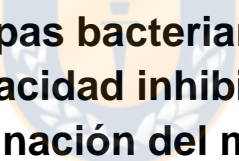




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias
Mención Microbiología

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
Mención Microbiología



**Caracterización de cepas bacterianas probióticas desde
leche porcina con capacidad inhibitoria sobre patógenos
de lechones y determinación del mecanismo inhibitorio.**

SANDRA RAYÉN QUILODRÁN VEGA
CHILLÁN-CHILE
2016

Profesor Guía: Dra. Apolinaria García Cancino
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

1. RESUMEN

En las etapas de amamantamiento y destete, los lechones son susceptibles a infecciones causadas por bacterias enteropatógenas, debido al desbalance de la microbiota intestinal y de los cambios en su alimentación. En paralelo, el plantel porcino tiene un impacto en el medio ambiente debido a las prácticas nutricionales, las cuales involucran la administración de antibióticos como profilaxis o como acelerador del crecimiento de los lechones. A pesar que los planteles cuentan con reglamentos estrictos de manejo sanitario y bioseguridad, el uso de antibióticos y su eliminación a través de las excretas de los animales contamina recursos naturales, selecciona microorganismos resistentes y puede interferir en la inocuidad alimentaria. Hoy en día, se buscan alternativas que replacen a los antibióticos, como el uso de probióticos.

El objetivo de esta tesis fue caracterizar al menos una cepa potencialmente probiótica, aislada desde leche de cerda, con acción sobre patógenos que producen diarreas en los lechones y que además fuera capaz de acumular selenio, para que además, esta tuviera una característica antioxidante. Debido a la abundante microbiota de esta matriz y considerando que no todos los microorganismos presentes poseen características probióticas, diez muestras de leche porcina fueron cultivadas en caldo MRS ajustado a pH 3 para pre seleccionar cepas resistentes a ácido. Luego, como segunda etapa seleccionadora y para cumplir con el objetivo de la tesis, se probó el efecto sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica, *E. coli* enterotoxigénica y una cepa de *Salmonella* sp., patógenos causantes de diarreas en lechones, mediante la técnica de difusión en agar. Luego de este screening fueron seleccionadas 4 cepas, las que siguieron la caracterización para las pruebas funcionales de resistencia a distintas concentraciones de NaCl y de bilis bovina (Oxgall), determinación de hidrofobicidad de superficie (en xilol), además las pruebas de inocuidad (perfil de resistencia a antibióticos, detección de hemolisinas y gelatinasas). Las cepas fueron identificadas mediante API y PCR utilizando los primers Lac y LbG para el género *Lactobacillus*, finalizando con la secuenciación de la región que codifica para el ARNr 16S. A este nivel de selección, se evaluó el efecto antagonista sobre

E. coli ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica y una cepa de *Salmonella* sp. aislada desde intestino de cerdo utilizando el método de antagonismo retrasado. Hasta este punto, las cuatro cepas presentaron características de potenciales cepas probióticas. Se realizaron ensayos de exclusión y desplazamiento en línea celular Caco – 2. Estos ensayos marcaron diferencias entre las 4 cepas que habían sido caracterizadas. Se verificó si estas cepas eran capaces de acumular selenio. En paralelo, se realizaron ensayos para microscopía electrónica de barrido, un ensayo *in vivo*, detección de aminas biógenas y un breve análisis de la acción del sobrenadante sobre patógenos para una de las cepas seleccionadas.

Como resultados se obtuvo que, las 4 cepas seleccionadas como potencialmente probióticas correspondieron al género *Lactobacillus*. Mediante el método de antagonismo retrasado, las 4 cepas seleccionadas estadísticamente mostraron efecto inhibitorio sobre todos los patógenos utilizados en esta tesis. Las 4 cepas resistieron condiciones salinas de al menos 3% pv y concentraciones de sales biliares bovina (hasta 5% p/v). Además, presentaron buen perfil de inocuidad, debido a la ausencia de hemolisinas y gelatinasas. Las cepas presentaron, como esperado, resistencia solo a vancomicina y fueron sensibles, a ampicilina, amoxicilina, eritromicina. La cepa 5E, resultó ser la única cepa altamente hidrofóbica en xilol. En los ensayos en la línea celular Caco-2, las cepas presentaron un mecanismo de exclusión sobre las cepas patógenas, destacándose finalmente dos cepas: la 5E y la 7A', identificadas mediante secuenciación como *L. curvatus* y *L. brevis* respectivamente. Una de las cepas, la 5E, mostró además efecto de desplazamiento sobre las cepas patógenas, sin embargo, no fue capaz de desarrollarse en medio suplementado con selenito. Las cepas 7A' y 9Y fueron capaces para acumular selenio desde los cultivos en medio suplementado con 1 y a 10mg/l de selenito, siendo la 7A' la que más acumuló. Las fotografías de microscopía electrónica mostraron menor daño citológico en presencia de la cepa 5E. En los ensayos *in vivo* se observó significativamente respuesta contra la infección por *S. Typhimurium* cuando se inoculó la cepa 5E en las dosis de 10^8 ó 10^9 células/ratón/día durante 5 días encontrándose un

decaimiento en el recuento de *S. Typhimurium* en hígado y bazo. Por último, al analizar el sobrenadante de la cepa 5E se observó efecto sobre patógenos y además, no produce aminas biógenas.

Como conclusión, la matriz leche porcina es una fuente de cepas potencialmente probióticas y de ella se obtuvo más de una cepa con características potencialmente probiótica y con capacidades inhibitorias sobre los patógenos estudiados. Las principales diferencias surgieron frente a los ensayos de exclusión y desplazamiento en la línea celular Caco-2 y en la capacidad de acumulación de selenio.

Se logró obtener 2 cepas con efecto sobre patógenos que causan diarreas en lechones; una posee un mecanismo de exclusión y acumula selenio y la otra cepa presenta mecanismo de exclusión y desplazamiento y no acumula selenio.

