

EVALUACIÓN IN VITRO DE RESISTENCIA DE BACTERIAS LACTICAS A LA BARRERA GASTRICA Y BILIAR DE CERDITOS Y A ENTEROBACTERIAS PATOGENAS

Oxalis Rodríguez¹, J. Perea¹, Y. Martín², M. Fernández¹, I. Padrón¹ y M. Núñez de Villavicencio¹

¹Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria. Carretera al Guatao, km 3 ½. La Habana, Cuba
email: oxalis@iia.edu.cu

²Centro Nacional de Epizootiología, Diagnóstico e Investigación, Avenida 51 e/332 y 334. Arroyo Arenas La Habana, Cuba

RESUMEN

Se realizaron cuatro experimentos con cinco repeticiones cada uno para estudiar la efectividad de Lactobacillus acidophilus y Lactobacillus casei como probióticos en cerdos. Las cepas utilizadas provenían del banco de cepas del Instituto. Se evaluó la capacidad de proliferar y resistir distintos pH (1.5, 2.0, 2.5 y 3.0), la facultad de crecer en presencia de concentraciones de bilis (0.1, 0.5 y 1.0%), y la habilidad de resistir la combinación de pH=2.5 y 1% de bilis. Además se estudió la potencialidad de estos lactobacilos para inhibir el crecimiento de una cepa enteropatógena de Escherichia coli aislada de cerdos con diarreas. En los cuatro experimentos se utilizó un análisis de varianza de acuerdo con una clasificación simple.

Los resultados demostraron que ambas cepas de lactobacilos toleraron las condiciones de pH y concentraciones de bilis similares a las del tracto gastrointestinal del cerdo, y mostraron un 100% de inhibición del crecimiento de la cepa patógena a las 24 horas de incubación. Existieron diferencias significativas (P<0.05) entre los valores obtenidos en cada una de las condiciones de stress con respecto al patrón.

Los resultados de la presente investigación evidencian que los lactobacilos examinados presentan buenas características para ejercer un efecto probiótico en los cerdos.

Palabras claves: cerdos, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, probióticos

Título corto: Evaluación de probióticos para cerdos

IN VITRO STUDIES OF RESISTANCE OF LACTIC BACTERIS TO THE PIGLET GASTRIC AND BILIAR BARRIER AND TO PATHOGEN ENETEROBACTERIAE

SUMMARY

Four experiments involving five replications each were conducted to study the effectiveness of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei as probiotic for pigs. The strains were from the bank of strains of the Institute. The capacity of proliferation and resistance to different pH (1.5, 2.0, 2.5 and 3.0) was evaluated, as well as the ability of growth in presence of several bilis concentration (0.1, 0.5 and 1.0%), and the ability to resist a combination of pH=2.5 and 1% bilis. Additionally, the potential of lactobacilli to inhibit the growth of an enteropathogen strain of Escherichia coli isolated from diarrhoeic pigs was studied. In all experiments the analysis of variance was conducted according to a one way classification.

Results showed that both strains of lactobacilli tolerated pH and bilis concentration similar to that of the gastrointestinal tract of pigs, and showed 100% growth inhibition of the pathogen strain after 24 hours of incubation. There were significant (P<0.05) differences among the obtained values in every stress conditions with respect to the control treatment.

Results from the current investigation clearly show that the examined lactobacilli do have good characteristics so as to exert a probiotic effect in pigs.

Key words: pigs, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, probiotics

Short title: Evaluation of probiotics for pigs

INTRODUCCIÓN

En las condiciones intensivas de producción de cerdos, y fundamentalmente durante los primeros días de nacidos, el riesgo de enfermedades gastrointestinales es elevado.

Tradicionalmente, se han adoptado estrategias para la erradicación de estas enfermedades infecciosas, entre las que

se destacan la utilización de antibióticos como tratamiento preventivo. El empleo indiscriminado de estos fármacos es la causa de la aparición de cepas resistentes y de la presencia de

residuos de antibióticos en las carnes, por lo que se ha prohibido internacionalmente su uso (Choct 2001; Blake et al 2003). Hasta la fecha, el mayor esfuerzo alternativo se ha realizado incorporando a los piensos sustancias o aditivos legalmente permitidos que ejercen una acción moduladora de la población microbiana o directamente un efecto antimicrobiano. Entre estos aditivos se encuentran los probióticos, que constituyen microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped (FAO 2002).

En la caracterización de las cepas lácticas como probióticos para cerdos se requiere conocer la capacidad que tienen para proliferar a su temperatura óptima en medio nutriente a un valor de pH menor de 3. Además deben crecer en medio nutriente conteniendo al menos 0.15% de bilis. La bacteria debe ser capaz de sobrevivir y proliferar bajo estas condiciones para poder atravesar el tracto gastrointestinal del animal (Tuomola et al 2001).

El presente trabajo tuvo como objetivo conocer la efectividad de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* del banco de cepas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria para su utilización como probióticos en cerdos. La información aquí presentada forma parte de la tesis de maestría de la primera autora (Rodríguez 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Generalidades

Se utilizaron dos cepas, una de *Lactobacillus acidophilus* y otra de *Lactobacillus casei* procedentes del banco de cepas del Instituto de Investigaciones de la Industria Alimentaria. Para las pruebas de antagonismo se empleó una cepa enteropatógena salvaje de *Escherichia coli*, aislada de cerdos enfermos con diarreas en el Centro Nacional de Epizootiología, Diagnóstico e Investigación.

Las bacterias lácticas fueron mantenidas independientemente en leche esterilizada (10% sólidos totales) mediante reactivaciones semanales y se conservaron en refrigeración a 4 - 6°C. La cepa de *Escherichia coli* fue mantenida en agar/sangre de carnero al 10%, mediante reactivaciones semanales, conservándola en refrigeración a 4-6°C.

Los monocultivos de *Lactobacillus acidophilus* (viabilidad, 10^7 ufc/mL) y *Lactobacillus casei* (viabilidad, 10^7 ufc/mL) fueron inoculados en el suero dulce de queso de leche de vaca a razón de 1% (v/v), empleándose un cultivo mixto de bacterias lácticas con una relación de inóculo 1:1. Para los estudios de antagonismo se ajustó la concentración de *Escherichia coli* a 3×10^8 ufc/mL y seguidamente se inoculó dicha suspensión en 100 mL de suero fermentado.

Para el cultivo de los microorganismos se utilizaron diferentes medios de cultivo. El suero dulce de queso de leche de vaca resultante del proceso de elaboración de queso fresco fue obtenido en la planta de lácteos del Instituto. Este subproducto constituyó el medio de cultivo para el crecimiento de las bacterias lácticas. El agar MRS (Oxoid) se utilizó para el conteo de células viables de los lactobacilos y el agar violeta rojo/ bilis (Centro de Biopreparados, Cuba) se utilizó para el conteo de células viables de coliformes.

Se realizaron cuatro experimentos con cinco repeticiones cada uno, para comprobar in vitro, la capacidad de las cepas de

Lactobacillus acidophilus y *Lactobacillus casei* de soportar las barreras presentes en el tracto gastrointestinal del cerdo, tomando como referencia el método utilizado para simular las barreras gástricas de humanos (Fragoso et al 2000).

Experimento 1. Resistencia de las bacterias lácticas a la barrera de pH

Para demostrar la resistencia que tenían las bacterias *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* a las condiciones de pH durante su paso por el tracto digestivo del cerdo, se simuló la barrera gástrica en el rango de pH de 1.50-3.00, determinándose la viabilidad individual de estos microorganismos ante dichas condiciones de stress.

Se acidificó el suero dulce de queso de leche de vaca con HCl hasta obtener diferentes valores de pH igual a 3.0, 2.5, 2.0 y 1.5. Se inoculó el cultivo mixto de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* con 8.9 y 9.5×10^7 ufc/mL respectivamente. Se propició un tiempo de contacto de una hora a 37°C. Como patrón se tomó el suero inoculado sin ajuste de pH, determinándose el conteo de viables a cada uno de los pH ensayados.

Experimento 2. Evaluación de la resistencia de las bacterias lácticas a la bilis de cerdo

Se utilizó bilis fresca de cerdo recolectada en la planta piloto de carne del Instituto. Se utilizaron erlenmeyers de 150 mL de capacidad conteniendo 100 mL de caldo MRS más 0.1%, 0.5% ó 1.0% de bilis fresca de cerdo. Se inocularon los erlenmeyers al 1% con las cepas de microorganismos seleccionados para este estudio y se incubaron a una temperatura de 37°C durante tres horas de contacto. Como patrón se utilizó la viabilidad del cultivo en medio caldo MRS (Oxoid) sin bilis.

Experimento 3. Efecto combinado de pH y bilis sobre el crecimiento de las bacterias ácido lácticas

Para comprobar la habilidad de ambos lactobacilos de resistir la combinación de pH = 2.5 y 0.5 % de bilis. Se realizó la prueba combinada manteniendo el suero fermentado con *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* en un tiempo de contacto de 1 hora a un pH 2.5 (ajustándose con solución ácida de HCl). Seguidamente se adicionó solución de bilis fresca de cerdo hasta una concentración de 0.5 %, incubándose posteriormente a una temperatura de 37°C durante tres horas de contacto. Como control se utilizó el suero fermentado.

El conteo de viables fue el criterio utilizado para analizar el efecto de la barrera gástrica sobre los lactobacilos.

Experimento 4. Antagonismo de bacterias lácticas hacia una cepa enteropatógena de *Escherichia coli*

Para demostrar la capacidad inhibitoria, se efectuó el enfrentamiento de las bacterias probióticas y la bacteria enteropatógena aislada de cerdos con cuadros diarreicos. La población inicial de microorganismos patógenos fue ajustada según la escala del método turbidimétrico desarrollado por Mc Farland (1995, citado por García 2004).

Los diámetros de los tubos y el volumen de las suspensiones utilizadas fueron iguales a los estándares. La concentración de *Escherichia coli* se ajustó a 3×10^8 ufc/mL y seguidamente se inoculó dicha suspensión en 100 mL de suero fermentado, contenido en erlenmeyers de 150 mL de capacidad. Se agitó

durante 5 minutos en zaranda a 150 rpm. Posteriormente se prepararon las diluciones en agua peptonada estéril y se procedió a la siembra a profundidad en medio agar violeta rojo bilis. La incubación se realizó a una temperatura de 37°C, durante 24 horas. Paralelamente se inocularon elenmeyers con las mismas condiciones pero sólo con *Escherichia coli*, tomándose estos como patrón.

La cuantificación del microorganismo patógeno se realizó a las 0 y a las 24 horas de incubación. Los resultados se procesaron mediante el promedio del recuento de las colonias en placas duplicadas, expresándose como viabilidad celular del patógeno (log ufc/mL) contra tiempo en horas.

Para los cuatro experimentos se utilizó un análisis de varianza de clasificación simple, procesado con el paquete estadístico SPSS (2002). En todas las pruebas se hicieron cinco repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Resistencia de las bacterias lácticas a la barrera de pH

Los resultados de los valores de viabilidad de los cultivos de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* frente a la barrera de pH gástrico y los de su comportamiento en el medio control se presentan en la tabla. 1.

Tabla 1. Viabilidad de lactobacilos frente a valores diferentes de pH

pH	Viabilidad, log ufc/mL		EE ±
	Lactobacillus casei	Lactobacillus acidophilus	
	Control		
4.50 ± 0.05	7.914	7.932	0.007
Sometido a stress			
3.00 ± 0.05	7.652	7.799	0.012
2.50 ± 0.05	7.397	7.623	0.014
2.00 ± 0.05	6.982	7.172	0.013
1.50 ± 0.05	5.930	5.963	0.010
EE ±	0.021*	0.004*	

* P<0.05

La viabilidad de ambos lactobacilos osciló en el orden de 10^5 y 10^7 ufc/mL aunque en el caso del cultivo de *Lactobacillus casei* se observó una disminución de la viabilidad mayor que la mostrada por *Lactobacillus acidophilus*. El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas (P<0.05) en el número de microorganismos viables obtenido a los diferentes valores de pH ensayados con respecto al control (pH, 4.5). Estas diferencias desde el punto de vista biológico no se consideran invalidantes ya que los valores de viabilidad celular, luego de ser sometidos a condiciones drásticas, fueron superiores a 10^5 ufc/mL, valor informado como mínimo terapéutico (García et al 2005).

El comportamiento de los cultivos frente a valores de pH bajos, reafirmó el criterio de muchos autores de que estos microorganismos son capaces de sobrevivir en condiciones de acidez similares a las existentes en el estómago de animales y seres humanos. Con este resultado se confirmó además la ácido-tolerancia de estas bacterias, que es una de las características comunes entre los microorganismos

pertencientes al género *Lactobacillus* (Holt et al 1994; Leveau y Bouix 2000).

La resistencia que mostró *Lactobacillus acidophilus* a la barrera de pH concuerda con los resultados informados por Gusils et al (2002) cuando comprobaron la sobrevivencia de una cepa *Lactobacillus acidophilus* a pH = 3. Ahn et al (2002), obtuvieron resultados similares demostrando que las cepas de *Lactobacillus acidophilus* PF 01 y CF 07 aisladas de cerdos y pollos, resistían durante dos horas valores de pH de 2.0 y 2.5 respectivamente.

A partir de estos resultados puede esperarse que ambos microorganismos al ser ingeridos, puedan soportar la barrera del pH gástrico del cerdo y pasar al intestino para su posible implantación.

Experimento 2. Evaluación de la resistencia de bacterias lácticas a la bilis de cerdo

Los valores de las medias de la viabilidad obtenida al enfrentar el cultivo a bilis fresca de cerdo (simulando la permanencia del cultivo en el tracto gastrointestinal) se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Viabilidad de lactobacilos a diferentes concentraciones de bilis de cerdos

Bilis, %	Viabilidad, log ufc/mL		EE ±
	Lactobacillus casei	Lactobacillus acidophilus	
- ¹	7.852	7.832	0.007
0.1	7.383	7.656	0.056
0.5	6.819	7.309	0.015
1.0	6.522	7.208	0.020
EE ±	0.014*	0.020*	

¹ Control con agar MRS (Oxoid)

* P<0.05

Se pudo constatar que la resistencia de los cultivos a la bilis fue buena, aún en presencia del 1% de bilis como condición extrema, se obtuvieron conteos de microorganismos viables en el orden de 10^5 y 10^7 ufc/mL. La viabilidad del cultivo de *Lactobacillus acidophilus* fue menor a la alcanzada para *Lactobacillus casei*. El análisis de varianza indicó que existieron diferencias significativas (P<0.05) entre los valores de viabilidad celular obtenidos para las diferentes concentraciones de bilis empleadas con respecto al patrón. Aunque los conteos de células viables más altos se obtuvieron con 0.1% de bilis fresca de cerdo, cabe destacar que los valores más bajos de viabilidad (empleando 1% de bilis) estuvieron por encima del mínimo terapéutico, lo cual evidencia que ambos lactobacilos fueron capaces de crecer en presencia de concentraciones biliares similares a las que se pueden encontrar en el intestino del cerdo.

Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con los publicados por Gusils et al (2002), quienes obtuvieron una cepa de *Lactobacillus acidophilus* capaz de sobrevivir en presencia de sales biliares. Ahn et al (2002), quienes inocularon cepas de *Lactobacillus acidophilus* PF 01 y CF 07 aisladas de cerdos y pollos en medio MRS con 0.3% de bilis de cerdo, comprobaron que las cepas eran capaces de resistir tales condiciones de stress. Brizuela (2003), utilizando *Lactobacillus rhamnosus* encontró buenos resultados en la viabilidad de la cepa empleando 0.15% de bilis Oxoid.

Experimento 3. Efecto combinado de pH y bilis sobre el crecimiento de las bacterias lácticas

Los valores medios de la viabilidad de los microorganismos estudiados obtenidos en la prueba de simulación de la barrera gástrica combinando las condiciones de pH y bilis se presentan en la tabla. 3. Se pudo apreciar que la viabilidad de ambos lactobacilos se mantuvo en el orden de 10^7 ufc/mL, la más afectada fue la del cultivo de *Lactobacillus acidophilus*. Es válido destacar, que aunque los valores de las medias de la viabilidad de los lactobacilos bajo estas condiciones de stress, resultaron ser significativamente diferentes ($P < 0.05$) del control, el resultado es aceptable, ya que se mantuvo también en este caso, la viabilidad de las bacterias por encima del valor mínimo terapéutico requerido (10^5 ufc/mL).

Tabla 3. Viabilidad de lactobacilos frente a la combinación de pH y bilis

pH y bilis	Viabilidad, log ufc/mL		EE ±
	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
Control			
4.50 ± 0.05 y 0% bilis	7.914	7.932	0.007
Sometido a estrés			
2.5 ± 0.05 y 0.5% bilis	7.192	7.106	0.019
EE ±	0.015*	0.013*	

* $P < 0.05$

Estos resultados son comparables con los informados por Ahn et al (2002) y Gusils et al (2002), quienes refirieron una alta resistencia de los microorganismos a la barrera gástrica, en condiciones similares a las de este experimento. Gilliland et al (1985) y Lee y Wong (1998), afirmaron que para que una cepa probiótica ejerza una óptima actividad es imprescindible que la misma sea capaz de manifestar una actividad metabólica que le permita multiplicarse o colonizar en el intestino delgado, por lo que la tolerancia a bilis, es un criterio esencial de selección a la hora de evaluar microorganismos destinados a estos fines

Experimento 4. Antagonismo de bacterias lácticas hacia una cepa enteropatógena de *Escherichia coli*

El estudio de la capacidad antagonista de los microorganismos presentes en el producto hacia *Escherichia coli*, se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Antagonismo de bacterias lácticas hacia una cepa enteropatógena de *Escherichia coli*

Tiempo, horas	Viabilidad, log ufc/mL	
	Sin lactobacilos	Con lactobacilos ¹
0	6.469	6.477
24	8.778	0

¹ *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*. Para detalle, ver texto

A las 24 horas de incubación se alcanzó un 100% de inhibición del ente patógeno. Este resultado coincide con los obtenidos por Ahn et al (2002) y Gusils et al (2002) al enfrentar cepas de *Lactobacillus acidophilus* con varios enteropatógenos de cerdos.

La capacidad de inhibición de ambos lactobacilos puede atribuirse a las características que presentan la mayoría de este tipo de bacterias ácido-lácticas, de producir sustancias antagonistas tales como el ácido láctico, acético y otros compuestos volátiles que disminuyen el pH del medio, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Estas últimas forman poros en la membrana de los patógenos afectando la carga energética y junto a los restantes compuestos crean un ambiente hostil para los microorganismos patógenos evitando que se repliquen y produzcan infecciones como se evidencian en los resultados obtenidos por Otsuka et al (2002).

Según Ahn et al (2002) y Gusils et al (2002) aquellas bacterias que sean capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y además de crecer en condiciones de pH y concentraciones de sales biliares similares a las del tracto digestivo del animal, son microorganismos con características promisorias para su posterior empleo como probióticos. Con este trabajo se demostró que las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* del banco de cepas del Instituto utilizadas en este estudio toleran condiciones de pH y concentración de bilis similares a las del tracto gastrointestinal del cerdo. Además el cultivo mixto de ambos microorganismos logró un 100% de inhibición del patógeno utilizado a las 24 horas de incubación por lo que presentan buenas características para ejercer un efecto probiótico en las crías.

REFERENCIAS

- Anh, Y.T., Lim, K.L., Ryu, T.C., Kang, D.K., Ham, J.S., Jang, Y.H. y Kim, H.U. 2002. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 15:1790-1792
- Blake, D.P., Hillman, K. y Fenlon, D.R. 2003. The use of a model ileum to investigate the effects of novel and existing antimicrobials on indigenous porcine gastrointestinal microflora: using vancomycin as an example. *Animal Feed Science and Technology*, 103:123-133
- Brizuela, M.A. 2003. Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos. Tesis DrSci Veterinarias Universidad Agraria de La Habana. San José de las Lajas, pp
- Choct, M. 2001. Alternatives to feed antibiotics in monogastric animal industry. *ASA Technical Bulletin*. AN, p 30
- FAO. 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London (Ontario) Versión electrónica disponible in: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Fragoso, L., Fernández, M., García, I., Álvarez, G. y Pulido, J. 2000. Evaluación de cepas lácticas para su aplicación como probiótico. *Revista Alimentaria*, 89(7):4-5
- García, H. 2004. Obtención de leche fermentada con microorganismos mesófilos probióticos. Tesis MSci. Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana, pp
- García, A., Moya, Y., García, H., Beldarían, T., Hernández, U. y Lorenzo, A. 2005. Empleo de *Lactobacillus acidophilus* como cultivo probiótico en la dieta de cerdos jóvenes. *Forum Municipal de Ciencia y Técnica*. La Habana, pp 8

Gilliland, S.E., Nelson, C.R. y Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied Environment Microbiology*, 49:377-381

Gusils, C., Bujazha, M. y González, S. 2002. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. *Interciencia (Caracas)*, 27:409-413

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. y Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th edition). Editorial Williams and Wilkins. Baltimore. Parte 3, p 566

Lee Y.K. y Wong, S.F. 1998. Stability of lactic acid bacteria in fermented milk. In: *Lactic acid Bacteria, Microbiology and Funcional Aspects* (S. Salminen y A. von Wright, editors). Marcel Dekker In Company. New York, p 103 -114

Leveau, J.Y. y Bouix, M. 2000. Los microorganismos de interés industrial. Editorial Acribia, Zaragoza, 2:167-323

Otsuka, M., Muto, T., Katsusama, Y., Nakamura, Y. Takada, R. y Minato, M. 2002. Effect of administration of acid and a bile tolerant *Lactobacillus* on pigs intestinal microbial population. *Animal Sciences*, 73:497-503

Rodríguez, O. 2007. Obtención de un suero fermentado por *L. casei* y *L. acidophilus* con propiedades probióticas para cerdos lactantes. Tesis MSci Biol. Universidad de La Habana. La Habana, pp 74

SPSS. 2002. *SPSS Statistics, version 11. Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Company In Company*. Chicago (Illinois). Versión electrónica disponible in: <http://www.spss.com>

Tuomola, E.M., Cristtenden, R., Playne, M., Isolauri, E. y Salminen, S.J. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(supplement):393S-398S