

OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE CERDOS COMO CANDIDATOS A PROBIÓTICOS. RESULTADOS PRELIMINARES.

Barrios V., Carvajal A., Samaniego L.M., Naharro G., Mijail L., Rubio P.
ULE. Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal. Grupo de Enfermedades Digestivas del Cerdo. Campus de Vegazana s/n. C/P 24071. (León). España. E-mail: vladimirbarrios2009@yahoo.com.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los probióticos han adquirido mayor relevancia en las condiciones de producción porcina, por la sustitución creciente que han sufrido los antibióticos y los promotores hormonales del crecimiento en nuestros sistemas productivos. Incontables son los argumentos que perfilan estas decisiones a los líderes en el mercado de los alimentos, ya sea por la resistencia a los productos antimicrobianos que sufren indirectamente los seres humanos, así como por los residuales y potenciales agentes carcinogénicos que perjudican no solo la salud animal, sino también a su principal consumidor y beneficiario “el hombre”. Es de vital importancia conocer que el sistema digestivo, en su fisiología, integra a más del 70% del funcionamiento del sistema inmunitario a través de la cadena ganglionar y los mecanismos específicos de la inmunidad de mucosas, siendo a este nivel donde se produce mayor cantidad de Inmunoglobulinas A, estando a su vez relacionado con el equilibrio microbiano proveniente del intestino grueso (ciego y colon).

Actualmente España tiene el mayor nivel de prevalencia de Salmonella en la Eurozona y existen estudios que demuestran el incremento sustancial de las enfermedades digestivas del cerdo que afectan a la producción e indirectamente a la salud del hombre (EFSA, 2008). Dicha situación se agrava con la utilización indiscriminada de antibióticos en las explotaciones y los cambios de alimentación por razones obvias de rentabilidad y mercado que se imponen en la actualidad. Teniendo en cuenta lo antes planteado, el objetivo del presente trabajo es obtener, aislar e identificar bacterias ácido lácticas del tracto gastrointestinal y las heces de cerdos saludables para estudios posteriores como candidatos a probióticos así como presentar algunos resultados preliminares de este proceder.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron diversos muestreos de heces directas, contenido intestinal y raspado de toda la mucosa del tracto gastrointestinal en cerdos híbridos comerciales libres de antibióticos en condiciones de producción. Los animales muestreados incluyeron lechones en el momento del destete, en transición y cerdos de cebo. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, España.

Se realizó el aislamiento y la purificación de bacterias ácido lácticas (BAL) según la metodología descrita por Rondón (2009) empleando medio MRS. Las siembras se realizaron por el método directo en placas sin cubrir en condiciones de anaerobiosis, a 37,5°C durante 48h y por siembra profunda en doble capa en iguales condiciones. Seguidamente se les efectuó la tinción de Gram y la prueba bioquímica de catalasa. Todas las cepas depuradas fueron observadas y fotografiadas en microscopio óptico siendo sometidas a una rigurosa selección, basada en criterios morfológicos. Se organizaron en subgrupos de 50 para su optimización y procesamiento. A continuación se realizaron en el primer subgrupo de aislados las pruebas de disminución de pH del medio, resistencia a la barrera digestiva empleando medio de cultivo MRS enriquecido con HCl al 0.1 N con pH 1.5, 2 y 4 (Petros et al., 2006) y sales biliares concentradas a 0.5, 1 y 1.5 % respectivamente.

Finalmente, 15 de los aislados del primer subgrupo en estudio fueron escogidos en función de su capacidad de resistencia a la barrera digestiva e identificados mediante PCR siguiendo el

protocolo descrito por Tannock et al. (1999). Los primers o cebadores utilizados en la amplificación de la región espaciadora intergénica 16S-23S fueron Primer 16-1A, 5'-GAATCGCTAGTAATCG-3', correspondiente con los nucleótidos 1361 al 1380 del gen del ARNr 16S para la numeración de *Lactobacillus casei* y Primer 23-1B, 5'-GGGTTCCCCATTGGA-3', correspondiente con los nucleótidos 123 al 113 del gen del ARNr 23S para la numeración de *Lactobacillus casei*. Las secuencias obtenidas fueron cotejadas en el GenBank, mediante el software BLAST, disponible en el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las siembras demostraron que los mejores crecimientos bacterianos en todos los casos se presentaban entre las diluciones 10^{-5} y 10^{-7} , lo cual permitió estandarizar las diluciones. Se aislaron en total 1.800 colonias y se seleccionaron un total de 298 aislados de bacilos Gram positivos (G+) y catalasa negativos (-). Además, la siembra directa en placas sin cubrir en condiciones de anaerobiosis aportó menor cantidad y diversidad de flora láctica que la siembra profunda en doble capa. Estos resultados indican que, aparentemente, se desarrolla mayor cantidad de flora láctica en el ciego que en el colon. Todas las cepas del primer subgrupo en estudio disminuyeron significativamente el pH del medio y seleccionamos aquellas que presentaron valores inferiores a 4,5. La resistencia al pH extremo fue variable y solo resistieron concentraciones ácidas con un crecimiento aceptable 15 cepas (30 %) (Gráfico 1), mientras que la resistencia a los ácidos biliares fue decisiva en el proceso de selección. Presentaron la mayor resistencia a la acción de las sales biliares el *Enterococcus dispar* (Gráfico 2) y el *Streptococcus gordonii*, ambos superiores a los aislados de *Lactobacillus reuteri*, *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* y *Lactobacillus ruminis* (Gráfico 3). Los resultados obtenidos demuestran la presencia de una flora láctica diversa en el intestino y las heces fecales de cerdos saludables, en todas sus etapas de producción, que puede ser considerada de utilidad para estudios posteriores como candidatos a probióticos. Se identifican como géneros presentes: *Enterococcus* con un 6,7%, *Streptococcus* un 20% y el *Lactobacillus* con un 73,33%, siendo este último el predominante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EFSA 2008 Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of Salmonella in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007.
- Rondón, A.J., 2009. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal de la Habana. Complejo científico de la Universidad Agraria de La Habana. Cuba.
- Petros A. M., Georgia Z., Christos M., Kalantzopoulou G., Pot B., Tsakalidou E., 2010. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16 (2006) 189–199
- Tannock, G. W. 1999. A fresh look at the intestinal microflora. Chapter 1. In: *Probiotics. A Critical Review*. Ed. by G. W. Tannock. Horizon Scientific Press. England.

Agradecimientos: Agencia Española de Cooperación Internacional para el desarrollo (AECID) y al Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación (MAEC) y Universidad de León.

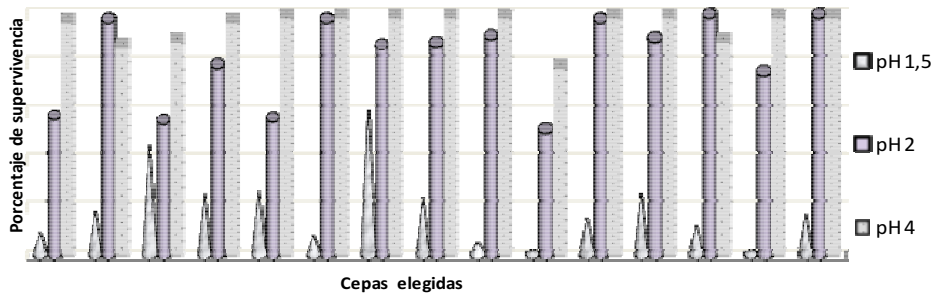


Gráfico 1. Porcentaje de supervivencia a los diferentes pH en 15 cepas seleccionadas.

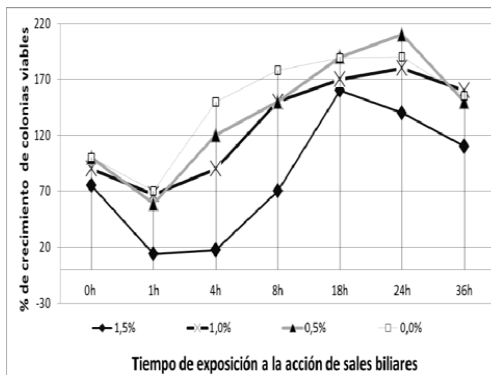


Gráfico 2. Resistencia a concentraciones de sales biliares en un aislado de *E. dispar*.

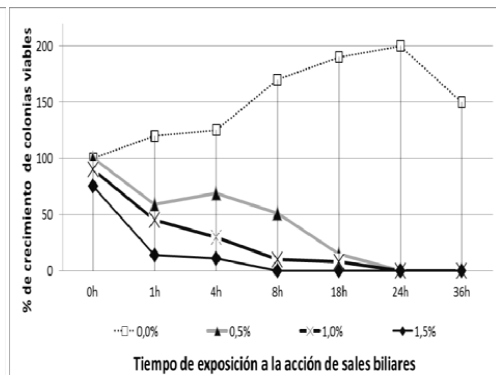


Gráfico 3. Resistencia a concentraciones de sales biliares en un aislado de *L. ruminis*.

COLLECTION AND IDENTIFICATION OF LACTIC BACTERIA OF THE LARGE INTESTINE IN PIGS AS PROBIOTIC CANDIDATES. PRELIMINARY RESULTS

ABSTRACT: Lactic acid strains were isolated from the intestinal mucosa and faeces of pigs at different stages of their breeding. Serial decimal dilutions of these samples were grown in MRS medium. A total of 1,800 colonies were obtained and checked with two preliminary tests, Gram stain and catalase test, to finally select 298 isolates of Gram positive and catalase negative bacteria. A subgroup of 50 isolates were tested to determine the ability to tolerate decreased pH and the resistance to gastric juices and bile salts. A total of 15 isolates were selected according to their probiotic characteristics and were identified by molecular methods as members of the *Enterococcus*, *Streptococcus* and *Lactobacillus* genera

Keywords: *Lactobacillus*, mucous membranes, Pigs