

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LACTOBACILOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO PARA EL DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN DE APLICACIÓN ORAL PARA ANIMALES. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y TECNOLÓGICA DE LOS AISLAMIENTOS.

Abdala, Leisa

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Laboratorio de Microbiología

Director: Marchisio, Martín

Área temática: Ciencias Biológicas

Palabras claves: probiótico, lactobacilos, nutrición animal

INTRODUCCIÓN

En la producción pecuaria con fines comerciales se suele utilizar aditivos que aumentan la disponibilidad y absorción de los nutrientes, a la vez que modulan la flora intestinal de los animales y promueven su crecimiento. El agregado de estos aditivos permite aumentar el crecimiento y productividad de los animales, obtener un producto más homogéneo y de mejor calidad, y disminuir los costos de los productos de origen animal.

Entre los aditivos más usados se encuentran los antibióticos. Sin embargo, se ha relacionado su uso con el aumento de bacterias resistentes a los mismos. Por esto, existe la tendencia a la utilización de otros aditivos, como los probióticos.

Las bacterias del género *Lactobacillus* se encuentran dentro de las más estudiadas como aditivo microbiano en el alimento de los rumiantes. Se ha demostrado que las bacterias de este género otorgan protección contra infecciones entéricas y mantienen el bienestar del animal (Gaggia *et al.*, 2010).

En este trabajo se aíslan lactobacilos de diferentes muestras y se estudian para su potencial uso como probióticos.

OBJETIVOS

- Aislar bacterias ácido lácticas a partir de diversas muestras de intestinos de animales y sustratos vegetales.
- Realizar la identificación por espectroscopia de masas (MALDI-TOF).
- Caracterizar la actividad antagonista frente a patógenos.

Título del proyecto: DESARROLLO DE UN PROBIÓTICO DE APLICACIÓN ORAL PARA ANIMALES, FORMULADO A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN CONTROLADA DE SUSTRATOS VEGETALES CON MICROORGANISMOS NATIVOS

Instrumento: SF INNOVAR 2023

Año de convocatoria: 2023

Organismo financiador: Agencia Santaferina de Ciencia, Tecnología e Innovación

Director: GUSTAVO NORBERTO D'ASCANIO



METODOLOGÍA

El aislamiento de lactobacilos se llevó a cabo a partir de muestras de sustratos vegetales sin fermentar, fermentado y sedimentado (Nutreza S.A.) e intestinos de *Mylocheilichthys pacu* (Pacú) y *Gallus gallus domesticus* (Gallina).

Para el procesamiento de las muestras de sustratos vegetales se llevó a cabo la técnica de recuento en placa en superficie en medio MRS-agar con cisteína. Las placas sembradas se incubaron a 37 °C en anaerobiosis. Para el procesamiento de las muestras de intestinos de Pacú y de Gallina, se realizó un lavado a cada intestino con solución fisiológica aplicando presión por medio de una jeringa estéril. El lavado se colectó en un recipiente estéril. A partir de este se realizó el recuento en placa en superficie como se describió anteriormente. A continuación del lavado, cada intestino se cortó y se le realizó un hisopado. Con el hisopo obtenido de cada muestra se realizó una siembra en placa en cinco estrías. Por último, se realizó raspaje con bisturí a cada intestino. Cada bisturí empleado se lavó con solución fisiológica, y a partir de cada lavado se realizó el recuento en placa en superficie como se describió anteriormente.

Se seleccionaron las colonias típicas realizando la evaluación macro y microscópica de las mismas. Para la evaluación microscópica, se realizó tinción diferencial de Gram. Además, se realizó la prueba de la catalasa.

Los aislamientos seleccionados se conservaron, y, luego, los cultivos frescos de los microorganismos fueron derivados al Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral para ser identificados mediante la técnica de MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight*).

Con los aislamientos identificados, se evaluó la actividad antagonista mediante el ensayo de *spot test*. El mismo permitió identificar aquellos aislamientos con la capacidad de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 y de *Salmonella Typhimurium*. (Siroli *et al.* 2017).

RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 68 aislamientos. Luego de la caracterización macro y microscópica, se seleccionaron 27 bacterias ácido lácticas.

Los aislamientos seleccionados se conservaron en caldo MRS con glicerol al 25%, y se almacenaron a -80°C.

Los resultados obtenidos a partir de la identificación realizada mediante MALDI-TOF se resumen en la Figura 1. Se pudo observar que el mayor porcentaje de los aislamientos correspondieron a *Lactobacillus paracasei*, y 7 de los aislamientos no pudieron ser identificados por la metodología empleada.

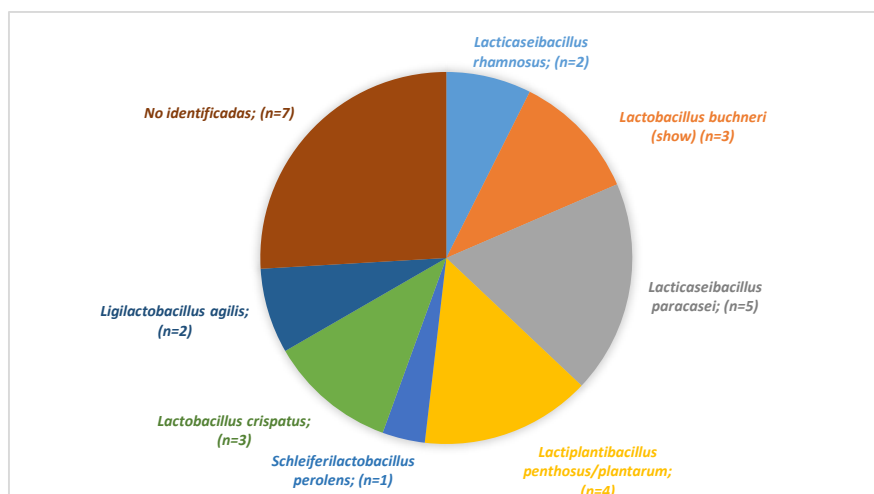


Figura 1: Distribución de lactobacilos según la especie a la que pertenecen.

Las especies identificadas de las muestras de sustratos vegetales (sin fermentar, fermentado y sedimentado) y de *Gallus gallus domesticus* (Gallina), se indican en las Figuras 2 y 3, respectivamente. A partir de las muestras de intestinos de *Myleus pacu* (Pacú) no se logró aislar bacterias ácido lácticas.

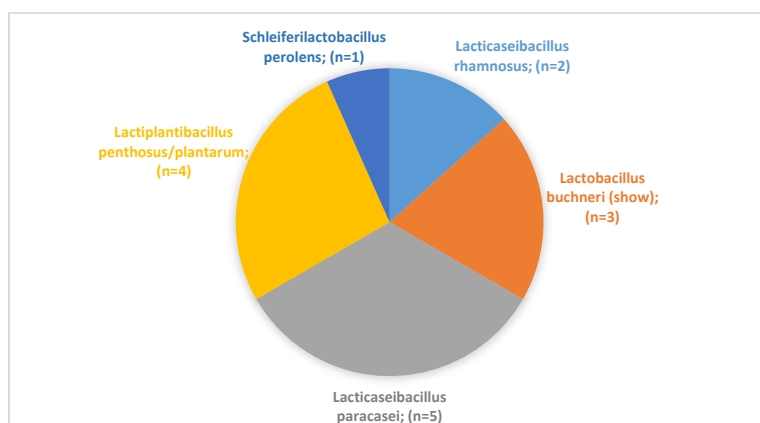


Figura 2: Especies de lactobacilos identificadas y no identificadas aisladas de muestras de sustratos vegetales sin fermentar, fermentado y sedimentado.

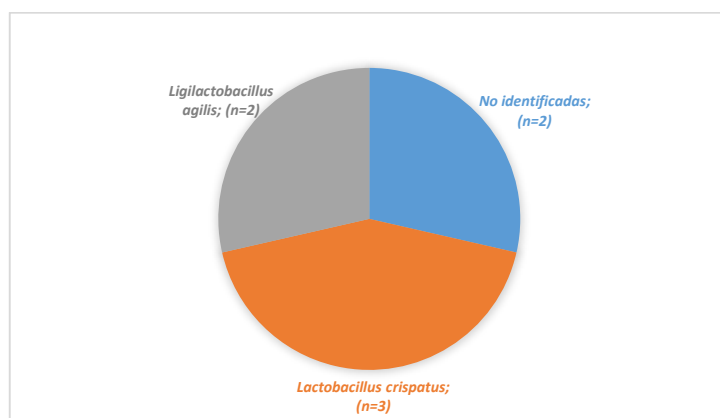


Figura 3: Especies de lactobacilos identificadas y no identificadas aisladas desde intestinos de gallinas.

Los 5 aislamientos evaluados en las pruebas de antagonismo mostraron capacidad inhibitoria en el crecimiento de *E. coli* y de *S. Typhirmurium*. Las especies que mostraron capacidad antagonista fueron *Lactobacillus rhamnosus* (ambos aislamientos obtenidos), *Lactobacillus buchneri* (2/3 aislamientos obtenidos) y uno de los aislamientos no identificados hasta el momento.

CONCLUSIONES

En este trabajo se identificaron 20 lactobacilos hasta el rango taxonómico de especie. Siete aislamientos no se identificaron por la técnica empleada, por lo cual se realizará su identificación empleando amplificación y secuenciación de ADNr 16S.

Los 5 aislamientos evaluados hasta el momento mostraron actividad antagónica frente a *E. coli* y *S. Typhirmurium*.

BIBLIOGRAFÍA

Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*.141, 15-28.

Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Parolin, C., Palomino, R., Vitali, B., Lanciotti, R. 2017. Determination of antibacterial and technological properties of vaginal lactobacilli for their potential application in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 8,1-12.