

Evaluación de la Actividad Bactericida de Bacterias Ácido Lácticas Aisladas en Calostro de Cerdas Frente a *Salmonella typhimurium*

Bactericidal Evaluation of Lactic Acid Bacteria Isolated in Sow Colostrum Against *Salmonella typhimurium*

Juliana María Vélez Zea¹; Luz Adriana Gutiérrez Ramírez² y Olga Inés Montoya Campuzano³

Resumen. En los sistemas de crianza intensiva especialmente en cerdos, la resistencia antimicrobiana de algunas bacterias patógenas, se ha convertido en un problema mundial, tanto para los productores como para los consumidores. El uso de microorganismos probióticos aislados de calostro de cerda criadas en sistemas intensivos han demostrado eficacia en la inhibición del crecimiento de algunos patógenos entéricos. Se eligieron dos cepas denominadas como BAL1 y BAL3, a las cuales se les evaluó el potencial bactericida de los extractos bacterianos sobre el patógeno *Salmonella typhimurium*, por el método de difusión en pozos en agar Mueller Hinton. Los extractos se obtuvieron ajustando el inóculo a 0,5 McF en caldo MRS, centrifugados a 6.000 rpm por 5 minutos y filtrados con membrana de 0,2 µm. Ambos extractos mostraron tener un alto potencial bactericida frente a esta bacteria, con promedios de halo de inhibición de 11 mm in vitro.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, calostro de cerdas, salud animal, ácidos orgánicos.

Abstract. In intensive farming systems especially in pigs, the antimicrobial resistance of some pathogenic bacteria has become a global problem, both for producers and consumers. The use of probiotic microorganisms isolated of sow colostrum in intensive farms have demonstrated the ability to inhibit the growth of some enteric pathogens. Two of these strains named as BAL1 and BAL3 were chosen for evaluate the bactericidal potential of their extracts against the pathogen *Salmonella typhimurium*. The well diffusion method, in Mueller Hinton agar was used. The BAL extracts were obtained, adjusted the BAL inoculum in MRS broth at 0.5 McFarland, centrifuged at 6,000 rpm for 5 minutes and filtered with a 0.2 µm membrane. Both extracts demonstrated to have bactericidal activity against this bacterium with mean inhibition halos of 11 mm in vitro.

Key words: Antimicrobial activity, , sow colostrum, animal health, organic acids.

En un animal sano, cada porción del intestino es colonizada por una microbiota típica, la cual se adapta y se desarrolla en una simbiosis benéfica con el hospedero (Hong *et al.*, 2011). Sin embargo, la posibilidad de adquirir esa microbiota nativa, se puede disminuir drásticamente en las crianzas artificiales, cuando las crías son separadas de sus madres y albergadas en los sistemas de crianza intensivos. Estos sistemas están diseñados para obtener el máximo rendimiento de los animales a través del mínimo espacio y coste económico, los cerdos son sometidos a situaciones como el destete precoz, sobrepoblación en corrales, ausencia de ventilación y luz natural, privación de apareamiento, maternidad y crianza natural, adicionalmente, a estos factores, el animal a temprana edad es colonizado por microorganismos patógenos, dándose una disminución del sistema inmune con la consecuente pérdida de peso y en algunos casos la muerte. Todos estos factores provocan en el animal un estrés que favorece la colonización

de los agentes patógenos sobre los benéficos y estos una vez instalados, generan un ambiente hostil para el organismo competente (Dinan y Cryan, 2012).

En las anteriores condiciones la proporción de microorganismos patógenos a nivel intestinal, puede aumentar tanto que desencadenan patologías complejas; no solo por el efecto del proceso invasivo, sino también, por la producción de endotoxinas y exotoxinas, tal es el caso de *Salmonella typhimurium*. Este microorganismo es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, puede hospedarse en el intestino humano o de los animales y se transmite por contaminación oro – fecal; sin embargo, su presencia causa salmonelosis, una enfermedad que se caracteriza por ser una infección gastrointestinal, asociada a enterocolitis; y en algunos casos graves, la infección puede extenderse del intestino al torrente sanguíneo y de allí a cualquier parte del cuerpo. Esta infección es observada con más

¹Ingeniera Biológica. Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín – Facultad de Ciencias. A.A 3840, Medellín, Colombia. <jmvelez@unal.edu.co>

² Profesora Asociada. Corporación Universitaria Lasallista – Sede Medellín – Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias. Carrera 51 118 sur 57, Caldas, Antioquia, Colombia. <lugutierrez@lasallistadocentes.edu.co>.

³ Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín – Facultad de Ciencias - Escuela de Biociencias. A.A 3840, Medellín, Colombia. <oimontoya@unal.edu.co>

frecuencia en cerdos entre el destete y los 4 meses de edad, generando graves diarreas y hasta su deceso (Wilcock y Schwartz, 1992).

Para tratar de mitigar esta y otras enfermedades producidas por patógenos, se han utilizado los Antibióticos Promotores de Crecimiento (APC), adicionados en el concentrado; estas prácticas, se hacen desde los años 60 y aún siguen vigentes. Sin embargo, su uso indiscriminado y continuado, ha generado cepas bacterianas multirresistentes a los antibióticos; lo que acarrea graves consecuencias, especialmente, porque quedan en el canal del animal residuos de cepas patógenas resistentes, que pueden pasar a través de la cadena alimentaria al hombre (Sekhon y Jairath, 2010).

Recientemente, en la producción animal, tanto la Comisión de la Unión Europea (EUA) como la Food and Drug Administration (FDA), han comenzado a limitar el uso de los APC, buscando opciones más naturales para la producción limpia y por supuesto con características funcionales. Una alternativa para el reemplazo de este aditivo son los probióticos (Salminen *et al.*, 1998).

Los probióticos son microorganismos que al consumirse en cantidades adecuadas generan beneficios importantes al consumidor como: ser inmunomoduladores, favorecer el establecimiento de la microbiota intestinal competente, actuar como antagonistas contra microorganismos patógenos compitiendo por los sitios de unión al epitelio y nutrientes, producir compuestos antibacterianos como ácidos orgánicos, etanol, diácetilo, peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y bacteriocinas. Todos esos compuestos disminuyen drásticamente el pH, incluso por debajo de 4 (Saavedra, 2001; Schrezenmeir y Vrese, 2001), e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y favorecen la salud intestinal, por lo tanto, son considerados como seguros.

Dentro de los microorganismos probióticos, la gran mayoría pertenecen al grupos de las bacterias ácido lácticas (BAL) siendo los géneros más relevantes: *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. y *Bifidobacterium* spp. (Palou y Serra, 2000), sin embargo, existen otros géneros bacterianos como *Enterococcus*, *Bacillus* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. Por la importancia que han ganado estos microorganismos en materia de consumo, en producción animal y el marcado

interés que se ha generado sobre su uso continuado, la investigación tuvo como objetivo determinar el efecto bactericida de dos extractos de bacterias ácido lácticas caracterizadas previamente por ensayos *in vitro* como probióticas contra *S. thypimurium in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento y obtención de los extractos de dos bacterias probióticas. Del calostro de la leche de cerdas, se obtuvieron dos bacterias ácido lácticas aisladas y caracterizadas previamente como probióticas, por ensayos *in vitro* según criterios recomendados por Monteagudo (2010); entre las pruebas realizadas se encuentra la evaluación de la resistencia al jugo gástrico y pancreático, pH y concentración de sales biliares. En adición a estas pruebas se hicieron los análisis de perfiles de resistencia recomendados por la Autoridad Europea de seguridad alimentaria (FAO, 2001). Las bacterias que mostraron resistencia y viabilidad a estas condiciones y presentaron tener sensibilidad a los antibióticos probados, fueron seleccionadas y denominadas como BAL1 y BAL3.

Las cepas fueron almacenadas previamente en crioviales y se activaron en 9 mL de caldo MRS (Man y Rogosa) incubándolas a 37 °C por 48 h en anaerobiosis. Pasado este tiempo, se comprobó el crecimiento de las cepas por turbiedad y se cultivaron en agar MRS, incubándolas bajo las mismas condiciones.

Preparación de los extractos bacterianos. Para la obtención de los extractos bacterianos, se ajustó el inóculo en agua destilada estéril a una concentración de 0,5 en la escala MacFarland; cada inóculo fue centrifugado a 6.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se filtró estérilmente a través de un filtro Millipore® de 0,2 µm y se almacenaron en tubos estériles a 4 °C (Settharaksa, 2008).

Ensayo del efecto inhibitorio de los extractos de BAL1 y BAL3 frente a *Salmonella typhimurium*.

La cepa de *S. enterica* subspp. *enterica* serovar *typhimurium* fue usada como una de las cepas indicadoras para revelar la actividad antibacteriana. Las cepas fueron almacenadas -80 °C en BHI (Brain-Heart Infusión Merck®) y suplementadas con 20% de glicerol. Antes del experimento la cepas se cultivaron en agar SS (*Salmonella* - Shigella) a 37 °C durante 24 h en anaerobiosis, tras lo cual se inocularon en caldo BHI, 24,37 °C) y fue ajustada a 0,5 en la escala de turbidez de McFarland.

La evaluación del potencial bactericida de las BAL, se realizó por el método de difusión en pozos con algunas modificaciones (Montville y Chen, 1999); se emplearon placas con medio de cultivo agar Mueller Hinton, donde se agregaron 100 µL de una suspensión de *S. typhimurium*.

La suspensión bacteriana se determinó, por medio de la técnica de agotamiento en superficie. Posteriormente, se hicieron 4 pozos en el medio de cultivo; dos para BAL1 y dos para BAL3. En cada pozo se depositaron 35 µL del extracto bacteriano correspondiente, tras lo cual las placas inoculadas fueron refrigeradas a 4 °C por tres horas para su difusión e incubadas a 37 °C por 48 horas. La actividad bactericida se detectó por la presencia de una zona clara de inhibición alrededor del pozo y se consideró la inhibición como positiva o significativa cuando el halo alrededor de los pozos (diámetro externo) fue mayor a 2 mm (Klaenhammer, 1993; Lis-Balchin *et al.*, 1998).

Prueba estadística. Se realizó un análisis de varianza (ANAVA) para evaluar las diferencias entre las medias de los halos de inhibición producidos por los respectivos extractos contra *S. typhimurium* (SAS V 9.0, Statistical Analysis System). Se hicieron 35 réplicas del experimento, en días diferentes y en

el cual cada medio de cultivo sirvió de bloque para la realización de dos repeticiones pareadas de los pozos con un nivel de significancia del 0,05, una para BAL1 y otra para BAL3. Los resultados se midieron en función del diámetro de los halos de inhibición.

Se desarrolló una prueba t de dos colas, con una consideración significativa si el diámetro total del pozo era mayor o igual a 7 mm (3 mm de diámetro de pozo más 4mm de diámetro externo del pozo).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto inhibitorio de BAL1 y BAL3 frente a *Salmonella typhimurium*. Se confirmó presencia de halos de inhibición representados por zonas claras sin crecimiento de colonias de *S. typhimurium* alrededor de los pozos que contenían el extracto de las cepas de BAL. Los halos de inhibición que se tuvieron en cuenta para la tabulación fueron los mayores a 7 mm. En la Tabla 1, se puede apreciar que para los extractos BAL1 y BAL3 los promedios de los halos de inhibición están por encima de los 7 mm, indicando que hubo inhibición del crecimiento de *S. typhimurium*. Al comparar los datos estadísticos obtenidos para los extractos, se encontró que BAL1 produce halos de inhibición ligeramente mayores a los obtenidos con BAL3 (Figura 1).

Tabla 1. Resultados estadísticos básicos en la determinación de los halos de inhibición de colonias de *Salmonella typhimurium* producidos por el extracto de las bacterias probióticas BAL1 y BAL3.

Medida estadística	BAL1	BAL3
n	35	35
Moda	11	10
Media	11,60	11,05
Coef. Variación	18,84	19,38
Desviación std	2,19	2,14
● halos mínimos, mm	9,20	8,78
● halos máximos, mm	15,60	14,80

En la Tabla 1, se puede apreciar que para los dos extractos los promedios de los halos de inhibición están por encima de los 7 mm mínimos, indicando que con ambos, hubo inhibición del crecimiento de *salmonella*

typhimurium; asimismo, al comparar los datos estadísticos obtenidos para los extractos, se encontró que BAL1 producía halos de inhibición ligeramente mayores que los obtenidos con BAL3 (Figura 1).



Figura 1. Halos de inhibición representados por zonas claras que indican nulo o crecimiento imperceptible de *Salmonella typhimurium*, producidos por los extractos de las bacterias probióticas BAL1 y BAL3.

Existe una inhibición significativa tanto de BAL1 como de BAL3 contra *S. typhimurium* (Tabla 2)

lo tanto, tienen el mismo efecto inhibitorio contra *S. typhimurium*.

Sin embargo, al comparar el efecto inhibitorio de ambos extractos, se obtuvo un valor p de 0.2872 indicando que no existe una diferencia significativa entre ambos y por

La importancia de estos resultados se debe a que a pesar de la existencia de numerosos estudios donde se ha comprobado la presencia de bacterias ácido lácticas

Tabla 2. Efecto inhibitorio de los extractos de las bacterias probióticas BAL1 y BAL3 contra *Salmonella typhimurium* según la prueba estadística t.

Extracto	Límites de Probabilidad (95%)		
BAL1	10,849	12,3508	a***
BAL3	10,318	11,7903	b***

Letras extracto probado a: BAL1, b: BAL3, *** P<0.0001.

con poder probiótico en la leche materna (Martín *et al.*, 2003; Abrahamsson *et al.*, 2009), son escasas las investigaciones del aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir del calostro; entre estas se encuentra la realizada por Martín *et al.*, 2006, en el cual se aislaron bacterias comensales, mutualistas y potencialmente probióticas del calostro materno. Respecto al aislamiento de bacterias probióticas del calostro de cerdas, solo se encuentra un reporte hecho por González *et al.*, 2011 en España, en el cual se identificaron y aislaron *Lactobacillus reuteri* y

Enterococcus faecium. En Colombia no se encuentran estudios previos a esta investigación.

El poder inhibitorio de estas cepas contra *Salmonella* spp. concuerda con lo mencionado por Yun *et al.*, 2009, que obtuvieron 200 cepas de bacterias ácido lácticas probióticas aisladas de heces de cerdos, con capacidad de inhibir significativamente *Escherichia coli* K88 y *S. typhimurium in vitro*. Resultados similares fueron obtenidos por Casey *et al.*, 2004, que aislaron bacterias ácido lácticas del tracto gastrointestinal de

cerdos que inhibieron el crecimiento de *S. typhimurium* con tamaños de halos de inhibición mínimos de 5 mm. En este sentido, existen numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* (Hacin *et al.*, 2008; Jurado *et al.*, 2009; Muñoz, 2011; Casey *et al.*, 2004; Schoster *et al.*, 2013) que han demostrado que diferentes microorganismos probióticos tienen la capacidad de interferir en el crecimiento de una gran variedad de enteropatógenos, se destaca el de Muñoz (2011), que demostró que los sobrenadantes de *L. paracasei*, *Bifidobacterium breve* y *L. rhamnosus*, aislados de heces de niños alimentados con leche materna inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp.

CONCLUSIONES

Las cepas BAL1 y BAL3 de bacterias ácido lácticas obtenidas a partir del calostro de cerdas, exhibieron actividad antimicrobiana *in vitro* contra *S. typhimurium*.

Se corroboró la existencia de un efecto probiótico del calostro materno, lo que se constituye en uno de los factores de transferencia inmunológica para el neonato, situación que favorece la colonización de estos microorganismos benéficos a nivel intestinal.

BIBLIOGRAFÍA

Abrahamsson, T.R., G. Sinkiewicz, T. Jakobsson, M. Fredrikson and B. Bjorksten. 2009. Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 49(3): 349-354.

Casey, P.G., G.D. Casey, G.E. Gardiner, M. Tangney, C. Stanton, R.P. Ross, C. Hill and G.F. Fitzgerald. 2004. Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology* 39(5): 431-438.

Dinan, T.G. and J.F. Cryan. 2012. Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* 37(9): 1369-1378.

FAO, 2001. Food and Nutrition paper 85. Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Report of a joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina. 56 p.

González, L.M., V. Barrios, D.M. García, G. Naharro, A. Carvajal y P. Rubio. 2011. Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas de calostro de cerda e intestino de lechones recién nacidos. Evaluación preliminar de sus posibilidades de uso como probióticos. pp. 848-850. En: Memorias XIV Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza, España.

Hacin, B., I. Rogelj and B.B. Matijašić. 2008. Lactobacillus isolates from weaned piglets' mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens. *Folia Microbiológica* 53(6): 569-576.

Hong, T., V. Passoth and J.E. Lindberg. 2011. Bacterial diversity at different sites of the digestive tract of weaned piglets fed liquid diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24(6): 834-843.

Martín, R., E. Jiménez, M. Olivares, M.L. Marín, L. Fernández, J. Xaus, J.M. Rodríguez. 2006. *Lactobacillus salivarius* and CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology* 112(1): 35-43.

Jurado, H., D. Aguirre y C. Ramírez. 2009. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. *Revista MVZ Córdoba* 14(2): 1723-1735.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria *FEMS Microbiology Reviews* 12(1-3): 39-85.

Lis-Balchin, M., G. Buchbauer, T. Hirtenlehner and M. Resch. 1998. Antimicrobial activity of *Pelargonium* essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Letters in Applied Microbiology* 27(4): 207-210.

Martín, R., S. Langa, C. Reviriego, E. Jiménez, M.L. Marín, J. Xaus, L. Fernández and J.M. Rodríguez. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics* 143(6): 754-758.

Monteagudo, M.A. 2010. Selección *in vitro* de microorganismos con potencial probiótico. Tesis Doctoral Área de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. España. 206 p

Montville, T.J. and Y. Chen 1999. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved

questions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50(5): 511-519.

Muñoz, S. 2011. Aislamiento, identificación y caracterización de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, obtenidos a partir de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Universidad de Granada, España. 249 p.

Palou, A. y F. Serra. 2000. Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. *Alimentación Nutrición y Salud* 7(3): 76-90.

Saavedra, J.M. 2001. Clinical applications of probiotic agents. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(6): 1147-1151.

Salminen, S., M.A. Deighton, M.A., Benno and S.L. Gorbach. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. In: S. Salminen and A. Von Wright (eds.). *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker Inc., Nueva York. 211 p.

Schoster, A., B. Kokotovic, A. Permin, P.D. Pedersen, F.D. Bello and L. Guardabassi. 2013. *In vitro* inhibition

of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. *Anaerobe* 20: 36-41.

Schrezenmeir, J. and M. Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *American Society for Clinical Nutrition* 73(2): 361-364.

Sekhon, B.S. and S. Jairath. 2010. Prebiotics, probiotics and synbiotics: An overview. *Journal of Pharmaceutical Education and Research* 1(2): 13-36.

Settharaksa, S. 2008. Isolation and Investigation of the effect of *Lactobacillus* spp. on vaginal bacterial pathogens and formulation of vaginal suppositories. Thesis Magister Pharmaceutical Sciences. Faculty of Pharmaceutical Sciences. Prince of Songkla University, Tailandia. 102 p.

Wilcock, B.P. and K.L. Schwartz. 1992. *Salmonellosis. diseases of swine*. 7th edition. A.D. Leman, (ed.). Iowa State University Press, Ames. 1008 p.

Yun, J.H., K.B. Lee, Y.K. Sung, E.B. Kim, H.G. Lee and Y.J. Choi. 2009. Isolation and characterization of potential probiotic lactobacilli from pig feces. *Journal of Basic Microbiology* 49(2): 220–226.