

ARTÍCULO ORIGINAL

Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos

Lilian Sánchez^I, Michele Omura^{II}, Adams Lucas^{II}, Tania Pérez^I, Marisleidys Llanes^I,
Celia de Luce Ferreira^{II}

^ICentro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Apartado 10, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: lilian@censa.edu.cu. ^{II}Universidad Federal de Vicosá, Brasil.

RESUMEN: Se caracterizaron *in vitro* 17 cepas de *Lactobacillus* spp. aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos, para seleccionar las mejores como candidatos probióticos y realizarles posteriormente los estudios *in vivo*. A todos los aislados se les realizó la prueba de la catalasa, la tinción de Gram y se estudió sus características culturales para su identificación preliminar. Se evaluó su capacidad probiótica mediante pruebas *in vitro* como fueron el crecimiento a diferentes temperaturas (30, 37 y 45°C), pH (2,5; 3,4; 5,4; 6,4) y capacidad de acidificación del medio de cultivo. Se preseleccionaron 10 cepas de *Lactobacillus* spp. que crecieron en todas las condiciones evaluadas. Se destaca el crecimiento de células viables de 6,7-10 log UFC/ml que disminuyeron el pH hasta valores de 3,2-4. A continuación se evaluaron sus características funcionales: la tolerancia al jugo gástrico artificial y a sales biliares (0,3% de Oxgall), así como su actividad de antagonismo microbiano ante cuatro agentes patógenos. Se obtuvo que cuatro cepas de *Lactobacillus* spp. mostraron potencialidades probióticas por su resistencia al tratamiento con sales biliares hasta las 24 horas, y con jugo gástrico artificial se observó crecimiento microbiano de 3,52-6,5 Log UFC/ml a los 90 minutos; además, inhibieron el crecimiento de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Se evaluó el perfil de susceptibilidad a 13 antimicrobianos y la mayoría de las cepas reveló resistencia a tres de ellos.

Palabras clave: *Lactobacillus* spp., probiótico, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*.

Strains of *Lactobacillus* spp. with probiotic capacity isolated from the intestinal tract of calves

ABSTRACT: Seventeen strains of *Lactobacillus* spp. isolated from the intestinal tract of neonatal calves were characterized *in vitro* to select the best ones as probiotic candidates and to study them *in vivo*. All the isolates were tested for catalase, Gram stained, and their cultural characteristics studied for their preliminary identification. Their probiotic capacity, such as growth at different temperatures (30, 37, and 45°C), pH (2.5, 3.4, 5.4, 6.4), and their capacity to acidify the culture medium, were assessed *in vitro*. Ten strains of *Lactobacillus* spp. growing under all the conditions tested were preselected, standing out growths of viable cells of 6,7-10 log CFU/ml that reduced pH values to 3.2-4.0. Then, their functional characteristics such as tolerance to artificial gastric juice and to bile salts (0.3% Oxgall), and their microbial antagonism activity against four pathogens of veterinary interest were evaluated. The result obtained showed probiotic potential in four of the *Lactobacillus* spp. strains tested for their resistance to treatment with bile salts until 24 hours and the microbial growth of 3.52-6.5 log CFU/ml with artificial gastric juice observed after 90 minutes; they also inhibited the growth of *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. The profile of susceptibility to 13 antimicrobials was evaluated, and most of the strains revealed resistance to three of them.

Key words: *Lactobacillus* spp., probiotics, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades entéricas son de gran importancia para la industria pecuaria, debido a la pérdida de productividad, al incremento de la mortalidad y la contaminación de productos para consumo humano (1, 2). Es por ello que en los sistemas de producción animal intensiva se introducen nuevos productos y tecnologías que permiten la obtención de alimentos más seguros y que al mismo tiempo contribuyan a producciones con una sostenibilidad económica adecuada (3, 4).

Los alimentos destinados para la producción animal requieren, además del empleo de fórmulas adecuadas para la satisfacción de los requerimientos nutricionales, del uso óptimo de los mismos y un mejoramiento en la salud de los rebaños (5). Esto se puede lograr, entre otras medidas, con la aplicación de los denominados promotores del crecimiento y aditivos alimentarios, los que han cobrado fuerza en su uso, con énfasis en que tales aditivos cumplan con su requisito primario de elevar la eficiencia productiva de los animales (6).

Los productos conocidos como probióticos se utilizan cada vez con mayor fuerza en los sistemas intensivos de producción animal y el éxito de su uso, aunque variable en algunos casos, permite afirmar que los mismos se han convertido en una herramienta indispensable para los productores y constituyen una solución alternativa promisoría que cobra cada día mayor interés (7, 8).

El desarrollo de este tipo de producto obedece mayormente a la necesidad de sustituir el empleo de antibióticos en la alimentación animal, los cuales son usados para mantener un buen balance en la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI) y para eliminar microorganismos patógenos, con el objetivo de reducir enfermedades gastrointestinales frecuentes en animales (2, 9).

Se conoce que el TGI de los terneros sanos está colonizado por una microbiota compleja, proveniente en gran parte de la madre (10). Cuando los terneros jóvenes son apartados de sus madres y alojados en sistemas intensivos, la posibilidad de adquirir microbiota natural autóctona se reduce y el intestino puede ser fácilmente colonizado por microorganismos patógenos. Los terneros son muy susceptibles a sufrir bacteriosis entéricas, lo que ocasiona una ineficiente digestión y absorción de nutrientes, además de una demora en el crecimiento, particularmente en los primeros 28 días de vida, después de los cuales el intestino alcanza su actividad funcional (10).

Por esto, resulta importante incorporar microorganismos nativos en la dieta de estos animales para mantener el balance microbiano. Los probióticos pueden soportar condiciones específicas ocurridas en el TGI; estos pueden resistir por más de 4 horas a las enzimas proteolíticas, los bajos valores de pH (1,8-3,2) prevalentes en el estómago y la concentración de bilis, jugos pancreáticos y mucus presentes en el intestino delgado (11, 12), de forma tal que los microorganismos colonizadores lleguen en estado viable y en cantidades suficientes, una vez que han superado las barreras ácida y biliar en el tracto digestivo (13). Los resultados de estas pruebas también pueden predecir la capacidad *in vivo* de las cepas; de ahí que el éxito de un probiótico depende en gran medida de realizar una buena selección *in vitro* (14).

El objetivo del presente trabajo fue realizar el aislamiento de cepas *Lactobacillus* spp. a partir del TGI de terneros neonatos y su caracterización como probiótico mediante pruebas *in vitro*, como la resistencia a sales biliares y al jugo gástrico, así como su capacidad de producir sustancias inhibitorias ante cuatro patógenos de importancia veterinaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios y condiciones de cultivo

Las bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas se cultivaron en caldo o agar Mann Rogosa Sharp (MRS, BioCen, Cuba) a 37°C durante 24-48 horas, y para el crecimiento en agar se emplearon jarras de anaerobiosis bajo una atmósfera de 10% de CO₂. Para la conservación de cada aislado se utilizó caldo MRS con 30% de glicerol y el medio conformado por leche descremada (10%) y extracto de levadura (1%) a -20°C.

Obtención y procesamiento de la muestra

Las cepas de los microorganismos se obtuvieron a partir de la saliva y de diferentes partes del intestino (duodeno, yeyuno y colon) de terneros sanos, entre 5 y 25 días de vida, y de la vagina de vacas próximas al parto. Los animales procedían de la vaquería del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

Las muestras se sembraron en el medio MRS líquido durante 6-8 horas y posteriormente se realizaron diluciones seriadas en solución tampón fosfato-salino (PBS). Se sembraron en MRS agar a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 48 horas. Se escogieron aquellas placas en las que el número total de colonias crecidas se encontraba entre 100 y 150; se toma-

ron entre 10 y 12 colonias equivalentes a la raíz cuadrada del total de ellas; de esta manera se garantizó tomar muestras representativas de los microorganismos presentes (15).

Selección e identificación de las cepas

Se seleccionaron las cepas de lactobacilos por las características fenotípicas: la morfología de sus colonias y la observación microscópica después de ejecutada la coloración de Gram a las bacterias. Se realizaron las pruebas de la catalasa y la producción de ácido a partir de glucosa (16).

Capacidad fermentativa

Se realizó el crecimiento de un cultivo fresco de 18 horas de cada cepa en caldo MRS sin extracto de carne y se sustituyó la glucosa por los siguientes carbohidratos al 1%: D-glucosa, Galactosa Asculina, Xilosa, Manosa, Sacarosa, Melibioza, Maltosa, Almidón, Ramnosa, Manitol, Salicin, Melizitosa, y se le adicionó el indicador bromocresol púrpura. Todos fueron incubados a 37°C durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis; posteriormente, se efectuó la lectura de los resultados (16, 17).

Crecimiento en condiciones hostiles

A diferentes pH: se cultivaron las cepas aisladas en caldo MRS al cual se le ajustó el pH inicial a pH 2,5; 3; 4; 5,4; 6,4. Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 24-48 horas.

A diferentes temperaturas: se cultivaron las cepas en caldo MRS y se incubaron a 30, 37, y 45°C durante 24-48 horas.

Para evaluar el crecimiento se determinó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro (T90+ UV/VI; PG Instruments, Ltd) a 600nm y se realizó conteo celular a las variantes con valores de D.O $\geq 3,0$.

Capacidad de acidificación del medio: las cepas se cultivaron en tubos cerrados con caldo MRS durante 24 horas a 37°C bajo condiciones estáticas, con tres réplicas para cada una. Se tomaron muestras para medir el pH de los cultivos y, como criterio de selección, se eligieron aquellas cepas que disminuyeron el pH hasta valores $\leq 4,5$.

Funcionalidad de las cepas seleccionadas por la resistencia a sales biliares, jugo gástrico y antagonismo a patógenos de referencia

Para la ejecución de los ensayos de resistencia a jugo gástrico artificial y a sales biliares, cada uno de los aislados seleccionados se activaron en caldo MRS por 24 horas. Después del crecimiento, se centrifugaron

a 750 g por 15 minutos, a 4°C, en una centrifuga Beckman GS -6R. El sobrenadante se descartó y el concentrado de células se resuspendió en caldo MRS. El concentrado celular se ajustó a una DO $0,9 \pm 0,2U$, mediante medición a 600nm (DO_{600nm}) en espectrofotómetro. El concentrado de cada cultivo se utilizó para realizar el ensayo de resistencia a jugo gástrico y a sales biliares (18).

Ensayo de resistencia a jugo gástrico

El 5% del concentrado celular de cada aislado seleccionado se inoculó en 10 ml de jugo gástrico artificial (2 g/l NaCl, pepsina 3,2 g/l (Merck KGaA, Alemania), pH 2,5), de acuerdo con lo reportado por Neumann (19). Posteriormente, se incubaron a 37°C y el conteo de células viables se efectuó a 0, 15, 30, 60 y 90 min. El ensayo se realizó por triplicado.

La tolerancia se estimó al comparar los conteos de células viables en MRS con y sin jugo gástrico artificial. El porcentaje de sobrevivencia se calculó según lo descrito por Kociubinski *et al.* (20) donde: $R = (\log UFC/ml_{CJG}) / (\log UFC/ml_{SjG}) \times 100$, a los 90 minutos de tratamiento. Los resultados se basaron en el cálculo de las medias de tres experimentos independientes. Los aislados se clasificaron como resistentes por encima del 67% (R), tolerantes entre 34,0 - 66,9% (T) y sensibles por debajo de 33,9% (S).

Ensayo de resistencia a sales biliares

Se inoculó el 5% del concentrado celular ajustado de cada cepa en estudio en caldo MRS con y sin 0,3% de sales biliares (*Bacto - Oxgall, Difco*[®], EUA). Todas las variantes se incubaron a 37°C y se midió el crecimiento celular (DO_{600nm}) mediante un espectrofotómetro, a intervalos de 2 h, hasta las 24 h de incubación (21). Una bacteria se considera resistente a las sales biliares cuando presenta $DO_{600nm} \geq 0,3$ después de 6h de incubación en presencia de 0,3% de sales biliares. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Ensayo de antagonismo microbiano

Origen, mantenimiento y activación de los microorganismos patógenos indicadores

Como microorganismos patógenos indicadores se utilizaron *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella* sp. (ATCC 6539) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), obtenidos de la colección de cultivos de la UFVCC, del Laboratorio de Culturas Lácticas do BIOAGRO (Universidad Federal de Viçosa). Los aislados se conservaron a - 80°C en caldo BHI (*Brain Heart Infusion Difco*[®], EUA).

Determinación de antagonismo de *Lactobacillus* spp. aislados ante microorganismos patógenos por la técnica de spot

Los lactobacilos aislados, previamente activados en caldo MRS, se inocularon en placas de Petri con agar MRS (1,5%), según la técnica descrita por Fleming *et al.* (22). Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C por 48 horas. Después de la formación de colonias visibles, se vertieron sobre las placas 10 ml de agar semisólido de BHI (0,7%), que contenían 0,01 ml de la cepa patógena indicadora con una concentración de 10^7 - 10^6 UFC/ml y luego se incubaron a 37°C por 48 horas. La actividad antagonista se verificó por la formación de zonas transparentes alrededor de las colonias mayores de 1 mm. Para verificar la naturaleza de inhibición el mismo ensayo se realizó con el medio MRS tamponado con 2 g/l de bicarbonato de sodio (23).

Susceptibilidad a agentes antimicrobianos

Se utilizó el método modificado de difusión en disco impregnado (Sensidisc DME®, Sao Paulo, Brasil), y se sustituyó el agar Müeller Hilton por agar MRS. Los antimicrobianos probados fueron: ceftriaxona (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 µg), sulfonamidas (300 µg), vancomicina (30 µg), ampicilina (30 µg), amoxicilina (10 µg), ampicilina (10 µg), cefalexina (30 µg), cefalotina (30 µg). Como control se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Una alícuota de 0,1- 0,2 ml de cada cepa, correspondiente a una concentración celular de 10^8 - 10^9 UFC/ml, se distribuyó en placas de Petri que contenían agar MRS para *Lactobacillus* spp. y en BHI para la cepa utilizada como control, *Staphylococcus aureus*. Para ello se empleó la técnica de esparcimiento superficial del inóculo y después se colocaron los discos de los antibióticos. Se incubaron por 48 horas bajo condiciones de anaerobiosis y se midieron los halos de inhibición. Los aislados fueron clasificados para cada uno de los antibióticos como sensibles (S), moderadamente sensible (MS) y resistentes (R), de acuerdo con Charteris *et al.* (24).

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se empleó el *Software* estadístico INFOSTAT versión 1 (25). Para el tratamiento estadístico de los datos se realizaron análisis de varianza según diseño completamente aleatorizado; para verificar diferencias se utilizó la prueba de comparación de Duncan (26).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un total de 17 cepas del género *Lactobacillus* spp., aisladas mayormente del yeyuno (once), del duodeno (cuatro) y las restantes del colon (tres), con rasgos fenotípicos que distinguen las BAL de otros microorganismos como bacilos Gram-positivos, catalasa negativa y anaerobios facultativos. La identificación a nivel de grupo se realizó por medio de los patrones de fermentación de azúcares y producción de CO₂ a partir de glucosa: en el grupo A se clasificaron como homofermentativos las cepas M1, M2, M5, M7, M12, M15, M17 y en el grupo B como heterofermentativos facultativos las 10 cepas restantes.

En la Tabla 1 se muestran los valores medios del crecimiento microbiano de todos los aislados a partir del intestino de terneros neonatos ante diferentes pH. Todos los aislados crecieron satisfactoriamente en todas las condiciones evaluadas; sin embargo, se destacan con mayor crecimiento 11 aislados (M1, M2, M5, M7, M8, M9, M10, M11, M12, M14, M15) donde se reportaron rendimientos de células viables de 6,7- 9,2 log UFC/ml en la variante MRS agar con pH 6,4 y de 3,0- 4,0 log UFC/ml a pH 2,5.

En todas las temperaturas evaluadas se observó crecimiento bacteriano de los 17 aislados (Tabla 2), las cepas M1, M2, M5, M7, M8, M10, M11, M12, M14, M15, M16, mostraron mayores rendimientos de células viables entre 9,3-10 log UFC/ml a temperaturas de 37°C. Estas cepas fueron productoras de ácido en el medio MRS corroborado por valores de pH de 3,5-4. Unido a este criterio, y con los anteriores resultados en cuanto al crecimiento bacteriano, se seleccionaron 10 cepas para evaluar sus propiedades probióticas.

Al realizar el tratamiento con jugo gástrico artificial a las cepas seleccionadas hasta los 90 minutos de tratamiento, 6 cepas de 10 fueron capaces de resistir en la medida que transcurrió el tiempo (Fig. 1). Se observó reducción del crecimiento 2,2- 2,9 log en las cepas evaluadas al compararlas con el grupo control compuesto de las mismas cepas sin tratamiento y posteriormente crecidas en el medio MRS. Se encontraron porcentajes de sobrevivencias para las cepas M1 41,41% (T); M2 62,71% (T); M5 74,69% (R); M7 67,06% (R); M8 40,56% (T) y M10 73,01% (R).

Estas bacterias aisladas del intestino de terneros fueron capaces de traspasar la primera barrera fisiológica del tracto digestivo que corresponde a valores bajos de pH y a la acción de enzimas proteolítica, en este caso la pepsina.

TABLA 1. Crecimiento de las cepas de *Lactobacillus* ssp. aisladas de terneros, en diferentes pH hasta las 48 horas de crecimiento. n=3./ *Growth of Lactobacillus spp. strains isolated from calves at different pH until 48 hours.*

| No. de cepas | DO pH 2,5 | DO pH 3 | DO pH 4 | DO pH 5,4 | DO pH 6,4 |
|--------------|--------------|------------|-------------|--------------|--------------|
| M 1 | 4,72 ±0,02 | 4,0 ±0,07 | 6,11±1,47 | 6,44±1,45 | 6,72±0,01 |
| M 2 | 3,55 ±0,15 | 4,62 ±1,47 | 5,46±1,45 | 6,97±0,01 | 7,26±0,05 |
| M 3 | 1,36 ±0,50 | 3,77 ±0,34 | 4,24±1,08 | 4,47±0,45 | 5,3±0,01 |
| M 4 | 1,06 ±0,06 | 3,21 ±0,09 | 4,42± 0,05 | 6,81±1,47 | 6,53±0,01 |
| M 5 | 4,43 ±0,045 | 4,75 ±1,05 | 4,53± 0,07 | 7,18±1,47 | 8,66±0,01 |
| M 6 | 1,73 ±0,108 | 3,73 ±0,47 | 4,48± 0,06 | 5,06±0,0 5 | 6,67±0,01 |
| M 7 | 3,79 ±0,053 | 3,61 ±0,03 | 4,37± 0,0 5 | 5,98±0,0 5 | 6,5±0,01 |
| M 8 | 3,39 ± 0,07 | 3,52 ±0,35 | 4,19± 0,01 | 4,86±0,0 5 | 5,62±0,01 |
| M 9 | 3,43 ±0,035 | 3,92 ±0,20 | 4,81± 0,07 | 4,9±0,0 5 | 9,36±0,01 |
| M 10 | 3,97±0,045 | 3,67 ±0,07 | 5,49±0,01 | 6,78±0,0 5 | 9,34±0,01 |
| M 11 | 3,77±1,3 | 3,36 ±0,95 | 5,26±0,01 | 4,16±0,0 5 | 7,9±0,01 |
| M 12 | 3,24 ±0,9 | 3,51 ±0,57 | 6,44±0,01 | 4,21±0,0 5 | 8,09±0,01 |
| M 13 | 1,68 ±0,95 | 3,24 ±0,65 | 3,81±0,01 | 4,9±0,01 | 6,0±0,01 |
| M14 | 4,01 ±0,5 | 3,98 ±0,05 | 5,27±0,01 | 5,54±0,01 | 8,0 ±0,01 |
| M 15 | 3,21 ±0,05 | 5,08 ±0,09 | 6,17±0,01 | 4,7±0,01 | 8,94±0,01 |
| M 16 | 1,15±0,05 | 3,44 ±1,05 | 5,05±0,01 | 4,71±0,01 | 6,41±0,01 |
| M 17 | 2,5 ±0,05 | 4,5 ±1, 03 | 4,75±0,01 | 3,97±0,01 | 5,42±0,01 |

DO: Densidad óptica

TABLA 2. Crecimiento de las cepas de lactobacilos a diferentes temperaturas hasta las 48 horas de crecimiento./ *Growth of the lactobacillus strains at different temperatures until 48 hours.*

| Muestras | DO _{600nm} | | |
|----------|---------------------|--------------|-------------|
| | T 30°C | T 37°C | T 45°C |
| M 1 | 6,55 ± 0,3 | 7,2 ± 0,5 | 4,30 ± 1,2 |
| M 2 | 4,80 ± 0,97 | 7,50 ± 0,3 | 5,33 ± 0,08 |
| M 3 | 3,13 ± 0,05 | 4,9 ± 0,12 | 1,83 ± 0,5 |
| M 4 | 1,10 ± 0,076 | 5,73 ± 0,3 | 1,00 ± 0,5 |
| M 5 | 3,12 ± 0,10 | 6,81 ± 0,55 | 4,130 ± 0,5 |
| M 6 | 1,80 ± 0,06 | 2,68 ± 0,03 | 1,28 ± 0,5 |
| M 7 | 3,12 ± 0,07 | 6,15 ± 0,03 | 3,30 ± 0,5 |
| M 8 | 4,29 ± 0,0 5 | 6,70 ± 0,03 | 3,84 ± 0,5 |
| M 9 | 1,91 ± 0,076 | 3,15 ± 0,03 | 1,42 ± 0,5 |
| M 10 | 3,45 ± 0,076 | 6,34 ± 0,03 | 4,20 ± 0,5 |
| M 11 | 4,62 ± 0,076 | 6,00 ± 0,03 | 5,85 ± 0,5 |
| M 12 | 3,274 ± 0,076 | 7,211 ± 0,03 | 3,70 ± 0,5 |
| M 13 | 6,547 ± 0,076 | 2,589 ± 0,03 | 1,30 ± 0,5 |
| M 14 | 4,794 ± 0,076 | 6,2 ± 0,03 | 5,33 ± 0,5 |
| M 15 | 3,129 ± 0,076 | 5,77 ± 0,03 | 3,83 ± 0,5 |
| M 16 | 6,094 ± 0,076 | 6, 23 ± 0,03 | 4,99 ± 0,5 |
| M 17 | 2,12 ± 0,03 | 3,68 ± 0,03 | 2,13 ± 0,5 |

DO_{600nm}: Densidad óptica a 600 nm

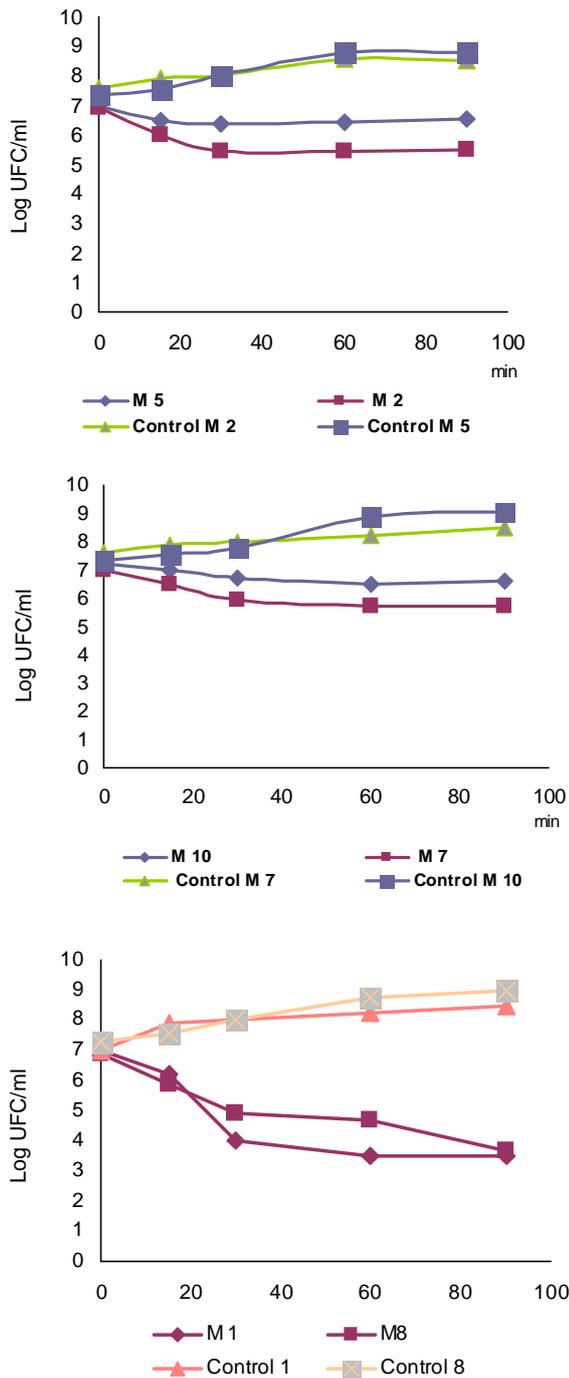


FIGURA 1. Sobrevivencias al jugo gástrico artificial pH 2 (Log CFU/ml), de las cepas de *Lactobacillus* spp. seleccionadas, después de los 90 min de tratamiento. Los datos representan las medias de dos réplicas independientes./ *Survival of the selected Lactobacillus spp. strains in the presence of artificial gastric juice at pH 2 (log CFU/ml) after 90 minutes of exposure to treatment. The data represent the means of two independent replicas.*

En este sentido, Sandes (27) demostró que de los aislados obtenidos a partir de heces fecales de terneros, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Weissella*, el 15% fueron catalogados como sensibles, el 37,5% moderadamente sensibles y el 47,5% se consideraron como resistentes a los jugos gástricos, mientras que los aislados orales fueron el 50% sensibles, 46,5% moderadamente sensibles y solo el 3,5% fueron resistentes. Los resultados obtenidos en el presente trabajo se corroboran con los reportados por otros autores (28, 29), quienes observaron que las bacterias de origen intestinal tienden a ser más resistentes a los ácidos estomacales.

Las bacterias que sobreviven a las condiciones fisiológicas de este órgano luego deberán resistir la segregación de sales biliares en el duodeno.

Las sales biliares representan moléculas anfipáticas con actividad antimicrobiana que actúan como detergentes, producen daño a nivel de la membrana celular y en la estructura del ADN bacteriano (30). La concentración intestinal de los ácidos biliares en el tracto humano es de aproximadamente 0,3%, mientras que en el tracto intestinal de los terneros se conoce poco respecto a este parámetro. Se reporta que la tasa de resistencia a las sales varía entre bacterias ácido lácticas y entre cepas de la misma especie (31). Cuando las cepas aisladas fueron sometidas a la concentración de sales biliares de 0,3% de Ovgall, cuatro de estos aislados de lactobacilos, provenientes de terneros neonatos, resistieron este tratamiento; se encontraron valores medios de DO, mayores 0,3 a las 6 horas de tratamiento (Fig. 2) y, al extenderse por 24 horas resultaron resistentes a esta concentración en las pruebas *in vitro* realizadas, donde se encontraron valores de DO desde 0,9-2; los mejores resultados se hallaron en las cepas M5 y M7 que difirieron significativamente de las restantes. Un factor que puede favorecer la sobrevivencia de estos microorganismos *in vivo* en el duodeno es la presencia de alimentos, ya que las bacterias pueden no estar expuestas a las sales biliares y de esta forma la toxicidad sobre las membranas se podría evitar.

McCoy y Gilliland (32) compararon el crecimiento de lactobacilos en presencia y ausencia de Ovgall 0,3% y observaron que cuatro aislados de *Lactobacillus reuteri* presentaron un crecimiento más rápido con relación a las demás cepas testadas, y se consideraron como mejores probióticos; además, comprobaron el tiempo necesario para aumentar el valor de DO 600nm a 0,3. Por otra parte, Malveira (29) demostró que en muestras aisladas de terneros recién nacidos, el 100%

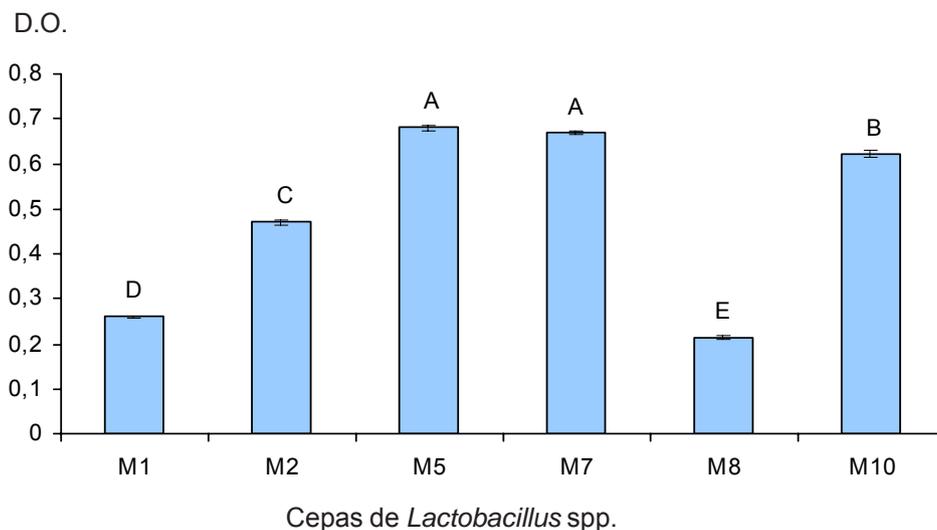


FIGURA 2. Resistencia a sales biliars de cepas de lactobacilos aisladas de terneros. Crecimiento en presencia de Oxgall al 0,3%. Cada columna representa las medias de tres réplicas y las barras representa el error estándar./ *Resistance to bile salts of lactobacillus strains isolated from calves. Growth in the presence of 0.3% Oxgall.*

de los lactobacilos fueron resistentes a concentraciones de sales biliars desde 0,3 a 0,5%, la resistencia disminuyó a 92,3% en concentraciones de sales biliars de 1%; sin embargo, en cepas aisladas de terneros de tres meses de edad la resistencia a estas concentraciones fue menor. Las cepas M5, M7 y M10 aisladas de terneros de 15 días de edad resultaron las más resistentes o tolerantes a las sales biliars.

Cuando se realizó la prueba de inhibición *in vitro* ante los cuatro patógenos indicadores Gram positivo y Gram negativo, quedó demostrada la acción antimicrobiana de las cepas seleccionadas (Tabla 3) con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las

cepas de lactobacilos evaluados; la cepa M5 mostró los mayores halos de inhibición.

Para la aplicación en los animales de las BAL la actividad antagonista es un criterio fundamental para la selección de nuevas cepas (34), ya que reducen la frecuencia de las infecciones intestinales y de las mucosas (35). Es importante destacar la actividad antagonista de las cepas evaluadas ante *E.coli*, agente infeccioso que principalmente afecta a los terneros en las primeras semanas de vida y provoca las diarreas y, por consiguiente, se reducen las tasas de crecimiento, hay altas morbilidad y mortalidad, por lo que causa graves daños a los productores (26).

TABLA 3. Resultados de la actividad antagonista de cepas de *Lactobacillus* spp. frente a cepas indicadoras patógenas (Medias de los HI en mm, $n=3$)./ *Results of the antagonistic activity of Lactobacillus spp. strains in front of pathogenic indicator strains.*

| Cepa Indicadora | Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. (HI en mm) | | | | | |
|-------------------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | M1 | M2 | M5 | M7 | M8 | M10 |
| <i>E.coli</i> | 29,43±0,25 a | 15,36±0,1 b | 32,8±0,15 c | 26,75±0,03 d | 22,41±0,03 e | 25,5±0,02 f |
| <i>S. aureus</i> | 21,76±0,02 a | 25,14±0,02 b | 31±0,03 c | 24,5±0,06 d | 23,05±0,01 e | 21,12±0,02 f |
| <i>Salmonella</i> sp | 20,10±0,03 a | 11,24±0,03 b | 32,62±0,04 c | 16,22±0,02 d | 28,4±0,06 e | 26,81±0,03 f |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 21,41±0,05 a | 18,47±0,05 b | 32,09±0,15 c | 17,6±0,15 d | 26,03±0,3 e | 27,2±0,15 f |

HI: halos de inhibición; letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,05$

Otro resultado significativo es el efecto inhibitorio de las cepas evaluadas ante *Salmonella* spp., este agente infecta a los terneros entre 10 días y 3 meses de edad (36). Las infecciones por *Salmonella* spp. se han incrementado y, a pesar que varían la severidad y la frecuencia de los brotes de la enfermedad, los resultados son generalmente los mismos: devastadores. El tratamiento de *Salmonella* spp. incluye una terapia de soporte agresiva con fluidos orales e intravenosos, protectores del tracto gastrointestinal, medicamentos antiendotoxinas y antibióticos (10), por lo que la aplicación de los productos probióticos puede ayudar a devolver la microbiota normal del TGI en los terneros afectados.

La naturaleza de la acción inhibitoria predominante se relacionó con la presencia de ácidos orgánicos (Tabla 4), pues de las seis cepas evaluadas, cuatro perdieron esta capacidad al ser neutralizadas con bicarbonato de sodio. Los ácidos orgánicos, principalmente el ácido láctico, constituyen el principal producto del catabolismo de los carbohidratos y contribuyen al descenso de pH, creando un ambiente hostil para la mayoría de los microorganismos. Los efectos perjudiciales de estas moléculas en los microorganismos sensibles se resumen en alteración de la permeabilidad celular, alteración del potencial de membrana y subsiguiente alteración de la fuerza protón motriz, así como descenso del pH intracelular que ocasiona la alteración de funciones celulares importantes (37).

Las cepas M5 y M7 en el medio tamponado presentaron halos de inhibición ante los patógenos indicadores, pues al parecer producen otras sustancias inhibitorias diferentes de los ácidos, como bacteicina, péptidos de bajo peso molecular. Estos ejercen su actividad antimicrobiana por diferentes mecanismos que incluyen desestabilización de membrana, lisis celular, degradación de macromoléculas como ácidos nucleicos e inhibición de procesos biológicos

como síntesis de proteínas, ADN, ARN y peptidoglicano (38). Dado los resultados obtenidos sería recomendable continuar con otros ensayos específicos para esclarecer los compuestos presentes en cada una de ellas.

El perfil de sensibilidad a antibióticos, de cada una de las cepas seleccionadas, mostró variabilidad en su comportamiento (Tabla 5). La mayoría de las cepas seleccionadas mostró resistencia ante los antimicrobianos como Sulfonamida, Oxacilina y tres de ellas a la Vancomicina.

La ausencia de resistencias adquiridas a antibióticos es uno de los primeros criterios de seguridad que se deben controlar en los candidatos a probióticos (39). Se ha descrito que las bacterias lácticas presentan resistencia a la amikacina, oxalina y vancomicina. Muchas veces los mecanismos no son transferibles y se considera para el género de *Lactobacillus* como resistencia intrínseca (40, 41). Es importante evaluar si la resistencia a antibióticos encontrada en algunas BAL se debe a elementos móviles o a elementos cromosomales, en cuyo caso no presentarían riesgos.

En general, se obtuvieron cuatro cepas aisladas del TGI de terneros neonatos sanos (M2, M5, M7, M10) pertenecientes al género *Lactobacillus* que mostraron la mayor tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal como: crecimiento en jugo gástrico artificial, concentración de sales biliares, actividad antagonista a patógenos y alta capacidad de crecimiento.

Los resultados obtenidos *in vitro* demuestran que las cuatro cepas poseen propiedades probióticas, por lo que se podrían utilizar como aditivos microbianos destinados a la alimentación de terneros neonatos, para controlar su microbiota intestinal benéfica, estimular su sistema inmune, inhibir el crecimiento de patógenos

TABLA 4. Resultados del antagonismo con MRS tamponado de las cepas de *Lactobacillus* spp. frente a cepas indicadores de patógenos. Naturaleza de la inhibición (Medias de dos réplicas; HI en mm) n=3./ *Results of the antagonism with buffered MRS of Lactobacillus spp. strains and pathogenic indicator strains. Nature of the inhibition*

| Cepa Indicadora | Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. (HI en mm) | | | | | |
|-------------------------------|--|-----|-----------|------------|---|------------|
| | M 1 | M 2 | M 5 | 7 | 8 | 10 |
| <i>E.coli</i> | - | - | 25,5±0,20 | 15,2±0,17 | - | - |
| <i>S. aureus</i> | - | - | 30 ±0,15 | 30 ±0,07 | - | - |
| <i>Salmonella</i> spp. | - | - | - | - | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | - | - | 24,5±0,07 | 10,3 ±0,02 | - | 13,4 ±0,07 |

HI- halos de inhibición

TABLA 5. Resultados del perfil de sensibilidad a antimicrobianos de las cepas de *Lactobacillus* spp. n=2./ *Results of the susceptibility profile of Lactobacillus* spp. strains to antimicrobial agents

| AGENTE ANTIMICROBIANO | Cepas (diámetro de los HALOS, mm) | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | M1 | M2 | M5 | M7 | M8 | M10 |
| 1. AMICACINA AMI 30 | MS 10,5 | S 30 | S 30 | S 24,5 | S 13,5 | S 16,34 |
| 2. AMOXICILLINA AMC 30 | S 30,4 | S 30,5 | S 30 | S 30,5 | S 30 | S 30 |
| 3. AMPICILLINA AMP 10 | S 35 | S 30 | S 30 | S 30 | S 30 | S 30 |
| 4. CEFALOTINA CFL 30 | S 30 | S 30 | MS 10,7 | S 27,3 | S 30 | S 30 |
| 5. CIPROFLOXACINA CIP 05 | S 20 | S 27,5 | MS 9,5 | S 19,8 | S 29,4 | S 30 |
| 6. CLORAFENICOL CLO 30 | S 27 | S 30 | S 30 | S 28,4 | S 30 | S 30 |
| 7. ERITROMICINA ERI 15 | S 30 | S 30 | S 28 | S. 27,5 | S. 27,5 | S 30 |
| 8. GENTAMICINA GEN 30 | S 10 | S 30 | S 24 | S 15 | S 15 | S 16 |
| 9. MEPROPENE MPM 10 | S 30 | S 20 | S 30 | S 30 | S 30 | S 30 |
| 10. OXACILINA OXA 01 | S 30 | MS 14 | R | R | R | S 30 |
| 11. PENICILINA PEN10 | S 30 | S 30 | S 30 | S 30 | S 30 | S 30 |
| 12. SULFONAMIDA SUL 300 | R | MS 15 | R | R | R | R |
| 13. VANCOMICINA VAN 30 | S 16,3 | MS 10,5 | S 30 | R | R | R |

S-sensible; MS-medianamente sensible; R-resistente

oportunistas e incrementar los índices bioproductivos. Sin embargo, se requieren estudios *in vivo* para validar sus efectos benéficos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al proyecto CAPES MES-CUBA 152/12.

REFERENCIAS

1. Frizzo LS, Soto LP, Zbrun MV, Signorini ML, Bertozzi E, et al. Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal

microbial balance of artificiall y reared calves. *Livest Sci.* 2011;140:246-252.

2. Brizuela MA, Serrano PA, Delgado G, Bueno G, Pérez H, TrujilloLE, et. al. Desarrollo de productos probióticos y mezclas simbióticas para su empleo en alimentación y salud animal. Memorias del I Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria del 3 al 6 de Mayo del 2011. La Habana. Cuba

3. Lavielle J. Efecto del Glutave en la respuesta humoral y desempeño productivo de gallinas ponedoras y pollos de engorde. Tesis presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Habana. 2007.

4. Pedroso M, Lavielle J, Soler DM, Sánchez L. Beta 1-3 glucano particulado lineal y otras formulaciones basadas en Beta glucano, su efecto en bovinos y aves. *Rev Salud Anim.* 2012;34(2):70-77.
5. García M, López Y, Carcassés M. Empleo de probióticos en los animales. 2012. <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulos/empleo-probioticos-animales-t4125/165-p0.htm>. Revisado 20 de Noviembre de 2013.
6. Brizuela MA, Serrano P, Almazán O, Rodríguez JA, Camps D, Bueno G, et al. Probióticos y enzimas. Una alternativa natural al empleo de antibióticos ICIDCA, 2009; XLIII(2):30-39.
7. Rajput IR, Li WF. Potential role of probiotics in mechanism of intestinal immunity. *Pak Vet J.* 2012;32:303.
8. Ferreira CL. Grupos de bacterias lácticas e aplicação tecnológicas de bacterias probióticas. En Ferreira CL (ed). *Prebióticos e probióticos Atualização e Prospecção.* Rubio LTA, RJ. Brasil. 2012. p. 1-27.
9. Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JN, et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2012;307:1959-1969.
10. Cardozo JA, Flórez H. Capítulo 1. Manejo de la nutrición y la salud de los terneros neonatos en lecherías especializadas. En: Rodríguez F, Carvajal Fredy (eds). *Desarrollo de probióticos para ganaderías productoras de leche.* Corpoica. Colombia. 2011: p.98.
11. Collado MC. Role of probiotics in health and diseases. En: Lee YK, Salminen S (eds) *Handbook of probiotics and prebiotics*, 2nd edn. Wiley, Hoboken, 2009. NJ, pp. 257-259.
12. Ferreira CL, Salminen S, Grzeskowiak L, Brizuela MA, Sánchez L, Carneiro H, et al. Terminology concepts of probiotic and prebiotic and their role in human and animal health. *Rev Salud Anim.* 2011;33(3):137-139.
13. Chaucheyras-Durand y Durand H. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes.* 2010;1:3-9
14. Rondón AJ. Obtención de biopreparados a partir de lactobacilos autóctonos del tracto digestivo de pollos y evaluación integral de las respuestas de tipo probióticas provocadas en estos animales. Tesis presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal, Cuba. 2009.
15. Chamba JF, Duong C, Fazel A, Prost F. Sélection des Souches de Bactéries Lactiques. *Bactéries Lactiques.* 1994;1:501-502.
16. Kandler O, Weiss N. Regular Nonsporing Gram-Positive Rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 9^{na} Ed. The Williams and Wilkins C. Baltimore. 1994;209-1234
17. Dimitanova SP, Bakalov BV, Aleksandrova-Georgieva RN, Donova ST. Shenotypic and molecular identification of *Lactobacillus* isolated from vaginal secretions. *J. Microbiol Immunol Infect.* 2008;41:469-477.
18. Teshima E. Seleção de bacterias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos, Tese Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2001, 113p.
19. Neumann E. Comportamento *in vitro* de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo. 1991. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1991.
20. Kociubinski G, Perez P, De Antoni G. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Food Prot.* 1999; 62:905-912.
21. Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *J Dairy Sci.* 2004;67:3045-3051.
22. Fleming HP, Etechells JL, Costilow RN. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber briner. *Appl Microbiol.* 1975;30(6):1040-1042.

23. Touré R, Kheadr E, Lacroix C, Moroni O, Fliss I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Appl Microbiol.* 2003;95:1058-1069.
24. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot.* 1998; 61(12):1636-1643.
25. Belzarini MG, Casanoves F, Di Rienzo JA, González LA, Robledo CW. INFOSTAT, Versión 1. 2001; Córdoba, Argentina.
26. Duncan B. Multiple ranges and multiple F. *Test Biometrics.* 1955; 11:1.
27. Sandes SH. Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico para uso como promotor de crescimento ou como adjuvante imune em vacinas de mucosa na pecuária bovina. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG . Brasil 2013.
28. Silva BC, Jung LR, Sandes SH, et al. In vitro assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. *Benefic Microbes.* 2013; 4(3):267-75.
29. Malveira DS. Bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes de bezerros nelore criados no norte de Minas Gerais. Dissertação Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros. Brasil, 2013.
30. Merritt ME, Doaldson JR. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of Medical Microbiology.* 2009;58:1533-1541.
31. Ávila J, Ávila M, Tovar B, Brizuela M, Perazzo Y, Hernández H. Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Rev Científica Universidad de Zulia-Venezuela.* 2010;20(2):161-169.
32. McCoy S, Gilliland SE. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* Species. Having Potential for Use as Probiotic Cultures for Dogs. *Food Microbiol Safety.* 2007;72(3):94-97.
33. Nardi RM, Santoro MM, Pimenta AMC, Oliveira JS, et al. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. *Appl Microbiol.* 2005;99 649-656.
34. Collins JW, La Region RM, Woodward MJ, Searle LEJ. Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. In: Charalampopoulos D and Rastall RA (eds) *Prebiotic and probiótico Science and technology* Springer New York. 2009;1123-1192p.
35. Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol.* 2010; 141:15-28.
36. Torsein M, Lindberg A, Sandgren CH, Waller KP, Törnquist M, Svensson C. Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. *Prev Vet Med.* 2011;99:136-147.
37. Alvarado CC, Díaz CG. Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* aislado de pastizal de finca lechera. *RESPYN.* 2009; 10(1) Enero-Marzo.
38. Vásquez M, Sandra M, Suárez MH, Zapata BS. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chil Nutr.* 2009;36(1):64-71.
39. Saarela MH, Alakomi HL, Puhakka A, Matto J. Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of *in vitro* analyses of cell physiological functions to predict it. *J Appl Microbiol.* 2009;106:1204-1212.
40. Sánchez L, Vichi J, Llanes M, Castro E, Soler DM, Espinosa I, et al. Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* spp. como candidatas a prebióticas. *Rev Salud Anim.* 2011; 33(3):154-160.
41. Marthur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int J Food Microbiol.* 2005;105:281-295.

Recibido: 29-9-2014.

Aceptado: 6-2-2015.