



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ MANUEL FÉLIX LÓPEZ

VII EVENTO INTERNACIONAL LA UNIVERSIDAD EN EL SIGLO XXI

15, 16 de noviembre, 2018

CRECIMIENTO DE DOS CEPAS *Lactobacillus plantarum* A DIFERENTES NIVELES DE pH, TEMPERATURA Y SALES BILIARES

Edison Stalin Vélez Arteaga¹, Ronald René Vera Mejía², Carlos Octavio Larrea Izurieta², José Manuel Calderón Pincay³

¹Egresado de la carrera de Pecuaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, km 2.7 vía Calceta-El Morro-El Limón.

²Docente de la carrera de Medicina Veterinaria, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, km 2.7 vía Calceta-El Morro-El Limón.

³Docente de Nivelación, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Campus Politécnico El Limón, km 2.7 vía Calceta-El Morro-El Limón

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el crecimiento de dos cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc y 41 Lmc) a diferentes niveles de pH, temperatura y sales biliares mediante espectrofotometría UV, para lo cual se utilizó un Diseño Completamente al Azar con arreglo bifactorial por medio de estadística no descriptiva. Para la temperatura se utilizaron 6 tratamientos con 4 repeticiones; para pH 10 tratamientos con 4 repeticiones y para el efecto de las sales biliares 4 tratamientos y 12 repeticiones; las cepas fueron medidas por Densidad Óptica (DO) mediante un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 560 nm y con un factor de 0,9; en el caso de la temperatura el crecimiento

favorable se dio entre los 30°C a 45°C en las 24 y 48 horas; en el pH, el mayor crecimiento fue a un valor de 4 en ambas cepas estudiadas, respecto a la resistencia a sales biliares, las cepas presentaron los mejores resultados a las 3 y 6 horas en presencia que en ausencia de las mismas. Se concluye que las cepas de *Lactobacillus plantarum* son bacterias que toleran temperaturas de entre 30°C a 45 °C sin alterar su proliferación, se desarrollan favorablemente a pH de 4,0 y en presencia de sales biliares; mientras que en un pH de 5,0 hubo escaso desarrollo bacteriano. Las cepas evaluadas presentaron supervivencia y crecimiento favorable en los diferentes niveles de las variables estudiadas.

Palabras claves: Densidad óptica (DO), espectrofotómetro, pH, temperatura, sales biliares.

INTRODUCCIÓN

El inadecuado uso y dosis de antibióticos frente a retos sanitarios con bacterias patógenas que atacan al tracto gastrointestinal ha conllevado a la resistencia de cepas, elevando su nivel de patogenicidad y trayendo implicaciones negativas en la salud animal (Jurado *et al.*, 2009). El Consejo de la Unión Europea en el 2006 prohibió el uso de los antibióticos promotores del crecimiento (APC) en animales, por su capacidad de crear resistencias cruzadas con los antibióticos que se utilizan en la medicina humana, determinó, además, que los APC pueden causar daños a consumidores a través de alteraciones de las características de los productos animales con residuos inaceptables de estos compuestos en carnes, leche o huevos (Cepero, 2006).

En busca de alternativas al uso de los APC se realizan investigaciones encaminadas a evaluar aditivos que, utilizados en determinadas dosis, contribuyan a mejorar los indicadores productivos (Santomá *et al.*, 2006). Con el pasar de los años el desarrollo de los probióticos obedece la necesidad de sustituir el uso de antibióticos en la alimentación animal, los cuales cumplen la función de mantener un buen balance en la microflora del tracto gastrointestinal y erradicar bacterias patógenas reduciendo en cantidades significativas de enfermedades gastrointestinales en animales. Sin embargo, los antibióticos no sólo contribuyen a veces a la destrucción de la microflora intestinal beneficiosa,

sino que también, producen efectos residuales o resistencias en los productos de origen animal (Ávila, 2010).

Flores (2015) menciona que la necesidad de controlar las patologías digestivas en los sistemas de producción pecuaria conlleva a la utilización masiva de antibióticos como aditivos alimenticios. Sin embargo, el uso de antimicrobianos en dosis bajas en la alimentación de animales que se destinan al consumo humano, con el fin de mejorar el crecimiento y prevenir patologías, se relaciona con la resistencia a los antimicrobianos. A nivel mundial, varias jurisdicciones han respondido al restringir el uso de estos productos.

El emplear probióticos como aditivos microbianos vivos es una alternativa que beneficia a la salud del animal, ya que mejora el equilibrio microbiano intestinal. La mayor problemática que se presenta dentro de la aplicación de los probióticos es el costo, la viabilidad de los microorganismos y la variabilidad de los resultados en los animales (Flores, 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El desarrollo de esta investigación se efectuó en la Unidad de Docencia, Investigación y Vinculación del Laboratorio de Biología Molecular de la carrera de Medicina Veterinaria perteneciente a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí "Manuel Félix López" ubicada en el sitio el Limón en la ciudad de Calceta-Manabí-Ecuador, en las coordenadas 0°49'15.35" de latitud Sur y a 80°11'01.52" de longitud Oeste, con 15 msnm.

Ambientación del Laboratorio de Biología Molecular

Se limpió el Laboratorio de Biología Molecular utilizando desinfectantes para suelo y mesas, luego se procedió a desinfectar otros materiales y lugar de trabajo, esterilizando con alcohol. Cabe recalcar que cada lugar de trabajo fue esterilizado cada vez que se iba a trabajar.

Activación de las cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc)

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* se cultivaron en Caldo MRS (MAN, ROGOSA and SHARPE) para cada uno de los tratamientos en estudio para

verificar la supervivencia de ambas cepas a diferentes niveles de temperatura, pH y su crecimiento en sales biliares, utilizando 5,22 g de Caldo Lactobacilli MRS en 100 ml de agua destilada, según lo estipulado en estudios de *Lactobacillus* realizados por Sánchez *et al.* (2011).

Preparación de medios de cultivos y siembra de bacterias

Para la preparación de los medios de cultivos se utilizó MRS Agar, utilizando 4,3 g del mismo. Luego para la siembra de las cepas se tomó 200 µl del agar y se dejó desarrollar durante 48 horas post-activación las cepas aisladas obtenidas de los cerdos criollos que reposan en las cajas de crioconservación del Laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM "MFL". Para el medio de cultivo preparado con MRS Agar, una vez homogenizado se colocó el agar en tubos de ensayo con las cepas aisladas y cada tubo se rotuló para ser debidamente identificado. Para cada tubo sembrado se le añadió 4,5 ml de medio MRS Agar, los cuales fueron preparados en matraces de 100 ml.

Evaluación de la supervivencia de cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) a diferentes niveles de temperatura

Para las pruebas de supervivencia se utilizó 3 tubos, uno por cada cepa de *Lactobacillus plantarum* con distintos niveles de temperatura (30°C, 37°C y 45°C); a los cuales se le realizó cuatro repeticiones a cada tratamiento, obteniendo un total de 24 unidades experimentales para cada cepa. Para mantener los niveles de temperatura se utilizó autoclave y estufa y se introdujo en la incubadora de CO₂ cada una de las cepas con sus respectivos niveles de temperatura durante un lapso de 24 - 48 horas. Luego de esto se midió los resultados mediante el espectrofotómetro UV de marca JENWAY 6305 por medio de densidad óptica a una Longitud de Onda de 560 nm con un factor de 0,9.

Evaluación de supervivencia de cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) a diferentes niveles de pH

Para las pruebas de supervivencia de pH se utilizó 5 tubos por cada cepa de *Lactobacillus plantarum*, cada uno con un nivel de pH distinto (7,5 - 6,7 - 5,0 -

4,0 - 3,4), se realizó cuatro repeticiones a cada uno de los tratamientos, lo que dio un resultado de 40 unidades experimentales para cada cepa.

Para estabilizar los niveles deseados de pH se utilizaron Hidróxido de Sodio (NaOH) al 10% para elevar al pH y para bajarlo se utilizó Ácido Clorhídrico (HCl) al 10%, los cuales fueron medidos con el potenciómetro (Oakton pH 700) y se procedió a colocar en la autoclave (Yamato SM510) para esterilizar el medio y se introdujo en la incubadora de CO₂ (Barnstead Labline) cada una de las cepas durante un lapso de 24- 48 horas. Luego de esto se midió los resultados mediante el espectrofotómetro por medio de densidad óptica a una Longitud de Onda de 560 nm con un factor de 0,9.

Evaluación del crecimiento de cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) en sales biliares

Se utilizó 135 ml del medio agar MRS al cual se agregó 0,4 g de sales biliares (Oxgall al 0,3%), donde se dejó reposar durante 48 horas. Seguido de esto se volvió a emplear 135 ml del medio agar MRS, esta vez sin agregar sales biliares y se envió a la autoclave durante 15 minutos a 121°C y después de realizado este procedimiento se sembró las cepas dentro del medio, empleando el método de siembra por dilución (Jiménez, 2011) y se dejó refrescar con pase de 24 horas.

Después de las 24 horas post-sembrado se centrifugó (Centrífuga LMC-4200R) a 6000 RPM, luego de esto se retiró el sobrenadante y se obtuvo el pelet. Una vez obtenido el pelet se llevó mediante azas a los tubos con sales biliares a una dilución de 1+9 que es igual a 0,1 de inóculo más 0,9 del medio agar MRS y se procedió a distribuir el diluido a cada tubo de ensayo. Luego de esto se midió los resultados mediante el espectrofotómetro por medio de densidad óptica a una Longitud de Onda de 560 nm con un factor de 0,9 a las 3 horas y 6 horas, para medir el crecimiento de las cepas bacterianas en sales biliares.

Visualización de resultados mediante espectrofotómetro

Se midió mediante Densidad Óptica (DO) con el espectrofotómetro (marca JENWAY 6305). Se procedió a encender el espectrofotómetro 15 minutos antes de sacar las cepas de la incubadora de CO₂ para calibración interna

(automáticamente) Pasado los 15 minutos se procedió a la calibración manual que consistió en mover el rango de Longitud de Onda a 560 nm con un factor de 0,9. Seguido a esto se tomó una cubeta plástica en la cual se llevó la muestra al espectrofotómetro donde se calibró la tolerancia al 100%.

RESULTADOS

Evaluación de supervivencia de cepas de *Lactobacillus plantarum* (22 Lmc & 41 Lmc) a diferentes niveles de temperatura, pH y sales biliares

A las 24 horas post-incubación no existe diferencia significativa entre las cepas ($p > 0,05$). Con lo que se puede analizar un mismo patrón de tendencia en estos resultados. Sin embargo, se puede apreciar que la población bacteriana de la cepa 22 Lmc presentaron una mayor densidad óptica de 1,77 a las 24 horas. Mientras que a las 48 post-incubación horas se observó que las cepas difieren estadísticamente ($p < 0,05$) y que la cepa 22 Lmc presenta mayor densidad óptica con 1,90 sobre la cepa 41 Lmc.

Los tratamientos aplicados a la cepa 22 Lmc y 41 Lmc con pH correspondientes a 3,4 - 4,0 - 6,7 - 7,5 no difieren estadísticamente entre sí a las 24 y 48 horas post-incubación, es decir, no existe diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0,05$). Sin embargo, se puede apreciar que el tratamiento aplicado con un pH de 5,0 a la cepa 22 Lmc a las 24 horas post-incubación si difiere estadísticamente con los otros niveles con excepción del tratamiento de pH de 3,4; mientras que en la cepa 41 Lmc además del pH 3,4 interfiere también con el pH de 7,5 ($p < 0,05$).

A las 3 y 6 horas post-incubación no existe diferencia significativa entre la cepa 22 Lmc y las cepas de control (22 Lmc y 41 Lmc sin presencia de sales biliares), mientras que la cepa 41 Lmc con presencia de sales biliares si interfieren estadísticamente, mostrando una diferencia altamente significativa ($p < 0,05$). Sin embargo, se puede apreciar que las bacterias de la cepa 41 Lmc con presencia de sales biliares presentaron mayor densidad óptica de 0,72 a las 3 horas y de 0,83 a las 6 horas post-incubación lo que podría indicar que hubo crecimiento en sales biliares.

Cuadro 1. Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 24 y 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de temperatura

| Cepas | Densidad óptica (DO) de 560 (nm) | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|--------------|-----|--------------|
| | Temperatura | 24 horas | | 48 horas |
| 22 Lmc | 30° C | 1,40 | A | 1,82 A |
| | 37° C | 1,75 | C D | 1,89 A |
| | 45° C | 1,77 | C D | 1,90 A |
| 41 Lmc | 30° C | 1,48 | A B | 1,72 A |
| | 37° C | 1,58 | B C | 1,72 A |
| | 45° C | 1,72 | C D | 1,75 A |
| Error Estándar: | | 0,04 | | 0,06 |
| Valor de Probabilidad: | | 0,009 | | 0,844 |

Cuadro 2. Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 24 y 48 horas de cultivación con la aplicación de los diferentes niveles de pH

| Cepas | Densidad óptica (DO) de 560 (nm) | | | |
|--------|----------------------------------|----------|-----|------------|
| | pH | 24 horas | | 48 horas |
| 22 LMC | 5,00 | 1,30 | A B | 2,45 A B |
| | 3,40 | 2,00 | B C | 3,33 D E |
| | 7,50 | 2,10 | C | 3,48 E |
| | 6,70 | 2,15 | C | 3,20 C D E |
| | 4,00 | 2,30 | C | 3,23 C D E |

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------|--------------|---|---|------|--------------|---|---|---|---|
| | 5,00 | 1,20 | A | | 2,20 | A | | | | |
| | 7,50 | 1,68 | A | B | C | 2,38 | A | B | | |
| 41 LMC | 3,40 | 1,85 | A | B | C | 2,73 | A | B | C | |
| | 6,70 | 2,00 | | B | C | 2,75 | | B | C | |
| | 4,00 | 2,20 | | | C | 2,85 | | B | C | D |
| Error Estándar: | | 0,16 | | | | 0,11 | | | | |
| Valor de Probabilidad: | | 0,839 | | | | 0,007 | | | | |

Cuadro 3. Datos de la medición por densidad óptica de las Cepas de *Lactobacillus plantarum* a las 3 y 6 horas de cultivación con/sin la aplicación de sales biliares

| Densidad óptica (DO) de 560 (nm) | | | | | |
|---|-----------------------|------------------|----------------|------------------|---|
| Cepas | Sales biliares | 3 horas | 6 horas | | |
| 22 Lmc | Presencia | 0,42 | A | 0,56 | A |
| 22 Lmc | Ausencia | 0,38 | A | 0,53 | A |
| 41 Lmc | Presencia | 0,72 | B | 0,83 | B |
| 41 Lmc | Ausencia | 0,45 | A | 0,55 | A |
| Error Estándar: | | 0,02 | | 0,02 | |
| Valor de Probabilidad: | | <0,001 | | <0,001 | |

Sánchez *et al.*, (2011) deduce que el uso de los lactobacilos como probióticos en los últimos años cobra un interés creciente debido a sus propiedades benéficas en animales y humanos. Sin embargo, en explotaciones ecuatorianas no se usan ampliamente los aditivos microbianos. Al parecer comienzan a realizarse evaluaciones y trabajos donde se demuestran beneficios dentro de los probióticos (Flores, 2015).

Ante la realidad y tomando en consideración lo citado antes por autores mencionados, se puede percatar que la importancia de los *Lactobacillus* en la microflora intestinal es relativamente alta, y la determinación de crecimiento en diferentes niveles de pH, temperatura y sales biliares de estas cepas autóctonas se dará con fin productivo, ya que el uso de estos microorganismos como probióticos ayudan a elevar y/o mantener en un nivel óptimo el tracto gastrointestinal beneficiando al animal y propietario elevando la producción.

CONCLUSIONES

En la investigación realizada se obtuvo que las cepas de *Lactobacillus plantarum* presentan similitud en crecimiento frente a diferentes niveles de temperatura controlados de las cepas medido por densidad óptica a las 24 y 48 horas donde las cepas 22 Lmc y 41 Lmc tuvieron un mayor desarrollo en temperaturas de 45°C. Pero por los índices calculados y las frecuencias que se obtuvieron en la población de crecimiento de ambas cepas de *Lactobacillus plantarum*, se puede manifestar que son bacterias que toleran temperaturas de entre 30°C a 45 °C sin alterar su proliferación.

En la supervivencia a pH de las dos cepas estudiadas, se encuentra que ambas cepas tienen un buen desarrollo en pH de 3,4 - 4,0 - 6,7 - 7,5 donde su crecimiento fue mayor tanto a las 24 como a las 48 horas, teniendo un pico más elevado en un pH de 4,0; mientras que en un pH de 5,0 hubo escaso desarrollo comparado con los otros niveles según lo medido mediante el espectrofotómetro.

Las cepas estudiadas al ser observadas por DO se pudo divisar que tuvieron un buen desarrollo en la presencia de sales biliares, destacándose más el tratamiento 19 de la cepa 41 Lmc en los tratamientos sobre la cepa 22 Lmc a las 3 y 6 horas respectivamente, lo que podría indicar que hubo un óptimo crecimiento en sales biliares e inclusive un mayor desarrollo con la presencia de dichas sales.

LITERATURA CITADA

Ávila, J. 2010. Capacidad probiótica de cepas de *Lactobacillus* extraídas de tracto gastrointestinal de animales de granja. Maracaibo, VE. Revista Científica, FCV-LUZ. 20 (2): 161-169.

- Cepero, R. 2006. Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: causas y consecuencias. (En línea). ES. Consultado, 24 de oct. 2016. Formato PDF. Disponible en: <http://www.wpsa-aeca.es>
- Flores, L. 2015. Evaluación de tres dosis de un preparado microbiano, obtenido en Ecuador, en la respuesta productiva y sanitaria de cerdos en postdestete. Boyacá, CO. Ciencia y Agricultura (Rev Cien Agri). 12 (2): 59-70.
- Jiménez, A. 2011. Métodos de siembra de cultivos. Rev. Salud Anim. 33 (3): 154-160
- Jurado, H; Aguirre, D; Ramirez, C. 2009. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. Córdoba, CO. Rev. MVZ Córdoba. 14 (2): 1723-1735.
- Jurado, H; Calpa, F; Chaspuengal, A. 2014. Determinación in-vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. Bogotá, CO. Rev Fac Med Vet Zoot. 61 (3): 241-257.
- Sánchez, L; Vichi, J; Llanes, M; Castro, E; Soler, D; Espinoza, I; Kociubinski, G; Ferreira, C. 2011. Aislamiento y caracterización in-vitro de cepas de *Lactobacillus* spp. como candidato a probióticas. La Habana, CU. Revista de Salud Animal. 33 (3): 144-160.
- Sánchez, L; Omura, M; Lucas, A; Pérez, T; Llanes, M; De Luce, C. 2015. Cepas de *Lactobacillus* spp. Con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. La Habana, CU. Rev. Salud Anim. 37 (2): 94-104.
- Santomá, G; Ayala, P; Guitierrez, A. 2006. Estrategias Alimentarias en la Producción de Pollos sin Antibióticos Promotores del crecimiento. Conferencia impartida por Tecna-Trouw Nutrition, 2 Nutreco Poultry and Rabbit Research Centre