

Identificación de *Bacillus toyonensis* en heces de ganado cebú en el Departamento de Sucre, Colombia

Identification of *Bacillus toyonensis* in faeces of zebu cattle in the Sucre Department, Colombia

Lina Marcela Bertel Mesa^{*}, Cesar Augusto Betancur Hurtado^{**}, Luis Eliecer Oviedo Zumaque^{***}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.69421

RESUMEN

Se evaluaron las características probióticas de cepas nativas aisladas de ganado cebú y se realizó identificación molecular de una de estas cepas, para considerar su posterior aplicación como aditivos microbianos en la alimentación bovina. Se usaron muestras de estiércol de terneros de levante, se aislaron bacterias y levaduras, determinándose la capacidad probiótica de estas cepas mediante pruebas como; resistencia a sales biliares (0.05, 0.1, 0.15 y 0.3 %), resistencia a pH ácido (pH 3, 4, 5.6, 7), tolerancia a NaCl (2, 4, 6, 8, 10 %), actividad antagonista (*Salmonella* spp., y *Escherichia coli*), producción de gas a partir de la glucosa, y crecimiento a diferentes temperaturas (37 y 40 °C). La identificación preliminar de las cepas se realizó mediante: tinción de Gram, tinción de endosporas (método de Wirtz), prueba de la catalasa, prueba de oxidasa. Se seleccionó una de las cepas que superó las pruebas probióticas para su identificación mediante métodos moleculares y se realizó el análisis filogenético de la misma utilizando la base de datos NCBI Reference Sequence (RefSeq). Los ensayos se organizaron en un diseño completamente al azar, los resultados obtenidos por triplicado se sistematizaron en el software Statgraphics Centurion XVI y el efecto de los diferentes tratamientos se analizó estadísticamente mediante análisis de varianza. Se aislaron 10 cepas nativas, identificándose molecularmente a *Bacillus toyonensis*. Esta investigación representa el primer reporte molecular de *B. toyonensis* en estiércol de terneros de levante cebú en el Departamento de Sucre, el cual ha sido ampliamente utilizado como probiótico en la nutrición animal.

Palabras claves: bovino, cepas, probiótico, ternero.

ABSTRACT

Probiotic characteristics of isolated native strains from zebu cattle were evaluated and molecular identification of one of these strains was performed to consider their subsequent application as microbial additives for bovine feeding. Manure samples were collected from growing zebu calves. Bacteria and yeasts were isolated and the probiotic capacity of these strains was determined by means of tests such as; resistance to bile salts (0.05, 0.1, 0.15 and 0.3 %), resistance to acid pH (pH 3, 4, 5.6, 7) tolerance to NaCl (2, 4, 6, 8, 10 %), antagonistic activity (*Salmonella* sp. and *Escherichia coli*), gas production from glucose, and growth at different temperatures (37 and 40 °C). Preliminary identifica-

* Bióloga, M.Sc. en Biotecnología. Investigadora del grupo de investigación GRUBIODEQ. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. E-mail: linamarcelab9@gmail.com. Orcid: <http://orcid.org/0000-0003-4142-147X>.

** Médico Veterinario y Zootecnista, M.Sc. en Fisiología. Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Investigador del grupo de investigación GRUBIODEQ. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. E-mail: cbetancour@correo.unicordoba.edu.co. Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7617-2202>.

*** Ingeniero Agrónomo, M.Sc. en Microbiología. Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Biología. Director del Grupo de investigación GRUBIODEQ. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. E-mail: leoviedo@correo.unicordoba.edu.co. Orcid: <http://orcid.org/0000-0002-7797-1580>.

**** Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. P.O. Box 608, Loja, 1101 Ecuador. Fax: 0059372584893.

tion of the strains was performed by techniques such as: Gram staining, endospore staining (Wirtz method), catalase and oxidase test. One of the strains that exceeded the probiotic probes was selected for its identification employing molecular methods and the phylogenetic analysis was performed using the NCBI Reference Sequence (RefSeq) database. The trials were organized in a Completely Randomized Design, whose results obtained in triplicate were systematized in the Statgraphics Centurion XVI software and the effect of the different treatments was analyzed statistically through an analysis of variance. 10 native strains were isolated, identifying *Bacillus toyonensis* molecularly. This research represents the first molecular report of *B. toyonensis* in manure from growing zebu calves in the Sucre Department, which has been widely used as a probiotic in animal nutrition.

Key words: bovine, strains, probiotic, calves.

Recibido: marzo 12 de 2018

Aprobado: octubre 3 de 2019

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la producción animal a nivel mundial enfrenta un sin número de desafíos, los aspectos de bienestar animal tienden a predominar, pero la nutrición y la salud también resultan ser problemáticas. Es por ello que en los sistemas de producción animal intensiva se introducen nuevos productos y tecnologías que permiten la obtención de alimentos más seguros y que al mismo tiempo contribuyan a producciones con una sostenibilidad económica adecuada (Pedroso *et al.*, 2012).

Los recursos forrajeros naturales de la región Caribe se consideran insuficientes para la sostenibilidad de los sistemas de producción con rumiantes, particularmente por su disponibilidad biestacional (Rangel-Ch, 2015). Como el Departamento de Sucre basa su economía principalmente en la ganadería no es ajeno a esta problemática (Lombana *et al.*, 2012) y se proponen diferentes alternativas para cubrir las demandas nutricionales de los animales, una de ellas es la práctica de suplementación con probióticos.

Por otro lado, la especie bovina, está expuesta a diferentes enfermedades durante su ciclo de producción y una de ellas es el síndrome diarreico de origen infeccioso que se presenta frecuentemente durante los primeros diez días de edad. Entre los agentes infecciosos más importantes que intervienen en la enfermedad están *Escherichia coli* y *Salmonella* (Zurita *et al.*, 1990). Para contrarrestar los efectos de dichas enfermedades se utilizan los antibióticos de amplio espectro; pero estos compuestos han originado graves problemas de resistencia microbiana y efectos residuales colocando en riesgo la inocuidad alimentaria (Mathur & Singh, 2005).

Debido a esto se han introducido los probióticos como una alternativa natural al uso de los antibióticos, pues no generan efectos colaterales, al contrario, benefician la salud del animal, mejorando el equilibrio de su microbiota intestinal (Gutiérrez *et al.*, 2013).

Una microflora intestinal equilibrada y estable es de vital importancia para las funciones optimizadas del sistema digestivo y por lo tanto para la prevención de enfermedades (Salminen *et al.*, 1998).

La mayoría de microorganismos que se utilizan como probióticos en los animales pertenecen generalmente a las especies *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, aunque también se utilizan levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y hongos (*Aspergillus oryzae*) (Castro y Jimeno, 2001).

Los probióticos usados en bovinos reducen o eliminan los patógenos en el tracto gastrointestinal, así como residuos de antibióticos y otras sustancias análogas en productos finales, mejorando el índice de conversión y reduciendo la incidencia de diarreas (Matin & Nisbet, 2005).

Los microorganismos utilizados como probióticos en rumiantes provienen de otras regiones geográficas, tienen un alto costo y son de dudosa calidad e incluso de otras especies animales, sin contar con especies nativas autóctonas. Por lo anterior, es necesario el aislamiento y caracterización molecular de microorganismos con potencial probiótico de heces de terneros de levante de ganado cebú en el Departamento de Sucre, Colombia, con la finalidad de seleccionar las mejores cepas para su posterior aplicación como aditivos microbianos en la alimentación bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del estudio

Este estudio se realizó en el Departamento de Sucre, Colombia, en dos fincas perteneciente la subregión Montes de María (Municipio de Ovejas), en donde se seleccionaron terneros de levante con edades de entre 1 y 2 años, machos y hembras, de raza Cebú.

Aislamiento de los microorganismos

A partir de un pool de heces de al menos tres terneros sanos por finca, alimentados sin concentrado y sin ser

tratadas con antibióticos por lo menos tres meses antes, se aislaron en el laboratorio de Biotecnología GRUBIO-DEQ de la Universidad de Córdoba, bacterias del género *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., y levaduras del género *Candida*, utilizando medios selectivos, Agar de Man Rugosa Sharpe (MRS) (*Lactobacillus* spp.), Nutritivo modificado con CMC y Almidón al 0.1% (*Bacillus* spp.) y Agar Sabouraud Dextrose (SDA) para Levaduras; para su crecimiento e identificación (Rondón et al., 2008).

En cada cepa aislada se realizaron pruebas preliminares: Tinción de Gram, tinción de endosporas (método de Wirtz), prueba de la catalasa, prueba de oxidasa.

Evaluación de las características probióticas “in vitro”

Las cepas preseleccionadas se sembraron en tubos de cultivo con 10 mL de caldo MRS, nutritivo modificado o SDA según su aislamiento. Posteriormente se incubaron por 24 h a 37 °C. A partir de estos cultivos con 1 mL de cada cultivo se realizaron diluciones seriadas; de la dilución 10⁵ y 10⁶ se tomó 0,1ml y se sembró en los medios MRS para conteo de células viables. Conocida la concentración de los inóculos de cada microorganismo, se le realizó a cada cepa las pruebas probióticas.

Tolerancia a cambios de pH

La sobrevivencia y resistencia a pH 3, 4, 5.6 y 7 (ajustado con HCl 5%), el porcentaje de resistencia a pH fue calculado por la siguiente ecuación (Kociubinski et al., 1999):

$$\%RpH = \frac{\left(\frac{UFC}{mL}\right)MRS\ pHx100}{\left(\frac{UFC}{mL}\right)MRS(inoculo)}$$

La tolerancia a la acidez se estimó al comparar el conteo de bacterias viables en agar MRS para la h0 y las células sobrevivientes después de la incubación a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 24 horas pH ácido por 3 h.

Tolerancia a sales biliares

El ensayo se realizó a diferentes concentraciones de sales 0.05, 0.1, 0.15 y 0.3 % (p/v) ajustado el pH =7 con HCl 5 %, e incubación a 37 °C durante 24 horas; al cabo de este tiempo la sobrevivencia y resistencia a sales biliares se comprobó mediante la determinación del número de células viables (Avila et al., 2010).

Tolerancia a cambios de temperatura

Las diferentes cepas fueron sometidas a una temperatura de 40 °C, durante 24 horas; la sobrevivencia y resistencia a esta temperatura se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) (Rubio et al., 2008).

Tolerancia a altas concentraciones de Cloruro de sodio (NaCl)

La prueba se realizó utilizando los caldos MRS, Malta, Nutritivo y diferentes concentraciones de NaCl: 2, 4, 6, 8 y 10 % (p/v), con incubación a 37 °C durante 24 horas; finalizado el tiempo se determinó el crecimiento a altas concentraciones de NaCl mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 600 nm a 0 y 24 horas (Rondón et al., 2008).

Fermentación de la glucosa

Se utilizaron los caldos MRS, Malta, Nutritivo, que contenían 0.2 % (v/v) de una solución de purpura de bromocresol (0.5 %) y campanas de Durham; luego de la inoculación las muestras se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Se consideraron positivos los tubos con burbujas de gas en los viales (Rondón et al., 2008).

Prueba de antagonismo

Esta prueba se realizó contra *Salmonella* spp., y *E. coli* pertenecientes al banco de cepas del laboratorio GRUBIO-DEQ, las cuales se sembraron en forma masiva en agar Mueller Hinton; en la superficie de éstos se colocaron discos impregnados con los microorganismos de ensayo; se introdujeron en la nevera durante 30 minutos (T = 15 °C) y después se incubaron a 37 °C durante 48 horas. La acción antagónica se evidenció por la presencia de halos de inhibición y crecimiento alrededor de los discos (Mejía et al., 2007).

Capacidad de crecimiento

Las cepas que resistieron la presencia de sales biliares y acidez se cultivaron en 30 mL de caldo MRS, Nutritivo modificado, SDA y se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 horas; el crecimiento se comprobó mediante la determinación del número de células viables (UFC) y se determinó su porcentaje (Laurencio et al., 2002).

Identificación molecular y análisis filogenético

Para la identificación molecular se utilizó una de las cepas que superó las pruebas probióticas, de la siguiente forma:

Extracción del DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico del microorganismo con características probióticas se utilizó el kit comercial QIA amp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Corporation). Siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación por PCR para la detección del DNA genómico

Se realizó la amplificación por PCR de la región genética de 1465 pb que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal de procariontes. Utilizando los cebadores (Primers) 27F, 518F, 800R, y 1492R para la identifica-

ción molecular de la cepa aislada con características probióticas, la cual fue caracterizada previamente.

Electroforesis

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, previa tinción con GelStar™ Nuclein Acid Gel Stain 10,000X, según las especificaciones del fabricante. El gel se corrió utilizando el buffer Tris- Acido Borico- EDTA (TAE) al 0.5X durante 50 minutos, a 80 voltios, y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Los productos se analizaron en base al tamaño del segmento y se compararon con los segmentos obtenidos de los controles positivos de cada cepa.

Purificación del fragmento de PCR amplificado

Para la purificación se utilizó MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN), según indicaciones del fabricante.

Secuenciación del DNA

Los productos de PCR una vez purificados se enviaron a la empresa (Macrogen) para su secuenciación.

Análisis bioinformático

El análisis taxonómico de la secuencia problema se realizó mediante la comparación contra las bases de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI), Greengenes (*Laurence Berkeley National Laboratory*) y Ribosomal Database Project (RDP). El alineamiento y generación de un árbol de distancias se hizo utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema.

Diseño y análisis estadístico

Los ensayos se distribuyeron en un diseño completamente al azar (DCA) y los resultados, obtenidos por triplicado, se sistematizaron y analizaron en el software Statgraphics Centurion XVI. Se comprobó la homogeneidad de varianza por el método de Bartlett y el test de normalidad de Shapiro-Wilk, luego se realizó análisis de varianza (ANOVA) dentro de cada concentración y para cada cepa aislada, con el fin de comparar los tratamientos. De igual forma se evaluó la diferencia de los valores de las medias de los grupos en términos de varianza intragrupal utilizando el método de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey a un 95 % de confianza, además de métodos gráficos de representación de resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron y caracterizaron morfológicamente 10 colonias nativas presentes en muestras de heces de terneros de levante de la raza cebú, correspondientes a cuatro cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) (agar MRS), tres bacilos Gram positivos (agar nutritivo) y tres levaduras (Sabouraud Dextrose agar), determinadas a través de las distintas pruebas preliminares. Posteriormente se realizaron todas las pruebas probióticas para cada una de las cepas, como se describe a continuación:

Tolerancia a cambios de pH

Los análisis para las cepas BAL muestran los siguientes resultados (tabla 1). La cepa M1 4b, aislada en agar MRS, presentó un crecimiento superior para los valores de pH 4, mientras que la cepa M2 4a lo estuvo para un

Tabla 1. Población viable de bacterias y levaduras en medios con cuatro niveles de pH.

CEPAS	pH 3,0	pH 4,0	pH 5,6	pH 7,0
Bacterias ácido lácticas (UFC/mL)				
M2 4a	0	0 _b	6.01e8 _a	8.95e8 _a
ML 10 ⁵ e	1.56e6	1.62e6 _b	3.07e8 _a	3.07e8 _{ab}
M1 4 b	0	4.75e7 _a	3.32667e8 _a	2.21e8 _{ab}
ML 10 ⁵ c	121e6	1.27667e6 _b	1.36e8 _a	1.92667e8 _b
Bacterias celulíticas (UFC/mL)				
M1 10 ⁴	666667 _b	1.3e7 _a	2.11667e8 _a	2.09e8 _a
M1 10 ⁵	6.66667e6 _b	1.6e7 _a	2.7e7 _a	6.9e7 _a
M2 10 ⁵	1.41e8 _a	3.87e7 _a	2.32333e8 _a	5.e8 _a
Levaduras (UFC/mL)				
M1 10 ²	1.e6 _b	5.e7 _a	7.e6 _a	0 _b
M1 10 ³	160000 _b	246667 _b	4.56667e7 _a	500000 _b
M2 4b	880000 _b	1.44e6 _b	7.e7 _a	7.1e7 _a

Nota: No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letras. M: muestras y alfanumérico: código.

Tabla 2. Población viable de bacterias y levaduras en medios con cuatro concentraciones de sales biliares.

Cepas	0.05 %	0.1 %	0.15 %	0.3 %
Bacterias ácido lácticas (UFC/mL)				
M2 4a	9.773e6 _a	0 _b	0 _b	0 _b
ML 10 ⁵ e	1.1167e8 _a	2.67e7 _{ab}	2.67e7 _{ab}	1.323e8 _{ab}
M1 4b	1.32e8 _a	8.9e7 _a	8.9e7 _a	3.9e7 _{ab}
ML 10⁵ c	1.467e8_a	3.8e7_{ab}	3.8e7_{ab}	1.88e8_a
Bacterias celulíticas (UFC/mL)				
M1 10 ⁴	1.26667e8 _a	2.473e8 _a	2.78e6 _b	9.367e7 _a
M1 10 ⁵	2.10667e8 _a	2.467e8 _a	1.61e8 _a	1.067e8 _a
M2 10⁵	5.19333e8_a	5.467e8_a	8.367e7_{ab}	2.98e8_a
Levaduras (UFC/mL)				
M1 10 ²	2.267e7 _a	2767 _b	6767 _b	4.567e7 _{ab}
M1 10 ³	2.3e7 _a	6666.67 _b	286667 _b	0 _b
M2 4b	1.273e8_a	1.3267e8_a	1.4167e8_a	1.3e8_a

Nota: No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letras. **M:** muestras y alfanumérico: código.

pH de 7; las demás cepas se comportan similar al pH 5,6. Esto sugiere que el máximo crecimiento de estas cepas se encuentra enmarcado en estos niveles de pH. Algunos microorganismos ácido lácticos evaluados no soportaron pH 3.0 lo que implica que no son lo suficientemente aptos para colonizar el intestino ya que primero deben superar el ambiente ácido del estómago. Delgado (2005) reportó datos similares a lo mostrado en esta investigación donde algunos aislados evaluados no crecieron a pH 3. En cuanto a las bacterias celulíticas no hubo diferencias significativas en cuanto a los diferentes niveles de pH, sólo la cepa M2 10⁵ presentó diferencia frente a las demás cepas. Respecto a las levaduras la cepa M2 4b presentó un mejor comportamiento frente a las variaciones de pH siendo superior en valores de pH 4 y 7; lo cual indica la supervivencia en condiciones extremas de pH.

Tolerancia a sales biliares

De las cepas seleccionadas como microorganismos con potencial pro biótico respecto a las BAL sólo la M2 4a no presentó tolerancia ante altas concentraciones, las otras cepas tuvieron igual comportamiento. En cuanto a bacterias celulíticas la cepa M2 10⁵ tuvo mayor resistencia ante las diferentes concentraciones de sales biliares y para las levaduras la cepa M2 4b mostró igual resistencia para las diferentes concentraciones analizadas (tabla 2).

Todas las cepas evaluadas fueron capaces de resistir y crecer en presencia de las sales biliares. Para que una cepa probiótica produzca una buena actividad metabólica es

necesario que sea capaz de colonizar el intestino delgado, por lo que la tolerancia a bilis es un criterio esencial para la selección de bacterias lácticas (Maré *et al.*, 2006).

Tolerancia a cambios de temperatura (Crecimiento a 40 °C)

Todas las cepas presentaron crecimiento a temperatura de 40 °C, siendo las cepas M2 10⁵ y M110⁴ las que mostraron los mayores valores en población, el resto también creció, pero con valores menores.

En su mayoría las cepas presentaron crecimiento a 40 °C, siendo las cepas M2 10⁵ y M110⁴ las que mejor concentración tuvieron a esta temperatura (tabla 3).

Estos resultados eran de esperarse, ya que estos microorganismos fueron aislados del rumen donde normalmente la temperatura es de 40 °C debido a la enorme cantidad de procesos metabólicos que se producen, la temperatura aquí suele ser 1 o 2 grados por encima de la temperatura corporal del animal (38 a 42 °C) (Van y Regueiro, 2008).

Tolerancia a las altas concentraciones de Cloruro de Sodio

En la tabla 4 se presentan los resultados de los microorganismos seleccionados enfrentados a concentraciones altas de cloruro de sodio. Se observó un efecto significativo en el crecimiento de los diferentes microorganismos a las concentraciones de 2 y 4% de NaCl, sin embargo, a la concentración de 8 y 10% hubo una disminución (tabla 4). Las cepas que mostraron mayor resistencia a

Tabla 3. Promedio de crecimiento a 40 °C en UFC/mL*10⁶.

Cepa	Promedio	Desviación estándar
ML 10 ⁵ e	6.93* 10 ⁷	9.02* 10 ⁶
M1 10 ⁴	1.60* 10 ⁸	5.29* 10 ⁷
M2 10 ⁵	2.17* 10 ⁸	1.26* 10 ⁸
M1 10 ⁵ a	5.00* 10 ⁷	1.00* 10 ⁷
M2 4b	3.13* 10 ⁷	2.58* 10 ⁷

Tabla 4. Evaluación del crecimiento de bacterias y levaduras en medios con cinco porcentajes de NaCl (Absorbancia a 600 nm). Densidad óptica (DO).

Cepas	2%	4%	6%	8%	10%
Bacterias ácido lácticas (UFC/mL)					
M2 4a	0.85 _a	0.631 _a	0.398 _{ab}	0.306 _a	0.299 _{ab}
ML 10 ⁵ e	1.934 _a	0.744 _a	0.405 _a	0.38 _a	0.35 _a
M1 4b	0.875 _a	0.337 _b	0.285 _b	0.28 _{ab}	0.24 _b
ML 10 ⁵ c	0.843 _a	0.705 _a	0.469 _a	0.404 _a	0.36 _a
Bacterias celulíticas (UFC/mL)					
M1 10 ⁴	0.741 _a	0.58 _{ab}	0.367 _a	0.287 _a	0.279 _a
M1 10 ⁵	0.642 _a	0.338 _b	0.288 _b	0.287 _a	0.286 _a
M2 10 ⁵	0.727 _a	0.651 _a	0.39 _a	0.291 _a	0.288 _a
Levaduras (UFC/mL)					
M1 10 ²	0.339 _a	0.336 _b	0.294 _a	0.293 _a	0.276 _a
M1 10 ³	1.023 _a	0.345 _b	0.334 _a	0.349 _a	0.308 _a
M2 4b	1.221 _a	0.928 _a	0.271 _b	0.208 _b	0.203 _b

Nota: No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de letras. M: muestras y alfanumérico: código.

altas concentraciones de sal fueron los aislados de bacterias BAL seguido por la bacteria celulítica y la levadura.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba, los microorganismos seleccionados en este estudio tienen capacidad para adaptarse fácilmente a condiciones de salinidad relativamente altas. Esta estrategia es fundamental para que los microorganismos soporten un estrés osmótico debido a la presencia de una alta concentración de sal, como ejemplo, la mayoría de las levaduras, independientemente de su hábitat normal, son capaces de crecer en las concentraciones de NaCl que se encuentran en el agua de mar (Van Uden, 1968).

Prueba de Antagonismo

La prueba de antagonismo frente a patógenos, Los microorganismos aislados presentaron poca actividad anta-

gónica frente a *E. coli* y *Salmonella*, con excepción de M1 10⁵ y ML 10⁵e (tabla 5).

La capacidad antagonica frente a enterobacterias es uno de los criterios para la selección de cepas probióticas en nutrición animal (Pérez, 2008). Lara y burgos (2012) reportaron que *Lactobacillus* spp., produjo halos de inhibición de 1 mm frente a *Salmonella* spp., y *E. coli*, lo cual puede deberse a la producción de sustancias inhibitorias como bacteriocinas y ácido láctico (Domitille et al., 2005).

IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO

Identificación molecular y análisis filogenético

Debido a que la cepa M1 10⁵ fue uno de los microorganismos que superó las pruebas probióticas, se utilizó éste para realizarle análisis molecular. Se determinó mediante

Tabla 5. Medias para halos de inhibición (mm) por cepas ácido lácticas, nutritivo y levaduras frente a *Salmonella* spp., y *E. coli*.

Cepas	Antagonismo (<i>Salmonella</i> spp.) Halos (mm)	Antagonismo (<i>E. coli</i>) Halos (mm)
M1 10 ²	0	0
M1 10³	6.66	0
M1 10 ⁴	0	0
M1 10⁵	7.42	7.03
ML 10 ^{5c}	0	0
ML 10^{5e}	7.5	7.22
M1 4 b	0	0
M2 4a	0	0
M2 4b	0	7.40
M2 10 ⁵	0	0

la herramienta *Ribosomal Database Project* (RDP), que se trata de una secuencia de un microorganismo perteneciente al género *Bacillus* con un 100 % de confiabilidad.

La base de datos de secuencias 16S RDP, usando el algoritmo Seqmatch RDP contra aislamientos cultivados, indica que la secuencia problema ensamblada es muy similar en la mayoría de su longitud con las cepas tipo identificadas como *B. toyonensis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, o *Bacillus* spp., la búsqueda en la base de datos Greengenes indica que la secuencia estudiada es muy similar a secuencias de *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *Bacillus* spp., los resultados del análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada de 1202 pb contra la base de datos refseq del NCBI indican que tiene un 100 % de identidad en el 99 % de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16s pertenecientes a *B. toyonensis* (figura 1).

En la figura anterior se observa la relación entre la cepa M1 10⁵ (código en el árbol: 18-1 (reversed)) y *B. toyonensis*, *B. thuringiensis*, y *B. cereus*. En la base de cada clado se muestra el soporte de rama (bootstrap), expresado como el porcentaje de veces en que el análisis produjo la misma asociación entre las secuencias. Este árbol fue construido a partir de las 40 secuencias tipo de microorganismos cultivables más cercanas (Neighbor joining y Bootstrap 100), disponibles en la base de datos de Refseq NCBI, muestra que la secuencia problema se agrupa con las especies *B. toyonensis*, *B. thuringiensis*, y *B. cereus*. De acuerdo con los resultados de búsquedas en las distintas bases de datos, el aislamiento M1 10⁵ pertenece al grupo de *B. cereus* este es un grupo de

bacterias Gram-positivos, formadores de esporas, el cual constituye una rama independiente homogénea dentro de *B. genus*, compuesto entre otras especies por *B. thuringiensis*, *B. anthracis* y *B. toyonensis* (Sacchi *et al.*, 2002; Jiménez *et al.*, 2013). Estas especies tienen alto grado de similitud a nivel del gen ribosomal 16S, por lo tanto, para poder discriminar entre ellas, es necesario usar regiones específicas de otros genes menos conservados.

Entre las diferentes cepas probióticas formadoras de esporas, *B. cereus* var. *Toyoi* (cepa BCT-7112^T) ha estado en uso desde 1975 cuando fue aprobada oficialmente por el Ministerio Japonés de Agricultura y Silvicultura como la preparación comercial TOYOCERIN®. Las esporas de BCT-7112^T se han utilizado en la nutrición animal para porcinos, aves, ganado, conejos y acuicultura durante más de treinta años en una amplia gama de países alrededor del mundo. En la Comunidad Europea, TOYOCERIN® fue autorizado por primera vez por la Comisión Europea en 1994 para su utilización en la especie porcina, siendo el primer microorganismo autorizado por la Unión Europea para ser utilizado como aditivo en la alimentación, y posteriormente se autorizó también para su uso en aves de corral, ganado y conejos (Jiménez *et al.*, 2013).

Los estudios de identificación inicial asignaron esta cepa dentro de la especie *B. cereus* (Kozasa *et al.*, 1977). Sin embargo, dado a que una serie de caracteres fenotípicos pueden diferenciar BCT-7112^T del fenotipo principal de la especie, se consideró que era una variante y se denominó *B. cereus* var. *Toyoi* (Kozasa *et al.*, 1977). Du-

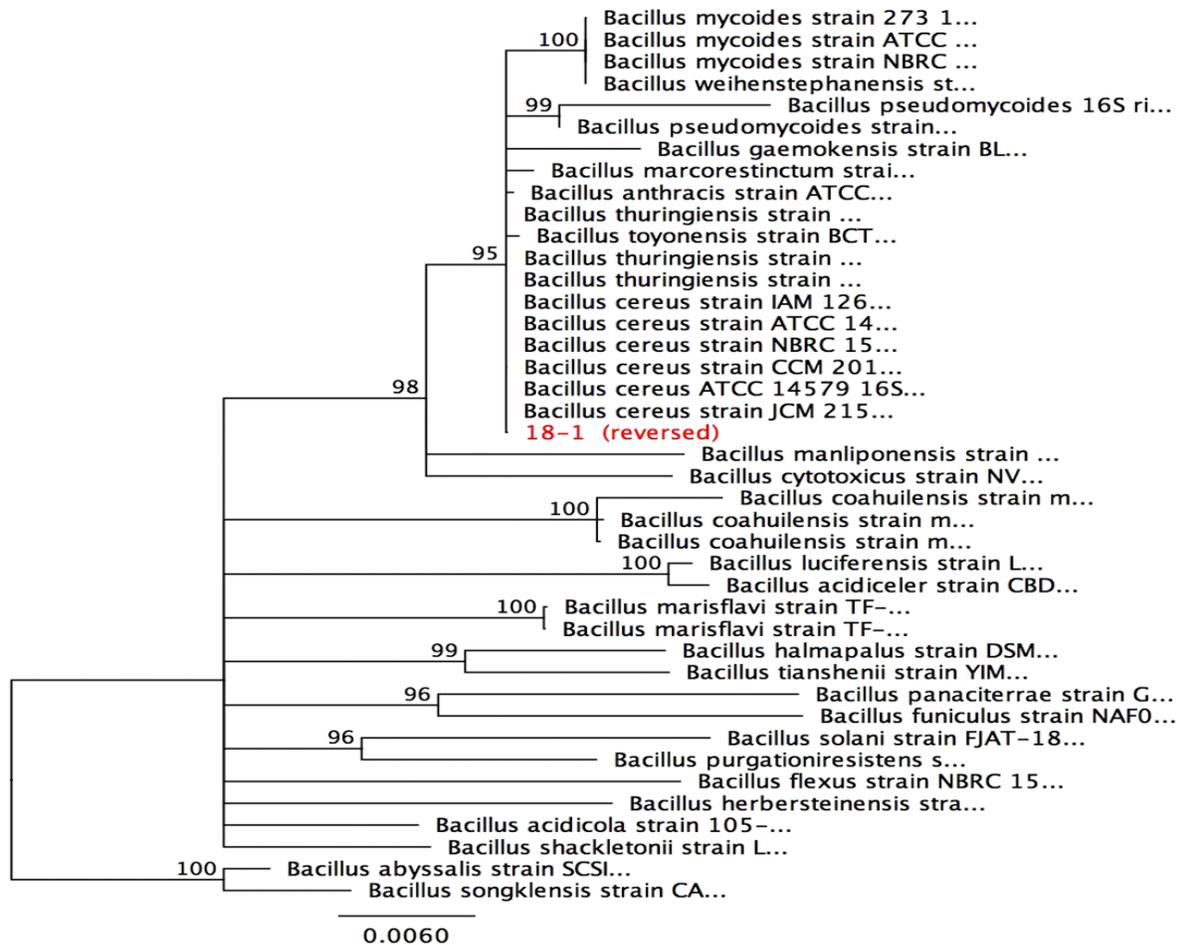


Figura 1. Árbol filogenético de la cepa M1 10⁵.

rante muchos años esta cepa ha sido objeto de numerosos estudios para demostrar su naturaleza no toxigénica en la producción industrial (Trapecar *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2009), así como estudios de identificación molecular para diferenciar BCT-7112^T de cepas de intoxicación alimentaria (Klein, 2011; Mietke *et al.*, 2010; Pecoraro y Bucher, 2002).

Sin embargo, esta cepa es resistente a cloranfenicol y tetraciclina (genes *tetM* y *catQ*), un rasgo que generalmente se considera desaconsejable para su introducción en la cadena alimentaria si se asocia con elementos genéticos móviles (MGEs). Por lo tanto, Glenwright *et al.* (2017), realizaron una investigación para identificar los genes responsables de estos fenotipos de resistencia y establecer si eran intrínsecos o adquisiciones recientes asociados con la transferencia horizontal de genes. En conclusión, esta investigación mostró claramente que los genes *tetM* y *catQ* de *B. toyonensis* BCT-7112^T son intrínsecos no sólo a esta especie, sino también al grupo *B. cereus* (*sensu lato*). La naturaleza intrínseca probada y

no transferibilidad de estos genes de resistencia a antibióticos en *B. toyonensis* BCT-7112^T corroboran recomendar el uso seguro de esta cepa como aditivo en la alimentación animal.

Una investigación realizada por Jiménez y colaboradores (2013) demostró que a pesar de que la cepa BCT-7112^T fue, inicialmente, clasificada como *B. cereus*, mostró diferencias genómicas significativas de las cepas tipo del grupo *B. cereus* que fueron lo suficientemente grandes (valores ANI por debajo del 92 %) y permitieron considerarla como una especie diferente dentro este grupo. El estudio taxonómico polifásico proporcionó suficientes parámetros discriminatorios para clasificar BCT-7112^T como una nueva especie dentro del género *Bacillus* para la cual el nombre *B. toyonensis* spp., nov. fue propuesto, con la designación de cepa tipo BCT-7112^T (= CECT 876^T; = NCIMB 14858^T), (Oren y Garrity, 2014).

Recientemente Janssens y colaboradores (2017) publicaron una investigación donde presentaron el proyecto del

genoma de otra cepa de *B. toyonensis* (*B. toyonensis* VU-DES13), la cual fue aislada del intestino medio del cólembolo que vive en el suelo *Folsomia candida*. Comparando VU-DES13 con BCT-7112^T (cepa tipo), ésta exhibió "hits" para tres grupos de genes biosintéticos adicionales por antiSMASH, así como 13 -lactamasas adicionales. Y además no observaron genes de virulencia relacionados con otros miembros del clado de *B. cereus* (*B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*).

Esta investigación representa el primer reporte molecular de *B. toyonensis* en estiércol de terneros de levante cebú en el Departamento de Sucre, el cual ha sido ampliamente utilizado como probiótico en la nutrición animal. Los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* realizadas demostraron que esta cepa posee características para ser utilizada potencialmente como probiótico.

CONCLUSIONES

Esta investigación representó el primer reporte molecular de *Bacillus toyonensis* en estiércol de terneros de levante cebú en el departamento de Sucre, los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* realizadas demostraron que esta cepa posee características para ser utilizada potencialmente como probiótico. Con esta investigación se pretende crear el primer banco de cepas probióticas nativas, aisladas de ganado cebú en el departamento de Sucre que serán usadas para futuros estudios y para la elaboración de biopreparados con acción probiótica como alternativa a la utilización de antibióticos en la nutrición animal.

AGRADECIMIENTOS

Gobernación de Sucre, por su apoyo financiero y operativo durante este proceso. COLCIENCIAS, por su programa de becas que contribuye a cumplir los sueños de muchos colombianos. GRUBIODEQ, Universidad de Córdoba.

BIBLIOGRAFÍA

Avila, J., Avila, M., Tovar, B., Brizuela, M., Perazzo, y Hernández, H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica Universidad de Zulia-Venezuela*, 20(2), 161-169.

Blanch, A. R., Méndez, J., Castel, S., and Reina, M. (2014). Comparison of procedures for the extraction of supernatants and cytotoxicity tests in Vero cells, applied to assess the toxigenic potential of *Bacillus* spp. and *Lactobacillus* spp., intended for use as pro-

biotic strains. *J. Microbiol. Methods*, 103, 64–69. doi: 10.1016/j.mimet.2014.05.019.

Castro-Madrugal, T. & Jimeno-Vinatea, V. (2001). Probióticos en la alimentación del ganado vacuno lechero. *Bovis*. No. 98, Madrid, España. 27-32

Corzo, G., Gilliland, S.E. (1999). Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82, 472-480.

Delgado, S., Flórez, AB., Y Mayo, B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr Microbiol.*, 50(4), 202-7.

Domitille, F., Ce'dric, N., Berger, M., Coconnier, V., Moal, L., Servin, A. (2005). pH Lactic Acid, and Non-Lactic Acid- Dependent Activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella* enteric serovar typhimurium. *Appl Env Microbiol.*, 71(10), 6008-6013.

Glenwright, H., Pohl, S., Navarro, F., Miro, E., Jiménez, G., Blanch, AR., and Harwood, CR. (2017). The Identification of Intrinsic Chloramphenicol and Tetracycline Resistance Genes in Members of the *Bacillus cereus* Group (sensu lato). *Front. Microbiol.*, 7: 2122. doi: 10.3389/fmicb.2016.02122.

Gutiérrez Ramírez, L. A., Montoya, O. I., Vélez Zea, J. M. (2013). Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. Recuperado el 2016, de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5012125.pdf>.

Janssens, TKS, de Boer, TE, Agamennone, V, Zaagman, N, van Straalen, NM, & Roelofs, D. (2017). Draft genome sequence of *Bacillus toyonensis* VU-DES13, isolated from *Folsomia candida* (Collembola: Entomobryidae). *Genome Announc.*, 5:e00287-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00287-17>.

Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., ... & Codoñer, F. M. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 383-391.

Klein, G. (2011). Molecular characterization of the probiotic strain *Bacillus cereus* var *toyoi* NCIMB 40112 and differentiation from food poisoning strains. *J. Food Prot.*, 74, 1189–1193.

Kociubinski, G., Pérez, P., De Antoni, G. (1999). Screening of bile resistance and bile of precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*, 62, 905- 912.

Kozasa, M., Wake, M., Azuma, R. (1977). Taxonomic studies on *Bacillus cereus* T-7112–Biotype. *J. Tokyo Vet. Zootechnol. Sci.*, 25, 38.

- Lara Mantilla, C., & Burgos Portacio, Á. (2012). Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 31-40.
- Laurencio, M., Pérez, M., Piad, R., Milián, G., Rondón, A. J., Amigo, S., Bocourt, R., Savón, L. & Díaz, m. (2002). Determinación del contenido de bacterias ácido lácticas y *Bacillus* del tracto gastrointestinal de pollos de ceba y obtención de una mezcla de Exclusión Competitiva. *Rev. Cubana Ciencia Avícola.*, 26, 17-22.
- Lombana, J.; Martínez, D.; Valvede, M.; Rubio, J., Castriellón, J y Marino, W. (2012). Caracterización del sector ganadero del Caribe colombiano. Universidad del Norte. Barranquilla: Editorial Universidad del Norte, 62 p.
- Lund, A. Yeasts and Moulds in the Bovine Rumen. (1974). *Journal of General Microbiology*, 81,453-462.
- Marè, L, Wolfaardt, GM, & Dicks, LM. (2006). Adhesion of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus salivarius* to the intestinal tract of piglets, as recorded with fluorescent *in situ* hybridization and production of plantaricin by cells colonized to the ileum. *J Applied Microbiol.*, 100(4), 838-845.
- Martin, S. A. & Nisbet, D J. (2005). Effect of diet- fed microbials on rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1736-44.
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), 281-295.
- Mejia, J., Chacon, Z., Guerrero, B., Otoniel, J & Lopez, G. (2007). Obtención de cepas de *Lactobacillus*: caracterización *in vitro* como potenciales probióticas. *Revista científica*, 17(2), 178-185.
- Mietke, H., Beer, W., Schleif, J., Schabert, G., & Reissbrodt, R. (2010). Differentiation between probiotic and wild type *Bacillus cereus* isolates by antibiotic susceptibility test and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). *International Journal of Food Microbiology*, 140(1), 57-60.
- Oren, A., & Garrity, GM. (2014). Lista de validación N° 155, Lista de nuevos nombres y nuevas combinaciones previamente con eficacia, pero no de forma válida, publicada. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 1-5. 10.1099 / ijs.0.060285-0.
- Pecoraro, S., Bucher, E. (2002). Rapid identification of closely related probiotic *Bacillus cereus* strains and differentiation from wild type bacilli. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 53, 49-72.
- Pedroso, M, Lavielle, J, Soler, DM, & Sánchez, L. (2012). Beta 1-3 glucano particulado lineal y otras formulaciones basadas en Beta glucano, su efecto en bovinos y aves. *Rev Salud Anim.*, 34(2):70-77.
- Pérez, H. (2008). Criterios de selección y mecanismos de acción de cepas de levadura para uso como aditivo probiótico en animales. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 42(1-3), 38-45.
- Rangel - Ch., J. O. (2015). La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(51), 176.
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M. J., Laurencio, 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. *Rev. Somenta (México)*. 6(1), 56-63.
- Rubio, M, A., Hernández, E, M., Aguirre, R, A., & Poutou, P.R. (2008). Identificación preliminar *in vitro* de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*, 13 (1), 1157-1169.
- Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., & Popovic, T. (2002). Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for Identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (10), 1117-1123. <http://doi.org/10.3201/eid0810.020391>.
- Salminen, S., Ouwehand, A.C., Isolauri, E. Clinical applications of probiotic bacteria. (1998). *International Dairy Journal, Amsterdam*, 8, (5-6), 563-572.
- Trapecar, M., Leouffre, T., Faure, M., Jensen, H.E., Granum, P.E., Cencic, A., & Hardy, S.P. (2011). The use of a porcine intestinal cell model system for evaluating the food safety risk of *Bacillus cereus* probiotics and the implications for assessing enterotoxigenicity. *APMIS*, 119, 877-884.
- Van Lier, E. y Regueiro, M. (2008). Curso de Anatomía y Fisiología Animal, Digestión en Retículo-Rumen. Facultad de Agronomía, Universidad de la Republica, Montevideo-Uruguay. 30p.
- Van Uden, N. (1968). Marine Yeasts. *Advances in Microbiology of the Sea*. pp. 168-201. Ed. M.R. Droop and E.S. Ferguson Wood. Vol. 1. Academic Press London and New York
- Williams, L.D., Burdock, G.A., Jiménez, G., Castillo, M. (2009). Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var toyoi preparation. *Regul. Toxicol. Pharm.*, 55, 236-246.
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86 (14_suppl), E140-E148.
- Zurita, L., P. Smith, C. Nuñez. (1990). *Escherichia coli* enteroadhesiva (K99) y rotavirus en terneros con síndrome diarreico. Signología y serotipificación antigénica de cepas de *E. coli*. *Av. Cs. Vet.*, 5 (2), 124-128.