

Caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC Y 41 LMC aisladas de la mucosa del ciego de cerdos como probiótico
Ronald Vera¹, Ernesto Hurtado^{1*}, Fátima Arteaga¹ y Carlos Rivera¹

¹ Carrera de Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

*E-mail: ernestohurta@gmail.com

Resumen

Con el fin de conocer el potencial probiótico, se caracterizaron *in vitro* dos variantes (22 LMC y 41 LMC) de cepas *Lactobacillus plantarum* aisladas de la mucosa del ciego de cerdos. Se determinó el crecimiento a diferentes temperaturas (30, 37 y 45°C) y pH (2,5; 3,4; 5,4; 6,4). Además como característica funcional se estableció la resistencia a sales biliares (0,3 y 0,6%). Se realizó un análisis de varianza, bajo un procedimiento GLM. Se obtuvo un efecto altamente significativo ($P < 0,01$) en la interacción cepa x temperatura (24 horas), cepa x pH (48 horas) para el crecimiento microbiano. La resistencia a la concentración de sales biliares fue diferente entre las variantes de la cepa e incrementaron su crecimiento de manera directa con las concentraciones. Las dos variantes (22 LMC y 41 LMC) estudiadas presentan propiedades probiótica.

Palabras clave: cerdos, interacción, crecimiento, resistencia, sales biliares.

Abstract

In order to know probiotic potential, two variants (22 CML and 41 CML) of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the mucosa of the cecum of pigs were characterized in vitro. Growth was determined at different temperatures (30, 37 and 45 ° C) and pH (2.5, 3.4, 5.4, 6.4). In addition, resistance to bile salts (0.3 and 0.6%) was established as a functional characteristic. An analysis of variance was performed under a GLM procedure. A highly significant ($P < 0.01$) effect was obtained on the interaction strain x temperature (24 hours), strain x pH (48 hours) for microbial growth. The resistance to the concentration

of bile salts was different between the variants of the strain and increased their growth directly with the concentrations. The two variants (22 CML and 41 CML) studied present probiotic properties.

Key words: pigs, interaction, growth, resistance, bile salts

Introducción

En el tracto intestinal existe una gran variedad de bacterias (más de 1000 especies distintas) que ayudan a prevenir que microorganismos patógenos lo colonicen. Además en el intestino se cuenta con barreras como la acidez, movimientos peristálticos y la eliminación de microorganismos extraños por medio de la mucosa intestinal. Este tipo de mecanismos de defensa ayudan en muchas ocasiones a combatir la colonización de microorganismos patógenos (Bustamante y Alvarad, 2015).

Los probióticos son cultivos puros, o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que al ser consumidos por el hombre y los animales en cantidades adecuadas mejoran la salud. En ese sentido, la mayoría de los probióticos pertenecen a las BAL y son usados por la industria alimentaria en la elaboración de productos fermentados y como complementos alimenticios con la finalidad de promover la salud; también el área pecuaria son utilizados para mejorar la producción animal (Ramírez *et al.*, 2011).

Además de lo anterior, se ha incrementado la demanda de carne inocua y cualitativa en el mercado, por lo que los productores están dispuestos a usar suplementos naturales, económicos y seguros, que beneficien a los animales en salud, aumente su productividad, mejore la calidad de la producción y no ponga en peligro el medio ambiente (Huguet *et al.*, 2006). Los preparados probióticos son en este tiempo los que reúnen estas características y los hacen una alternativa (Gámez, 2010).

En el grupo de bacterias BAL se incluyen géneros como Bifidobacterium, Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus y Pediococcus, que pueden ser aisladas a partir de alimentos fermentados, masas ácidas, bebidas, plantas y

los tractos respiratorio, intestinal y vaginal de animales de sangre caliente, entre otros (Deegan, 2006).

Muchas de las propiedades de los lactobacilos hacen que puedan ser clasificados como probióticos, microorganismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped (Querra *et al.*, 2005).

Rondón *et al* (2008) mencionan que dentro de las especies probióticas de mayor interés se encuentran los lactobacilos, ampliamente utilizados en la industria. Sin embargo, para utilizarlos, es necesario realizar una adecuada evaluación de cepas de acuerdo con diferentes criterios de selección, 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.

La vocación pecuaria que tiene la provincia de Manabí, la hacen de primer orden, para llevar a cabo investigaciones que permitan alcanzar soluciones a tensiones que logren cambios en la matriz productiva. Se hace necesario el desarrollo de estrategias para la gestión y bienestar animal, con un enfoque sostenible y su implementación adecuada a las condiciones del entorno y los fines productivos, salvaguardando la salud de las especies de interés zootécnico.

De allí que esta investigación permitió describir las características de cepas de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC Y 41 LMC aisladas de la mucosa del ciego de cerdos, mediante pruebas de resistencia a temperatura, pH y sales biliares; para ser consideradas como potenciales probióticos en la alimentación animal.

Materiales y métodos

Ubicación

La caracterización de cepas extraídas del intestino grueso (ciego) de cerdos con alimentación convencional, se realizó en el laboratorio de biología molecular de ESPAM MFL, Calceta Manabí.

Medios y condiciones de cultivo

Las cepas (22 LMC Y 41 LMC) se desarrollaron en medio líquido, posteriormente fueron sembradas en medio sólido bajo condiciones de anaerobiosis en una incubadora de CO₂, tubos con 4,5 ml del medio MRS líquido y 200 µL de las cepas, seguidamente se incubaron por 48 horas.

Crecimiento de las cepas en condiciones hostiles

A diferentes temperaturas: se cultivaron las cepas en caldo MRS con incubación 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 realizaron los conteos celulares a las variantes (22 LMC Y 41 LMC) con valores de D.O $\geq 3,0$.

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

Funcionalidad ante la resistencia a sales biliares

Las cepas aisladas seleccionadas se activaron en caldo MRS por 24 horas. Después del crecimiento, se centrifugaron a 750 g por 15 minutos, a 4°C, en una centrífuga Beckman GS -6R. El sobrenadante se descartó y el concentrado de células fue colocado nuevamente en suspensión con caldo en MRS.

El concentrado celular se ajustó a una densidad óptica de DO $0,9 \pm 0,2U$, mediante medición a 600nm (DO_{600nm}) en espectrofotómetro.

Ensayo de resistencia a sales biliares

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

Análisis estadístico

La viabilidad de las dos variantes de *Lactobacillus plantarum*, se analizaron por medio del análisis de varianza, con tres repeticiones, a través de un modelo lineal general, donde se consideró el efecto de interacción entre cepas x temperatura y cepas x pH, en cada modelo respectivamente, mediante el programa estadístico InfoStat (2017).

Resultados y discusión

Tolerancia a cambio de temperatura

En la tabla 1 se presenta el crecimiento de las dos variantes de cepas de *Lactobacillus plantarum*, cuando fueron sometidas a 30, 37 y 45°C durante 24-48 horas, donde no hubo *diferencias* entre las cepas a las 24 horas, a pesar de existir un crecimiento. Mientras que a las 48 horas se observó diferencias estadísticas al 5 %, siendo la cepa 22 LMC con un promedio de 1,87 superior a 41 LMC en un 7,4 %.

Tabla 1. Crecimiento de las variantes de cepas de *Lactobacillus plantarum* (41 LMC y 22 LMC) sometidas a temperaturas durante 24 y 48 horas.

Cepas	Densidad Óptica (24 horas)		Densidad Óptica (48 horas)	
	Medias	Error Estándar	Medias	Error Estándar
41LMC	1,59 ^a	0,02	1,73 ^a	0,04
22 LMC	1,64 ^a	0,02	1,87 ^b	0,04
C.V	4,29		6,99	

^{a,b} Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La temperatura es uno de los factores más importantes que afectan al crecimiento y supervivencia de los microorganismos, varía entre los diferentes géneros y reflejan el rango de temperatura óptima de su habitad natural; a medida que se eleva la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas son más rápidas y el crecimiento se acelera, hasta el punto en que tienen lugar las reacciones de inactivación (Madigan *et al.*, 2004).

La interacción analizada entre las cepas con las temperaturas a las cuales se sometieron resultó ser significativa a las 24 horas, donde se observa un comportamiento similar ($p > 0,05$), para 22 LMC a 37 y 45°C, además de 41 LMC a 45°C. Esto permite inferir que ambas cepas toleran niveles de temperatura de 45°C.

Tabla 2 Efecto de la interacción cepas x temperatura en el crecimiento¹ a las 24 horas.

Cepas	Temperatura	Medias	Error Estándar
22 LMC	45	1,76 ^a	0,03
22 LMC	37	1,75 ^a	0,03
41LMC	45	1,71 ^a	0,03
41LMC	37	1,59 ^b	0,03
41LMC	30	1,48 ^c	0,03
22 LMC	30	1,40 ^c	0,03
C.V			4,29

¹ Medido a través de la densidad óptica

^{a, b} Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los resultados de esta prueba de tolerancia a la temperatura puede predecir la capacidad *in vivo* de estas cepas; de ahí que, el éxito de un probiótico depende en gran medida de realizar una buena selección *in vitro* (Rondón *et al.*, 2008).

Tolerancia a cambio de pH

La tabla 3 presenta el promedio del conteo celular (crecimiento) de las cepas bajo estudio, se observa que existen diferencias estadísticas a las 48 horas, cuando son sometidas a distintos pH. La cepa 22 LMC resulto la que presentó un mayor promedio, siendo esta superior a la cepa 41 LMC en 22 %.

Tabla 3 Crecimiento de las variantes de cepas de *Lactobacillus plantarum* sometidas a distintos pH durante 24 y 48 horas.

Cepas	Densidad Óptica (24 horas)		Densidad Óptica (48 horas)	
	Medias	Error Estándar	Medias	Error Estándar
41LMC	1,03 ^a	0,05	1,55 ^a	0,06
22 LMC	1,17 ^a	0,05	1,90 ^b	0,06
C.V	20,67		14,61	

^{a, b} Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Al estudiar la interacción entre cepas x pH, en el análisis de varianza, resulto ser altamente significativa ($p < 0,01$) a las 48 horas. Los promedios y errores estándar se presentan en la tabla 4, se observan cuatro grupos, siendo los de mayor crecimiento las interacciones constituidas por la cepa 22 LMC cuando interactúa con niveles de pH de 7,5 y 6,7 respectivamente. Sin embargo, se observó crecimiento a pH por debajo de 4; mientras que la cepa 41 LMC a pH presento un crecimiento moderado.

Tabla 4 2 Efecto de la interacción cepas x pH en el crecimiento ¹ a las 48 horas

Cepas	pH	Medias	Error Estándar
22 LMC	7,5	3,45 ^a	0,13
22 LMC	6,7	3,1 ^a	0,13
41 LMC	6,7	2,73 ^b	0,13
22 LMC	5	2,5 ^{bc}	0,13
41 LMC	7,5	2,3 ^c	0,13
41 LMC	5	2,15 ^c	0,13
41 LMC	4	0,3 ^d	0,13
41 LMC	3,4	0,28 ^d	0,13
22 LMC	3,4	0,23 ^d	0,13
22 LMC	4	0,23 ^d	0,13
C.V			14,61

¹ Medido a través de la densidad óptica

^{a,b} Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Los resultados obtenidos son similares a los observados con *Lactobacillus salivarius* (Rondón *et al.* 2008) y *L. rhamnosus* (Brizuela, (2003) en los cuales se evidenció poco crecimiento a pH de 3 y un incremento significativo de la población mayor a pH de 5.

Los *Lactobacillus* son generalmente más resistentes a las condiciones acidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer hasta un pH de 4, esta resistencia les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, aun cuando el pH haya caído tanto, que otras bacterias lácticas ya no puedan crecer (Madigan *et al.*, 2004). No obstante lo llamativo en los resultados obtenidos es la capacidad de crecimiento en un tiempo superior a 48 horas en condiciones acidas.

Tolerancia a sales biliares

Se observó que las dos cepas son capaces de tolerar el rango de las concentraciones de sales biliares experimentadas (Tabla 5). Estadísticamente en los dos microorganismos se presenta un efecto significativo en el crecimiento en las concentraciones estudiadas, además a medida que aumenta la concentración de sales biliares; siendo 41 LMC la que respondió a mejores valores medios de DO, en ambas condiciones.

De acuerdo a estos resultados obtenidos se puede decir, que las dos cepas evaluadas son microorganismos capaces de sobrevivir a concentraciones de sales biliares desde 0,3% (p/v) hasta 0,6% (p/v), pudiendo desarrollar sus actividades metabólicas sin verse completamente inhibidas.

Tabla 5. Crecimiento de las variantes de cepas de *Lactobacillus plantarum* sometidas a distintas concentraciones de sales biliares.

Cepas	Viabilidad (0,3 % Sales biliares)		Viabilidad (0,6% Sales Biliares)	
	Medias	Error Estándar	Medias	Error Estándar
41LMC	0,72 ^a	0,02	0,83 ^a	0,02
22 LMC	0,41 ^b	0,02	0,56 ^b	0,02
Control	0,41 ^b	0,02	0,54 ^b	0,02
C.V	16,62		13,8	

^{a,b} Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Mantilla y Portacio (2012) discuten que las bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, son capaces de producir la enzima conocida como sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas con glicina y taurina. Esta desconjugación pudiera ocurrir en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, ya que la actividad de la SBH se incrementa al disminuir el pH por producción de gran cantidad de ácidos orgánicos.

Otro hecho relevante es mencionado por Prasad *et al.*, citado por Mantilla y Portacio (2012) quienes enfatizan que las diferencias en la tolerancia al tránsito gastrointestinal también pueden deberse a las diferencias existentes en la estructura de la pared celular de las distintas especies y géneros bacterianos (Prasad *et al.*, 1998). De allí que estos niveles de tolerancia son disimiles a otras investigaciones realizadas en otras especies.

Sánchez *et al* (2015) reportan, que las cepas aisladas de terneros de 15 días de edad resultaron las más resistentes o tolerantes a las sales biliares que la de terneros de tres meses de edad; este hallazgo hace pensar el posible grado de tolerancia con la edad del aislamiento de las cepas utilizadas de la mucosa intestinal de los cerdos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos *in vitro* demuestran que las dos cepas nativas poseen propiedades probióticas y pueden ser utilizadas como aditivos microbianos destinados a la alimentación de cerdos para controlar su microbiota intestinal benéfica, estimular su sistema inmune, inhibir el crecimiento de patógenos oportunistas e incrementar los índices bioproductivos del sector porcino; se hace necesario la realización y valoración de estudios *in vivo* que permitan validar los efectos benéficos de estos microorganismos.

Bibliografía

Bustamante, G., y Alvarad, P. 2015. Efecto del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sp. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis*. *Revista REBIOLEST*, 3(1), 33-41.

Brizuela, M. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis Doctoral. ICIDCA, Cuba. p.101.

Deegan LH. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J.* 2006; 16 (9): 1058-1071

Gámez, H. 2010. Evaluación de bacterias ácido-lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos. [Tesis Doctoral]. Cali, Colombia: Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Alimentos.

Huguet, A., Sève, B., Le Dividich, J., and Le Huërou-luron, I. 2006. Effects of a bovine colostrum-supplemented diet on some gut parameters in weaned piglets, *Reprod. Nutr. Dev.*, 46, 167–178.

InfoStat. 2017. Software Estadístico. Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC).

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. Brock. 2004. *Biología de los Microorganismos*. 10a ed. Pearson Education, Madrid.

Mantilla, C. L., y Portacio, Á. B. 2012. Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 31-40.

Querra R, Quigley E, Madrid A. 2005. El rol de los prebióticos, probióticos y simbióticos en gastroenterología. *Gastr Latinoam*. 16(3):218-228.

Ramírez, J., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., González, J. A. U., & Romero, F. A. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente Año*, 2(7).

Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M., & Pérez, M. 2008. Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *CYTA-Journal of Food*, 6(1), 56-63.

Sánchez, L., Omura, M., Lucas, A., Pérez, T., Llanes, M., y Ferreira, C. D. L. 2015. Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Revista de Salud Animal*, 37(2), 94-104.