**Estudio de propiedades benéficas de bacterias lácticas bovinas para el diseño de un probiótico multicepa**

Miranda MH 1, Nader-Macías MEF 1\*

1 Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET).

\*Email: fxxjksi@pdnda.org.ar

*Study of beneficial properties of bovine lactic bacteria for the design of a multi-strain probiotic*

**Introducción**

La microbiota de los diferentes tractos y superficies mucosas evidencia una multiplicidad de funciones, principalmente relacionados con la salud del hospedador y la prevención de infecciones. En diferentes tractos y mucosas, las bacterias lácticas (BL) son los microorganismos más predominantes, y las especies y sus características principales son especie y hospedador específicos.

El objetivo de este trabajo es realizar un relevamiento de las propiedades benéficas relacionadas con: a) características de superficie de las BL (hidrofobicidad, autoagregación y formación de biofilms), b) producción de sustancias antagónicas (ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas) y c) producción de enzimas benéficas (amilasa, celulasa y xilanasa). Asimismo, se evaluó la compatibilidad de las BL con características promisorias a fin de avanzar en el diseño de un producto probiótico multicepa que se pueda aplicar en las diferentes mucosas o ecosistemas bovinos.

**Materiales y Métodos**

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Farmabióticos de CERELA. En trabajos previos se han aislados e identificado 17 cepas totales de BL de vagina y glándula mamaria de hembras bovinas adultas y materia fecal de terneros. Para determinar el porcentaje de hidrofobicidad de la superficie bacteriana, se aplicó la técnica de partición en solventes orgánicos (hexadecano, xileno y tolueno). La capacidad de autoagregación se evaluó por espectrofotometría (Otero *et al.* 2004) y la formación de biofilms se estudió aplicando la técnica en microplacas de poliestireno puesta a punto en el laboratorio (Leccese-Terraf *et al.* 2012). Se usó el método de la placa de MRS-tetrametilbencidina agar para establecer la producción de H2O2 por las BL. La inhibición de patógenos se realizó por el método de difusión en placa empleando sobrenadantes de cultivos (y neutralizados) de BL frente a: *L. monocytogenes, E. coli, S. aureus, E. faecium, S.dysgalaciae, S. bovis y S. typhimurium.* Para establecer la producción de enzimas benéficas por las BL, se empleó el método de inhibición en placa de MRS-almidón para amilasa, placa de MRS-carboximetilcelulosa para celulasa y placa MRS-xilano para xilanasa. Por último, la compatibilidad entre cepas de BL se evaluó por el método de difusión en placas de agar. Cada uno de los microorganismos se utilizó como indicador y como productor de sustancias inhibitorias alternativamente y se trató los sobrenadantes con NaOH y catalasa. Los resultados de los diferentes ensayos se analizaron por ANOVA.

**Resultados y Discusión**

Se evaluaron 7 cepas BL aisladas de vagina bovina, 6 cepas de BL de glándula mamaria y 4 cepas de BL aisladas de materia fecal de terneros. Cuatro cepas aisladas de vagina, 3 de glándula mamaria y 2 de materia fecal de terneros mostraron un alto porcentaje de hidrofobicidad con los solventes ensayados. La capacidad de autoagregación se evidencio solo en 1 cepa aislada de glándula mamaria y en 2 cepas de heces de terneros. Las 17 cepas de BL mostraron la capacidad de formar biofilms, aunque en diferentes grados alta, media o baja. Los resultados indican que 5 cepas de BL son altamente productoras de H2O2, 7 cepas son productoras y 4 cepas son débilmente productoras de H2O2. Cuatro cepas de BL aisladas de vagina bovina inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes* y *E. coli*, una cepa aislada de glándula mamaria inhibió a *S. aureus*, *S. uberis* y *S. agalactiae* y dos cepas inhibieron solo a *S. uberis*; las cepas aisladas de heces de terneros inhibieron el crecimiento de *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. aureus*. La producción de enzimas benéficas (amilasa, celulasa y xilanasa) no se puso en evidencia en ninguno de los microorganismos ensayados. Las BL evaluadas mostraron diferentes espectros de inhibición entre ellos, permitiendo la selección de cepas compatibles entre sí para su potencial inclusión en un producto probiótico. Se sugiere que el efecto final de las BL probióticos se ejerce por diferentes mecanismos de acción, relacionados con las características de la superficie bacteriana, metabolitos o enzimas producidas y la interacción que se producen con el hospedador. De esta manera, autoagregación de los microorganismos sería beneficiosa para la adhesión a las membranas mucosas y células epiteliales, instalación y permanencia de los microorganismos y formación de biofilms.

**Conclusiones**

Se concluye que todas las cepas analizadas (a través de ensayos in vitro) presentan propiedades benéficas relevantes implicadas en la protección de los diferentes mucosas o ecosistemas donde se apliquen, por lo que la combinación adecuadas de BL se utilizaría como ingredientes bioactivos en productos probióticos.

**Agradecimientos**

Los autores agradecen a las Dras. Espeche, Maldonado y Otero por el trabajo previo de aislamiento e identificación de las cepas de BL. También se agradece el financiamiento otorgado por CONICET-PIP545.

**Bibliografía**

Otero MC *et al*. (2004) Methods Mol Biol **268**, 435-440.

Leccese-Terraf MC *et al*. (2012) J Appl Microbiol **113**, 1517-29.