanto, la ventaja de desplegar acciones como barrera intestinal frente a microorganismos patógenos, activar el sistema inmune y mejorar la salud del hospedero.

Las dos cepas estudiadas fueron capaces de autoagregar, por lo que, a pesar de no haber existido coagregación frente a los dos patógenos utilizados, ese comportamiento la distingue frente a otras por su potencial actividad frente a microorganismos patógenos. La capacidad de agregación es una característica que puede utilizarse para iniciar el estudio de las interacciones microbianas. Hay una asociación entre la habilidad de los lactobacilos para adherirse al epitelio intestinal, la actividad de agregación y la hidrofobicidad de su superficie (50,51). Los resultados de agregación estuvieron dentro de los 120 minutos (2 h); rangos similares reportan Ehrmann *et al.* (52), al evaluar diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, existieron algunos microorganismos que no coagregaron con los patógenos utilizados, serotipos de *Salmonella* y *Escherichia coli*, pues una fuerte actividad de agregación no siempre se corresponde con un comportamiento similar en la coagregación.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77 mostraron, *in vitro*, propiedades probióticas que sustentan su utilización como aditivo zootécnico.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Consejo Nacional del Investigaciones Científicas y Técnicas (ICIVET-CONICET/UNL) y al Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Argentina, por poner a nuestra disposición los recursos y las tecnologías de laboratorio para el desarrollo de los ensayos en el marco del convenio de movilidad docente e investigativa existente entre la UNISS y la UNL.

REFERENCIAS

1. Kleerebezem M, Binda S, Bron PA, Gross G, Hill C, van Hylckama Vlieg JE, et al. Understanding mode of action can drive the translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotics. *Current Opinion in Biotechnology*. 2019;56:55-60.

2. Di Gioia D, Biavati B. Probiotics and prebiotics in Animal Health and Food Safety. 2018(DOI.org/10.1007/978-3-319-71950-4_9):219-45.
3. Hernández JE, Calero I, Reyes J, Rodríguez JC. Evaluation of the practical clinical effect of feed supplements with lactic bacteria in young calves. *Rev NEWSLETTER*. 2001;3.
4. Foko KEM, Zambou NF, Kaktcham PM, Wang RY, Zhu T, Yin L. Screening and Characterization of *Lactobacillus* sp. from the Water of Cassava's Fermentation for Selection as Probiotics. *Food Biotechnol*. 2018;32(1):15-34.
5. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroent Hepat*. 2014;11(8):506-514.
6. Geraldi MV, Tulini FL, Souza VM, et al. Development of Yoghurt with Juçara Pulp (*Euterpe edulis* M.) and the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* La5 . *Probiotics Antimicro Prot*. 2018;10(1):71-76.
7. Miranda-Yuquilema JE, Marin-Cárdenas A, González-Pérez M. The bioproductive behavior of breeding sows and their offspring fed with probiotic additive. *Rev Ciencias Agrícolas*. 2018;35(1):69-81.
8. Khare A, Thorat G, Bhimte A, Yadav V. Mechanism of action of prebiotic and probiotic. *J Entomol Zoology Studies*. 2018;6(4):51-3.
9. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*. 2019;10(suppl_1):S49-S66.
10. Cossio DS, Hernández YG, Mendoza JD. Development of probiotics for animal production. Experiences in Cuba Desarrollo de probióticos destinados a la producción animal: experiencias en Cuba. *Rev Ciencias Agrícolas*. 2018;52(4):1.

11. Vega-Cañizares. Eficacia de un probiótico sobre *Escherichia coli* K88 en cerdos. *Rev Salud Anim.* 2018;40(1).
12. Sánchez L, Omura M, Lucas A, Pérez T, Llanes M, Ferreira C. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Rev Salud Anim.* 2015;37(2):94-104.
13. McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to recolonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Medical Microbiology.* 2000;49:543-52.
14. Rosenstein IJ, Fontaine EA, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Relationship between hydrogen peroxide-producing strains of lactobacilli and vaginosis-associated bacterial species in pregnant women. *Clinical Microbiol Infec Dis.* 1997;16:517-522.
15. Mete A, Cosansu S, Demirkol O, Ayhan K. Amino acid decarboxylase activities and biogenic amine formation abilities of lactic acid bacteria isolated from shalgam. *Int J Food Prop.* 2017;20(171-178).
16. Harrigan WF. *Laboratory Methods in Food Microbiology.* Press. A, editor.1998.
17. MacFaddin JF. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica Panamericana EeBAEM,* editor. 2003 .
18. Balamurugan R, Chandragunasekaran AS, Chellappan G, Rajaram K, Ramamoorthi G, Ramakrishna BS. Probiotic potential of lactic acid bacteria present in home made curd in southern India. *Indian J Med Res.* 2014;140(3):345.
19. Pérez J, Rocha E, Uzcategui D, Aranguren Y, Machado E. Aislamiento, selección y caracterización de *Lactobacillus* genus aisladas del líquido ruminal vacuno en la zona sur del lago, Venezuela. *Rev Colombiana Ciencia Animal.* 2015;7(2):165-170.
20. Bao Y, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Dong X, Wang Y, et al. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control.* 2010;21(5):695-701.
21. Uriot O, Denis S, Junjua M, Roussel Y, Dary-Mourot A, Blanquet-Diot S. *Streptococcus thermophilus*: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate? *J Functional Foods.* 2017;37:74-89.
22. Kajal A, Ankur G, Jagriti S. Isolation and Identification of *Lactobacilli* Bacteria from Raw Cow Milk in Local Region of Agra. *Int J Adv Res Biol Sci.* 2017;4(11):98-102.
23. Maldonado NC, Ficooseco CA, Mansilla FI, Melián C, Hébert ME, Vignolo GM, et al. Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. *Livestock Science.* 2018.
24. Sánchez L, Tromps J. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev Salud Anim.* 2014; 36(2):124-129.
25. Ladero V, Martín MC, Redruello B, Mayo B, Flórez AB, Fernández M, et al. Genetic and functional analysis of biogenic amine production capacity among starter and non-starter lactic acid bacteria isolated from artisanal cheeses. *Eur Food Res Technol.* 2015;241(377-383).
26. Pereira CI, Barreto-Crespo MT, San Romão MV. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus homohiochii*. *International J Food Microbiol.* 2001;68:211-216.
27. Pircher A, Friedrich B, Paulsen P. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *Eur Food Res Technol.* 2007;226:225-231.
28. Tarrach A, De Castilhos J, Rossi RC, da Silva Duarte V, Ziegler DR, Corich V, et al. In vitro probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Front Microbiology.* 2018;9.
29. Peres Cátia M, Hernandez-Mendoza AM, Moreira LS, Bronze MR, Vilas-Boas L, M PC. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. *LWT - Food Sci Technol.* 2014;59:234-246.

30. Pelaez C, Requena T. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *Int J Dairy Technol.* 2005;15:831-844.
31. Aimutis WR. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J Nutr.* 2004;134:989S-995S.
32. FAO/WHO. Guide lines for the evaluation of probiotics in food. . Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 1-11; London, Ontario. 2002.
33. Kalui CM, Mathara JM, Kutima PM, Kiiyukia C, Wongo LE. Functional characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* from ikii, a Kenyan traditional fermented maize porridge. *Afr J Biotechnol.* 2009;8:4363-4373.
34. Bauman G, Longo G. *El Yogurt: Un Alimento Esencial.* 2015.
35. Jurado-Gámez H, Martínez JA, Chaspuengal A, Calpa MF. Evaluación in vitro de la acción de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. *Biología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* 2014;12(2):49-59.
36. Velázquez-López A, Covatzin-Jirón D, Toledo-Meza MD, Vela-Gutiérrez G. Fermented drink elaborated with lactic acid bacteria isolated from chiapaneco traditional pozol. *CienciaUAT.* 2018;13(1):165-78.
37. Rondón AJ, Samaniego LM, Rodríguez S, Milián G, Ranilla MJ, et al. Isolation identification and partial characterization of the probiotic properties of *Lacto Bacillus* spp. strains obtained from the gastrointestinal tract of broilers. *Rev Cienc Tecnol Aliment.* 2008;6:56.
38. Muñoz-Atienza E, Gómez-Sala B, Araújo C, Campanero C, Del Campo R, Hernández PE, et al. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.* 2013;13:15-22.
39. Oh A, Banan-Mwine DE, Deog HO. Screening for potential probiotic bacteria from Korean fermented soybean paste: In vitro and *Caenorhabditis elegans* model testing. *LWT - Food Sci Technol.* 2018;88:132-138.
40. Seah YN, Siew SK, Birdie SP, Fook YC. Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented Bambang (Mangifera pajang) *CyTA - J Food.* DOI:101080/1947633720151020342. 2015.
41. de Souza BMS, Borgonovi TF, Casarotti SN, et al. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. *Probiotics & Antimicro Prot.* 2018;10:1-15.
42. Bautista-Gallego J, Arroyo-López FN, Rantsiou K, Jiménez-Díaz R, Garrido Fernández A, Cocolin L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Res Internat.* 2013;50:135-142.
43. Iranmanesha M, Ezzatpanah H, Mojgani N. Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products *LWT - Food Sci Technol.* 2014;58:355-359.
44. Servin LA. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews.* 2004;28:405-440.
45. Bhuiyan R, Shill S, Islam A, Chakraborty S. Screening of *Lactobacillus* spp. from raw goat milk showing probiotic activities against pathogenic bacteria. *Afr J Microbiol Res.* 2017;11(15):620-655.
46. Nader-Macias ME. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *J Ind Microbiol Biot.* 2008;35(11):1387-1395.
47. Frizzo LS, Soto LP, Zbrun MV, Signorini ML, Bertozzi E, Sequeira GI. Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves *Livest Sci.* 2011;140:246-252.
48. Frizzo LS, Soto LP, Bertozzi E, Sequeira G, Marti LE, Rosmini MR. Evaluación in vitro de las capacidades probióticas microbianas

- orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias*. 2006;5:1-2
49. Li Q, Liu X, Dong M, Zhou J, Wang Y. Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *Int J Agric Policy Res*. 2015;3(2):84-92.
50. Wadstrom T, Anderson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Bacteriol*. 1987;62:513-520
51. Devi SM, Archer AC, Halami PM. Screening, characterization and in vitro evaluation of probiotic properties among lactic acid bacteria through comparative analysis. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2015;7(3):181-192.
52. Ehrmann MA, Bauer J, Vogel RF. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol*. 2002;92:966-975.

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)