

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE CALOSTRO DE CERDA E INTESTINO DE LECHONES RECIÉN NACIDOS. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE SUS POSIBILIDADES DE USO COMO PROBIÓTICOS

González Vega¹, L. M., Barrios V., García Díez M., Naharro, G. Carvajal, A., Rubio. P.

¹Facultad de Veterinaria Universidad de León. Campus de Vegazana s/n 24071- León
 España. E-mail: luismijail@hotmail.es

INTRODUCCIÓN

Una de las etapas de la vida del cerdo que más problemas sanitarios plantea es el destete. El cambio de alimentación junto al estrés que supone la separación de la madre, la mezcla y el cambio de alojamiento hacen que sea frecuente la aparición de diarreas ocasionadas por enterobacterias, entre las que destaca *Escherichia coli*. Tradicionalmente para el control de las diarreas en esta fase se han venido utilizando antibióticos en el pienso. Esta utilización habitual de antibióticos ha generado la aparición de cepas resistentes y tiene además implicaciones negativas de distinto tipo en la salud humana y animal. La Unión Europea viene promoviendo medidas encaminadas a limitar todo lo posible la utilización de antibióticos, prohibiendo su utilización como promotores del crecimiento. Por ambos factores, es necesario buscar alternativas al uso de antibióticos. Entre ellas está el empleo de pro y prebióticos.

Los lechones recién nacidos tienen un sistema inmunitario aún muy inmaduro y no desarrollan una respuesta inmunitaria local suficiente para proteger su intestino contra los agentes patógenos. Por otra parte, el intestino es la vía de infección de los agentes causantes de diarreas. En las primeras semanas de vida y mientras su sistema inmunitario va madurando, el lechón depende de la protección pasiva que le proporcionan los anticuerpos presentes en el calostro y en la leche de la madre. En estudios hechos en el hombre, se ha comprobado que la leche materna trasfiere células inmunitarias de la madre al recién nacido (Lawrence y Pane, 2007) y que es un factor fundamental en el desarrollo y en la composición de la microbiota intestinal del neonato y una fuente de bacterias del ácido láctico capaces de colonizar su intestino (Martin et al. 2003; Martin et al. 2004). Recientemente se han aislado también lactobacilos de leche de cerda y se han evaluado algunas de sus características como potenciales probióticos (Martín et al, 2009). No obstante, los estudios microbiológicos de la leche de cerda aun son escasos. Por ello el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar tanto en cerdo blanco como en cerdo ibérico cepas del ácido láctico de calostro de cerdas y de intestino de lechones y valorar algunas de sus propiedades para su potencial uso como probióticos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de calostro de 40 cerdas blancas e ibéricas con diferente número de partos. Del mismo modo, se tomaron muestras de contenido y de mucosa de diferentes segmentos del tracto gastrointestinal y del cordón umbilical de 10 lechones recién nacidos que se recogieron en el momento del parto antes de la ingestión de calostro.

Estas muestras se sembraron por duplicado en placas de agar MRS y se incubaron tanto en condiciones de aerobiosis como en anaerobiosis a 37°C durante 48 a 72 horas. Las colonias con diferentes morfologías (forma, tamaño y color) fueron resembradas hasta obtener aislados. Los cultivos puros obtenidos se caracterizaron en primer lugar morfológicamente por medio de la tinción de Gram.

Para la identificación de las cepas se procedió a la amplificación por PCR del fragmento correspondiente a la región intergénica 16S/23S del ADN ribosomal. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados según el método de Sanger en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León y las secuencias obtenidas fueron contrastadas con las bases de datos existentes (NCBI, BLAST) para su caracterización. Se analizaron otras propiedades de los aislamientos por medio de pruebas bioquímicas con el fin de diferenciar las distintas cepas, empleando el ensayo API 50 CH (Biomérieux), que permitió agruparlas en función de sus perfiles metabólicos.

Por otra parte, se estudió la capacidad antimicrobiana de los aislados frente a *Salmonella* Typhimurium (CECT4594) y *Escherichia coli* (CECT434) mediante el método de "agar spot test" descrito por Zamora (2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 98 aislados del calostro de cerdas blancas e ibéricas y del tracto gastrointestinal de los lechones. El análisis de la región intergénica 16S/23S de estos aislados reveló la presencia de cepas de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*.

Una vez identificados los aislados, se procedió a la caracterización de las especies con potencial probiótico, analizándose en mayor profundidad las características bioquímicas de diez aislados de dos especies diferentes de bacterias del ácido láctico: *Lactobacillus reuteri* y *Enterococcus faecium* correspondientes a aislados de calostro y, en caso de *E. faecium* aisladas también de meconio de lechones.

Se observaron diferencias en las pruebas bioquímicas entre cepas de la misma especie para el metabolismo de algunos carbohidratos como D-Fructosa, L-Arabinosa, N-acetil glucosamina y gluconato para cepas de *Lactobacillus reuteri*, y D-Tagatosa para las de *Enterococcus faecium*.

El estudio de la actividad antimicrobiana frente a las enterobacterias indicadoras demostró que todas la cepas estudiadas provocaban halos de inhibición, siendo más notables frente a *E. coli*. La actividad inhibitoria resultó ser mayor en ambos casos con las cepas de *Enterococcus faecium*.

Martín et al. (2009) determinaron y evaluaron el potencial probiótico de aislados de *Lactobacillus* procedentes de leche canina, identificando cuatro especies potencialmente probióticas. En humanos se ha demostrado que la leche constituye una fuente de bacterias probióticas para el tracto gastrointestinal del recién nacido (Heikkilä y Saris, 2003; Martín et al., 2003, Olivares et al., 2006, Martín et al., 2007 y Martín et al., 2010). En la especie porcina algunos trabajos realizados por Martín et al. (2009a) también han demostrado la presencia de bacterias probióticas del ácido láctico en este líquido biológico. Sus estudios les permitieron llegar a la conclusión que la leche de esta especie protege a los lechones contra enfermedades infecciosas a través de varios mecanismos y para ello evaluaron su potencial probiótico a través de diferentes ensayos, incluida la supervivencia en condiciones que simulan las existentes en el tracto gastrointestinal, la producción de compuestos antimicrobianos, la adhesión a la mucosa intestinal y el patrón de sensibilidad antibiótica.

Los resultados del análisis preliminar de las cepas de bacterias ácido lácticas obtenidas reflejan la necesidad de un estudio más profundo de sus propiedades y características para su posible uso como probióticos en lechones, lo cual podría resultar una alternativa viable al uso de antibióticos como promotores de crecimiento en esta especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Heikkilä, M.P., and Saris, P.E.J. 2003. *J. Appl. Microbiol* 95:471-478. • Hosea Blewett, H.J., Cicalo, M.C., Holland, C.D., Field, C.J. 2008. *Adv. Food. Nutr. Res.* 54: 45-80. • Langa, S. 2006. • Lawrence, R.M. and Pane, C.A. 2007. Human breast milk: Current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care.* 37:7-36. • Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M. 2003. *J. Pediatr.* 143 (6): 754-758. • Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J., Fernández, L., Xaus, J., Rodríguez, J. M. 2004. *Trends in Food Sci. and Technol.* 15:121-127. • Martín, R., Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Rodríguez, J.M., 2007. *J Appl. Microbiol* 103: 2638-2644. • Martín, R., Olivares, M., Pérez, M., Xaus, J., Torre, C. Fernández, L. and Rodríguez, J.M. 2009. *Vet. J.*, 185 (2):193-198. • Martín, R., Delgado, S., Maldonado, A., Jiménez, E., Olivares, M., Fernández, L., Sobrino, O. J., Rodríguez, J. M. 2009a. *J. Dairy Res.* 76 (4): 418-425. • Olivares, M., Díaz-Ropero, M. P., Martín, R., Rodríguez, J. M., Xaus, J., 2006. *J. Appl. Microbiol* 101: 72-79. • Zamora, M. L. 2003. Tesis doctoral. Universidad de Girona.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) del Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación de España (MAEC)

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM COLOSTRUM OF SOWS AND INTESTINE OF NEW BORN PIGLETS. PRELIMINARY EVALUATION OF THEIR POTENTIAL AS PROBIOTICS

ABSTRACT: For this study we used 40 white and iberian sows and 10 new born piglets in order to isolate and identify acid lactic strains from colostrum in sows and from meconium and gastrointestinal mucosa and content in new born piglets before the first intake of colostrum. The obtained pure cultures were characterized morphologically and identified by means of PCR and sequencing. Other biochemical properties were studied using the 50 API CH tests that allowed grouping them based on their metabolic profiles. The obtained isolates with possible probiotic potential corresponded to *Lactobacillus reuteri* and *Enterococcus faecium*.

Keywords: Probiotic, colostrum, sows, farrow.