

# CAPACIDAD PROBIÓTICA DE CEPAS DEL GÉNERO *Lactobacillus* EXTRAÍDAS DEL TRACTO INTESTINAL DE ANIMALES DE GRANJA

## Probiotic Properties of Strains of *Lactobacillus* Genus Extracted from Intestinal Tract of Farm Animals

José Ávila<sup>1\*</sup>, Manuel Ávila<sup>1</sup>, Belkis Tovar<sup>1</sup>, María Brizuela<sup>2</sup>, Yurimaua Perazzo<sup>3</sup> y Helis Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fundación CIEPE, San Felipe, Edo. Yaracuy, Venezuela. <sup>2</sup> Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña

de Azúcar (ICIDCA), La Habana, Cuba. <sup>3</sup> Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Facultad de Ciencias Veterinarias. Tarabana, Edo. Lara. \* Tlf +58-0254-2312822. E-mail: josegavila@cantv.net

### RESUMEN

Se aislaron y caracterizaron 14 cepas bacterianas del tracto intestinal de diferentes animales de granja con el fin de seleccionar las cepas con potencial probiótico. Las cepas seleccionadas fueron sometidas a pruebas bioquímicas y además se evaluó su capacidad probiótica mediante pruebas de resistencia al ácido y a las sales de bilis, crecimiento a temperaturas extremas y perfil de fermentación de carbohidratos. Los resultados permitieron la selección e identificación de cuatro cepas de *Lactobacillus* con potencial para ser utilizados como aditivos probióticos en la alimentación animal.

### Palabras clave:

Aditivos alimentarios, bacterias acidolácticas, alimentación animal.

### Abstract

In the present work 14 bacterial strains were isolated and characterized from the intestinal tract of different farm animals, in order to select the strains with probiotic potential. The selected strains were exerted to biochemical trials and also their probiotic properties were evaluated through acid resistance and bile salt trials, extreme temperature growth and the carbohydrate fermentation profile. The results allowed selection and identification of four *lactobacillus* strains with potential to be used as probiotic additives in animal feeding.

### Key words:

Feed additives, acid lactic bacteria, animal feed.

### INTRODUCCIÓN

Los cultivos probióticos han sido asociados históricamente con las leches cultivadas y los productos lácteos, de los

cuales existe suficiente evidencia de los efectos positivos en la salud humana y el bienestar general [10]. El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “para la vida” y se usa actualmente para nombrar bacterias asociadas con efectos beneficiosos para los humanos y animales. Es por ello que se ha definido internacionalmente a los probióticos como “microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero, más allá de la inherente a la nutrición en general” [5]. La microflora intestinal tiene funciones metabólicas, tróficas y protectoras, y puede ser modificada por condiciones patológicas o también por la administración de probióticos exógenos. En orden de ser efectivos y conferir beneficios a la salud del hospedador, los probióticos deben ser capaces de sobrevivir el pasaje a través del estómago y el intestino delgado y estar presentes en suficiente cantidad para impactar el micro-medioambiente del colon de modo que ellos deben tolerar las condiciones ácidas y ricas en proteasas del estómago y sobrevivir y crecer en presencia de ácido y sales biliares [4]. Investigaciones en los últimos 20 años han establecido que la implantación en el colon es la característica crítica que debe poseer una cepa probiótica para poder influenciar el medioambiente intestinal [5].

Las enfermedades entéricas son de mucha importancia en lo que concierne a la industria pecuaria, debido a la pérdida de productividad, incremento de mortalidad y la contaminación asociada a los productos para consumo humano [14]. El surgimiento de acuerdos sobre resistencia a los antibióticos está incrementando a su vez el interés de hallar alternativas en la producción animal. Se ha demostrado que los probióticos tienen potencial para reducir las enfermedades entéricas en las aves de corral y otros animales de granja, y la subsiguiente contaminación de los productos alimenticios derivados de éstos [11]. El estrés que el animal sufre a temprana edad en los sistemas de crianza se debe principalmente a la contaminación ambiental de bacterias, patógenas o no, que colonizan el intestino. De esta forma se crea una exclusión competitiva que determina el establecimiento de microorganismos, y éstos una vez instalados, generan un ambiente mediante la producción de metabolitos que resultan tóxicos para el organismo competente. Esta situación afecta directamente al rendimiento de los animales de granja y motiva el estudio de nuevas alternativas de control [12].

## [Frame 19](#)

El desarrollo de productos probióticos obedece mayormente a la necesidad de sustituir el empleo de antibióticos en la alimentación animal, los cuales son usados para mantener un buen balance en la microflora del tracto gastrointestinal (TGI) y para eliminar microorganismos patógenos facilitando la reducción de enfermedades gastrointestinales frecuentes en animales [11]. Sin embargo, los antibióticos no sólo contribuyen a la destrucción de la microflora intestinal beneficiosa, sino que también, producen efectos residuales en los productos alimenticios de origen animal [15]. Los probióticos pueden soportar condiciones específicas ocurridas en el TGI; éstos pueden resistir por más de 4 horas a las enzimas proteolíticas, los bajos valores de pH (1,8-3,2) prevalecientes en el estómago y la concentración de bilis, jugos pancreáticos y mucus presentes en el intestino delgado. Además, las cepas bacterianas que van a ser usadas en la obtención de probióticos, se supone que deben resistir a los antibióticos eventualmente administrados en la dieta animal, y además producir sustancias antimicrobianas, tales como ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otras [3]. El programa científico que resultó en el descubrimiento del *Lactobacillus rhamnosus* cepa GG (ATCC 53103), describió una serie de criterios que debe cumplir una cepa probiótica ideal, las cuales son presentadas en la TABLA I. Subsecuentemente, estos estándares han sido ampliamente adoptados en la búsqueda de nuevas cepas probióticas [7]. Además, están disponibles muchos métodos para estudiar las características fisiológicas de las cepas probióticas, tales como los perfiles de fermentación de carbohidratos y de la actividad enzimática que han sido ampliamente usados. Con respecto a esto es importante seleccionar el sustrato específico o la actividad enzimática más relevante de la cepa para los efectos funcionales esperados. Otras pruebas específicas como la habilidad de hidrolizar sales de bilis o de producir sustancias antimicrobianas pueden ser de interés, dependiendo del propósito de uso de la cepa [8].

El conocimiento de que el uso de probióticos puede sustituir las terapias con antibióticos como métodos menos agresivos, ha dado como resultado una nueva visión en la industria farmacéutica, al contemplar una tecnología global, desde el aislamiento de probióticos de ecosistemas específicos, tales como un hato o región geográfica, seleccionar y caracterizar a las bacterias responsables de la acción probiótica, producirlas a escala industrial, procesarlas y reintroducirlas a la dieta animal. En muchos casos, el uso no selectivo de probióticos distribuidos por casas comerciales ha dado como resultado una muy baja o nula eficiencia en el aumento de la producción, esto debido probablemente a que los probióticos adquiridos proceden de otras regiones geográficas o incluso de otras especies animales [12]. La especificidad de especie animal es un factor importante que interfiere en la colonización y en la adhesión *in vivo* por parte de los microorganismos. Esto indica que las cepas bacterianas aisladas de la microbiota indígena de una determinada especie no colonizan necesariamente el mismo sitio de otra especie animal. Debido a que el desempeño de los microorganismos probióticos puede variar entre los animales de una misma especie, es conveniente que el inóculo a utilizar esté formado por una mezcla de varias cepas, ya que la funcionalidad de un inóculo probiótico multicepa puede ser más efectiva y consistente que la de una cepa, debido a que los multicepas tienen la posibilidad de complementar sus efectos expresando sus propiedades probióticas en forma sinérgica. Además, es más probable la colonización de un sistema complejo como el gastrointestinal con un

inóculo probiótico multiespecie o multicepa [6].

Por lo antes expuesto surge la necesidad de buscar continuamente cepas probióticas autóctonas, mejor adaptadas a las necesidades nacionales y con características específicas que contribuyan al mejoramiento de la sanidad animal en Venezuela. El presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento, la caracterización y la evaluación de la capacidad probiótica de cepas de *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja.

## [Frame 55](#)

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Extracción de las muestras**

A finales del año 2007, se realizó un muestreo en aves de corral (*Gallus gallus* y *Anas platyrhynchos*), cerdos (*Sus scrofa domestica*) y terneros (*Bos taurus*) criados en pequeñas unidades de producción ubicadas en los estados Lara y Yaracuy de Venezuela. Las muestras se tomaron directamente del intestino delgado del animal. En el caso de terneros y cerdos se realizó mediante una intervención quirúrgica o enterotomía, (FIG. 1) en el Hospital Universitario de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centro occidental Lisandro Alvarado (Tarabana, Edo. Lara) y, en el caso de las aves de corral, se extrajo un segmento de su intestino luego del sacrificio del animal en condiciones de laboratorio.

#### **Aislamiento de microorganismos y medios de cultivo**

Las muestras de contenido intestinal se hicieron crecer en caldo de cultivo MRS (HI-MEDIA, India) específico para el género *Lactobacillus*, y luego se utilizaron placas de petri con agar MRS para aislar las colonias características de bacilos acidolácticos, incubando las muestras en condiciones de microaerobiosis (5-7% v/v de oxígeno) en cubas herméticas Anaerocult® (Merck, Alemania).

#### **Pruebas bioquímicas de selección e identificación**

A las cepas aisladas se les realizaron pruebas de selección, como el crecimiento en agar MRS con verde de bromocresol para determinar la producción de ácido láctico, tinciones de Gram y de esporas, observación de la morfología celular en microscopio (Olympus, CX41. Olympus Corporation, Japón) y las pruebas de producción de enzimas citocromo-c-oxidasa y catalasa utilizando el reactivo de Kovacs y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (Riedel-de Haën, Alemania), respectivamente, además de una prueba de crecimiento en medio MRS (pH 6,5, 37°C x 24 h). La identificación de las cepas seleccionadas se realizó mediante el Kit API® usando el programa Biomerieux (Francia) [1].

#### **Almacenamiento**

Las cepas seleccionadas fueron colocadas en tubos Ependorf de 2 mL con caldo MRS y 30% de glicerol como crioprotector, y congeladas (Nuair, ILS-DF8, Korea) a -86°C para su posterior uso.

#### **Pruebas probióticas**

**Tolerancia al ácido.** Se utilizaron tubos de ensayo de 15 mL de capacidad con 9 mL de caldo MRS ajustados a pH 4; 5 y 6,5 con HCL 6N por triplicado. Se añadió 1 mL (10% v/v) de inóculo inicial refrescado a 16 horas en MRS pH 6,5 y se incubaron (Yamato, DKN-810, EUA) a 37°C por 24 horas, midiéndose el crecimiento por densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) en un espectrofotómetro UV (Jenway, 6405, Inglaterra).

**Crecimiento a diferentes temperaturas.** Se utilizaron tubos de ensayo de 15 mL de capacidad, con 9 mL de caldo MRS a pH 6,5 a los cuales se añadió 1 mL (10% v/v) de inóculo inicial refrescado a 16 horas en MRS pH 6,5 y se incubaron a diferentes temperaturas (15; 37 y 45°C) por 24 horas, midiéndose el crecimiento por DO<sub>600</sub>.

Frame\_57.JPG

**Tolerancia a las sales biliares.** Para este estudio se utilizaron tubos de ensayo de 15 mL de capacidad, con 9 mL de caldo MRS y 0,15 g de una sal de bilis comercial Ox bile (HI-MEDIA) (0,15% p/v) a pH 6,5. Los mismos se inocularon con 1 mL (10% v/v) de inóculo inicial refrescado a 16 horas en MRS pH 6,5 y se incubaron a 37°C por 24 horas, midiéndose el crecimiento por DO<sub>600</sub>.

Capacidad fermentativa. La capacidad de fermentación de carbohidratos se determinó utilizando el perfil de fermentación del kit de identificación API 50 CHL<sup>®</sup>.

## Expresión de resultados y análisis de datos

Los resultados de cada experimento se obtuvieron por el promedio de tres replicas. Para las pruebas de selección se compararon los resultados de las pruebas bioquímicas con las características detalladas en el manual de bacteriología sistemática de Bergey [9] y los resultados de las pruebas de fermentación de carbohidratos del kit API se analizaron usando el programa de identificación apiweb<sup>®</sup> [1]. La tolerancia al ácido, sales biliares y temperatura fue evaluada por el crecimiento, determinado por la diferencia de densidad óptica (DO<sub>600</sub>) entre el inóculo (hora inicial) y luego de 24 horas de incubación (hora final). Adicionalmente, para detectar los efectos de los diferentes niveles de temperatura y pH sobre el crecimiento en cada cepa se aplicaron análisis de varianza y de comparación de medias por mínima diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) a través del programa estadístico Statgraphic plus<sup>®</sup> versión 5,0 [13].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas de selección e identificación de microorganismos

De las muestras extraídas de los diferentes animales se aislaron y caracterizaron 14 colonias (1 de terneros, 7 de pollos, 4 de cerdos y 2 de patos), a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas y de crecimiento (TABLA II). De esta población se seleccionó una cepa por especie, las cuales fueron productoras de ácido láctico, Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas y no presentar esporas, además de mostrar un buen crecimiento en placas de agar MRS a 24 horas de incubación. Las cepas seleccionadas presentaron morfología bacilar y fueron identificadas como *Lactobacillus* de diferentes especies (TABLA III).

### Pruebas probióticas

**Tolerancia al ácido:** El crecimiento de las cepas probióticas seleccionadas se vio afectado significativamente ( $P < 0,05$ ) por los niveles de pH. La FIG. 2 presenta el comportamiento así como la prueba de comparación de medias por cepa para los diferentes niveles de pH. Las cepas C3 y P26 presentaron un crecimiento superior con respecto a las cepas PT7 y T3 para todos los niveles de pH evaluados. La cepa T3 presentó diferencias marcadas en los tres niveles de pH mostrando un mayor crecimiento a pH 5 y bajos a pH 4 y 6,5. Esto sugiere que el máximo crecimiento probablemente se encuentre enmarcado dentro del rango de pH seleccionado en el presente estudio. La cepa P26 mostró menor tolerancia al pH ácido de todas las cepas evaluadas, presentando un crecimiento bajo y similar a los pH de 4 y 5; sin embargo, experimentó un incremento significativo ( $P < 0,05$ ) a pH 6,5. Lo anterior es indicativo de una baja tolerancia de esta cepa a condiciones ácidas. Las cepas C3 y PT7 presentaron un comportamiento similar en el crecimiento al definir tres grupos estadísticamente diferentes, los cuales corresponden a reducciones significativas en el crecimiento con la disminución de los niveles de pH. Esto sugiere que, al incrementar las condiciones ácidas de estas dos cepas su crecimiento se ve reducido. La mayoría de las cepas estudiadas mostraron un mayor crecimiento para el máximo nivel de pH estudiado, lo cual resulta similar a los valores característicos del género *Lactobacillus* [9]. Sin embargo, la cepa T3 presentó mayor crecimiento a pH 5. Esto indica que esta última cepa tiene mayor tolerancia a condiciones ácidas. Este último resultado es comparable con el obtenido por Brizuela [2], al evaluar cepas de *L. rhamnosus* bajo condiciones ácidas similares.

**Crecimiento a diferentes temperaturas.** Los niveles de temperatura ejercieron efectos significativos ( $P < 0,05$ ) sobre el crecimiento de las cepas de manera específica. El crecimiento fue mayor en las cepas C3 y PT7, mientras que las cepas T3 y P26 presentaron bajo crecimiento. La respuesta del crecimiento y la comparación de medias a diferentes niveles de temperatura para las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas se presentan en la FIG. 3. Las cepas C3 y PT7 presentaron un comportamiento similar con respecto a las temperaturas. Estas definieron tres grupos diferentes, los cuales se establecen por incrementos significativos ( $P < 0,05$ ) de los promedios de crecimiento con respecto al aumento en los niveles de temperatura hasta obtener un máximo crecimiento a los 45°C. Es necesario señalar que los máximos promedios de crecimiento para C3 y PT7 se obtuvieron a temperaturas superiores a las típicas del ambiente donde fueron aisladas estas cepas. Sin embargo, esto es característico de las condiciones fisiológicas del género *Lactobacillus* conforme a lo establecido [9]. El crecimiento de la cepa P26 fue bajo a 15 y 45°C y, éste se incrementó significativamente a 37°C. Es probable que el máximo valor de crecimiento esté comprendido en el rango bajo estudio. La temperatura de mayor crecimiento para P26 está asociada a las condiciones de temperatura donde es originaria la cepa, es decir, la temperatura corporal del animal. La cepa T3 presentó dos grupos estadísticamente diferentes de crecimiento, donde los promedios fueron prácticamente invariables de 45 y 37°C, y se redujeron significativamente a los 15°C. Por otra parte, se observó que T3 presenta

una tendencia a crecer más a medida que se incrementa la temperatura (FIG. 3).

**Tolerancia a las sales biliares.** Para este estudio se observaron diferencias claras entre las cepas según lo muestra la FIG. 4, con valores de crecimiento relativamente altos a la concentración de 0,15% de sales biliares para la cepa P26, seguida de un crecimiento medio de las cepas de C3 y PT7 y, por último, un relativamente bajo crecimiento de la cepa T3. Es posible que las condiciones particulares de concentración y tipo de sales biliares de los microambientes de cada especie animal de la cual se extrajeron las muestras contribuyan a que las mismas sean más o menos resistentes a ciertas concentraciones de sales biliares [6].

**Capacidad fermentativa.** El estudio de fermentación de diferentes carbohidratos se presenta en la TABLA IV, donde se observa que ninguna de las cepas estudiadas fue capaz de fermentar glicerol, eritritol, D-arabinosa, D y L-xilosa, D-adonitol, metil-b-D-xilopiranososa, L-sorbosa, dulcitol, inositol, metil-a-D-manopiranososa, D-melobiosa, inulina, D-rafinosa, xilitol, D-xilosa, D-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, 2-cetogluconato potásico ni 5-cetogluconato potásico. La cepa extraída de cerdo fue la única en fermentar L-arabinosa. Del mismo modo, la cepa extraída del pato fue la única en fermentar D-ribosa, L-rhamnosa (característica única del *Lactobacillus rhamnosus*, lo cual lo identifica como tal [2]. D-sorbitol, metil-a-D-glucopiranososa, L-acetil-glucosamina, amigdalina, D-melezitosa, D-turanosa y gluconato potásico tampoco son fermentados por P2. Por otro lado, sólo las cepas P1 y P2 fermentaron D-galactosa y D-lactosa, sólo C1 y P2 fermentaron glicógeno. Las cepas C1 y P1 fermentaron almidón, lo cual alude sus capacidades en la producción de enzimas amilolíticas. Así mismo, C1, P1 y P2 fermentaron D-manitol, arbutina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-sacarosa, D-trehalosa y gentibiosa. Por último, las cuatro cepas estudiadas fermentaron D-glucosa, D-fructosa y D-manosa. Estos resultados contribuyeron en la identificación de las 4 cepas.

Frame\_155.JPG [Frame 66](#)[Frame 68](#)

Frame\_156.JPG

[Frame 69](#)

## Conclusiones

De un total de 14 cepas aisladas de distintos animales de granja, cuatro (PT7, C3, T3, P26) presentaron características para ser evaluadas en su potencial probiótico y fueron identificadas como *Lactobacillus*. En cuanto a las pruebas de capacidad probiótica, éstas mostraron en su mayoría tolerancia a las condiciones ácidas, temperatura y concentración de sales propias del género, siendo las cepas C3 y PT7 las que presentaron un mejor comportamiento. Por otra parte, las cepas bajo estudio fueron diferenciables en cuanto al tipo de carbohidrato que fermentaron. Los resultados indican que las cepas seleccionadas resultan promisorias como probióticos destinados a la alimentación animal y, en tal sentido, se requieren estudios *in vivo* según la especie animal para validar sus efectos benéficos.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Convenio de Intercambio Científico Cuba-Venezuela por el financiamiento del presente trabajo a través del proyecto código P001AE08.

## Referencias bibliográficas

[1]

BIOMERIEUX. Programa en línea de identificación apiweb<sup>®</sup> 2007 On line: <http://www.apiweb.biomerieux.com/>. 25.04.2007.

[2]

Brizuela, M. 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. 101 pp. 2003.

[3]

Brizuela, M.; Serrano, P.; Pérez, Y. Studies on probiotic properties of two *Lactobacillus* strains. **Braz. Arch. Biol. And Techn.** 44 (1): 95-99. 2001.

[4]

Del Piano, M.; Morelli, L.; Strozzi, G.; Allesina, S.; Barba, S.; Deidda, F.; Lorenzini, P.; Ballaré, M.; Montino, F.; Orsello, M.; Sartori, M.; Garelo, E.; Carmagnola, S.; Pagliarulo, M.; Capurso, L. Probiotics: from research to consumer. **Digest Liver Dis** 38: S248 –255. 2006.

[5]

Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization, Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Report. 32 pp. 2001.

[6]

Frizzo, L.; Soto, L.; Bertozzi, E.; Sequeira, E.; Marti, L.; Rosmini, M. Evaluación *in vitro* de las capacidades probióticas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. **Rev FAVE**. 5: 1-2. 2006.

Frame\_169.JPG [Frame 177](#)[Frame 178](#)

[7]

Gorbach, S. Probiotics in the Third Millennium. **Digest Liver Dis** 34: S2-7. 2002.

[8]

Gueimonde, M.; Salminen, S. New methods for selecting and evaluating probiotics. **Digest Liver Dis** 38: S242 –247. 2006.

[9]

Kandler, O.; Weiss, N. Regular nonsporing Gram positive rods. Section 14 In: Garrity, G. (Ed) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 2. Springer, New York. 1208-1260 pp. 1986.

[10]

Nowroozi, J.; Mirzaii, M.; Norouzi, M. Study of Lactobacillus as probiotic bacteria. **Iran J Publ Health** 33: 1-7. 2004.

[11]

Patterson, J.; Burkholder, K. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poult Sci** 82:627–631. 2003.

[12]

Rosmini, M.; Sequeira, G.; Guerrero, I.; Martí, L.; Dalla, R.; Frizzo, L.; Bonazza, J. Producción de probióticos para animales de abasto: Importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. **Rev Mex Ing Quím** 3: 181-191. 2004.

[13]

STATGRAPHICS. Programa estadístico para Windows Statgraphics® Plus 5.0. Statistical Graphics Corp. 2000.

[14]

Taras, D.; Vahjen, W.; Simon, O. Probiotics in pigs. modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. **Livest Sci**. 108: 229–231. 2007

[15]

Wallace, R. Rumen microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: the application of research findings to a complex microbial ecosystem. **FEMS Microbiol. Lett**. 100: 529. 1992.

