

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de la colonización del tracto digestivo de cerdos por cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, componentes de un producto probiótico

Miguel Pérez Ruano^{I*}, Mabelin Armenteros Amaya^I, Ernesto Vega Cañizares^{II}

^IDepartamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de la Habana (UNAH), Apartado 18, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. ^{II}Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Con el objetivo de evaluar la posible utilización como probiótico, de un producto compuesto por *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, se estudió la colonización del tracto intestinal de cerdos recién nacidos, por los agentes componentes de este producto. Como probiótico se utilizó una mezcla de miel de caña, levadura torula y agua hasta completar 1000 ml y 25 ml del cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*. Se conformaron cuatro grupos experimentales de la siguiente manera: Grupo 1: 18 crías (camada de dos cerdas) a las cuales se les aplicó 5 ml del producto por vía oral al nacimiento; Grupo 2: 17 crías (camada de dos cerdas) a las cuales se les aplicó 5 ml del producto por vía oral al nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento; Grupo 3: 10 crías (camada de una cerda) a las que se les aplicó 5 ml del placebo por vía oral al nacimiento; Grupo 4: 12 crías (camada de una cerda) a las cuales se les aplicó 5 ml del placebo por vía oral al nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento. A todos los animales se les realizó un hizopaje rectal a los 7, 14 y 21 días de finalizado el tratamiento. Se comprobó la colonización del tracto gastrointestinal por *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* en los cerdos tratados con el producto probiótico hasta los 14 días postratamiento y que esta no se encuentra influida por la frecuencia de aplicación del probiótico.

Palabras clave: cerdo, probiótico, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus termophilus*, colonización, tracto digestivo.

Gastrointestinal tract colonization evaluation in pigs by *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophile* strains, components of a probiotic product

ABSTRACT: With the aim of evaluating the possible use as a probiotic product composed by *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus*, the intestinal tract colonization of newborn pigs was studied by the components of this product. As a probiotic, a mixture of 150 ml of molasses and 100 mg torula yeast was used and water was added completing 1000 ml and 25 ml of *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* culture was added. Four experimental groups were formed as follows: Group 1: 18 piglets (a litter of two sows) which was applied 5 ml of the probiotic product orally at birth; Group 2: 17 piglets (a litter of two sows) which were applied 5 ml of the probiotic product orally at birth and at 24 hours after the first treatment; Group 3: 10 piglets (a litter of one sow) which were applied 5 ml of placebo orally at birth and Group 4: 12 piglets (a litter of one sow) which were applied 5 ml of placebo orally at birth and at 24 hours after the first treatment. A microbiological sampling by rectal swabs at 7, 14 and 21 days posttreatment was applied to all animals. The gastrointestinal tract colonization by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* was observed in pigs treated with the probiotic product until 14 days posttreatment not being and this is not influenced by the frequency of probiotic application.

Key words: swine, probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus termophilus*, colonization, gastrointestinal tract.

* Correspondencia: Miguel Pérez Ruano. E mail: migperez@unah.edu.cu.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de productos con características probióticas surge como una medida ante el incremento de la resistencia microbiana a los antibióticos y a la prohibición del empleo de estos últimos en la dieta animal (1); como ocurre en la Unión Europea, donde el empleo de antibióticos como promotores del crecimiento quedó prohibido definitivamente (2, 3).

Los probióticos son utilizados para mantener un balance de la microflora del tracto gastrointestinal y eliminar los microorganismos patógenos, lo que posibilita una reducción de los trastornos gastrointestinales comunes en estos animales (4).

El tracto intestinal se coloniza rápidamente después del nacimiento con el contacto con la madre, ya sea con sus deyecciones o con sus secreciones, de tal manera que el lechón, después de tres días de nacido presenta ya una microflora intestinal que le ayuda a efectuar procesos digestivos, y se convierte en una barrera de defensa muy importante; esto evita que las bacterias patógenas puedan colonizar el tracto intestinal, pues en esta etapa el animal depende, en teoría, exclusivamente de la alimentación de la leche materna (5).

El uso de probióticos puede influir en la composición del ambiente microbiano intestinal y con ello lograr un establecimiento temprano de una flora intestinal beneficiosa (6). Con este fin se utilizan numerosas especies bacterianas, entre ellas las de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* (7, 8, 9, 10).

Entre los mecanismos de acción, por los cuales actúan estas bacterias, se destacan la reducción de pH intestinal y el efecto competitivo, debido a la ocupación de los lugares de colonización de los microorganismos patógenos y la producción de sustancias antimicrobianas (11).

Numerosos efectos beneficiosos se han reportado con el uso de productos probióticos, entre ellos algunos autores han demostrado que la colonización del tracto gastrointestinal por algunas bacterias ácido lácticas contribuye significativamente al balance de su microflora (12). Se ha descrito, además, que la administración de determinados productos con efecto probiótico produce cambios importantes en la presencia de enterobacterias patógenas en el tracto intestinal y en las heces fecales de los cerdos (13, 14).

Es por ello, que el presente trabajo tiene como objetivos, evaluar la colonización del tracto digestivo de cerditos recién nacidos por *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, microorganismos com-

ponentes de un producto probiótico, así como evaluar la influencia de su aplicación en la eliminación de otros microorganismos en la heces fecales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se desarrolló en una granja integral porcina y se utilizaron crías recién nacidas del cruce comercial Yorkshire - Landrace.

Como producto probiótico se utilizó una mezcla de 150 ml de miel de caña, 100 mg de levadura torula, a la cual se le añadió agua hasta completar 1000 ml y se esterilizó a 121°C, durante 30 minutos. Posteriormente, se le añadió 25 ml del cultivo de cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* certificadas por el banco de cultivos perteneciente al Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia. La concentración de microorganismos en el producto final osciló entre 10^8 y 10^9 ufc/ml y se determinó por conteo en placa a partir de diluciones seriadas del inóculo en solución salina peptonada hasta 10^{-8} . La siembra de las diluciones se realizó por duplicado en los medios selectivos MRS (OXOID) y M17 (OXOID), descritos para el aislamiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, respectivamente. Además, se empleó un placebo compuesto por miel de caña y levadura torula a las mismas concentraciones que el producto probiótico.

El cálculo de la muestra se realizó a partir del programa Tmuestra (15) y se tuvieron en cuenta los siguientes elementos:

Prueba a utilizar: Comparación de proporciones.

Proporción de animales colonizados esperada en los grupos de tratamiento: 70 %

Proporción de animales colonizados en los grupos no tratados: 10 %

Nivel de significación esperado: 5 %

Potencia de la prueba: 90 %

Tamaño mínimo de la muestra calculado: 9 animales por grupo

Para el desarrollo del ensayo se conformaron 4 grupos experimentales de la siguiente manera:

o Grupo 1: 18 crías (la camada de 2 cerdas): se les aplicó 5 ml del producto probiótico por vía oral en el momento del nacimiento.

o Grupo 2: 17 crías (la camada de 2 cerdas): se les aplicó 5 ml del producto probiótico por vía oral en el momento del nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento.

o Grupo 3: 10 crías (la camada de 1 cerda): se les aplicó 5 ml del placebo por vía oral en el momento del nacimiento.

o Grupo 4: 12 crías (la camada de 1 cerda): se les aplicó 5 ml del placebo por vía oral en el momento del nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento.

A la totalidad de los animales se le tomó muestras a través de hisopaje rectal a los 7, 14 y 21 días de finalizado el tratamiento; las mismas fueron trasladadas de forma inmediata al Laboratorio de Microbiología perteneciente al Centro de Ensayos para el Control de la Calidad de la leche en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Todas las muestras se sembraron en Agar MRS (OXOID) y M17 (OXOID) según el procedimiento descrito por el Manual de la OXOID (16) como medios selectivos para el aislamiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, respectivamente. Además, se utilizó el medio de cultivo agar sangre (BIOCEN) con adición de 5% de eritrocitos de carnero estéril, utilizando el método de agotamiento por estrías para el aislamiento de otros microorganismos presentes. La identificación de los microorganismos hasta nivel de especie se realizó utilizando el kit diagnóstico API *Lactobacillus* para la identificación de los agentes del género *Lactobacillus*, 20 Strep para la identificación de los agentes del género *Streptococcus* y 20 E para la identificación de Enterobacterias, todos provenientes de la firma Biomérieux.

Para el análisis de los resultados se utilizó un test estadístico de comparación de proporciones con prueba de Duncan (17) para determinar diferencias entre los grupos.

RESULTADOS

A los 7 días de aplicado el tratamiento, en el Grupo 1 se encontró que el 88,88 % de los animales fueron colonizados por *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, respectivamente. En el Grupo 2 se observó 100% de colonización, no encontrándose presencia de otros microorganismos en el tracto intestinal. En los grupos 3 y 4, no se encontró presencia de *Lactobacillus acidophilus* ni *Streptococcus termophilus*; sin embargo, se evidenció la presencia de microorganismos gram negativos en el 100% de los animales estudiados (Tabla 1).

A partir de los 14 días se observó una ligera disminución de la colonización en los dos primeros grupos: 72,22 % de animales colonizados en el Grupo 1 para ambos microorganismos, 82,35 % y 88,23 %, en el segundo grupo para *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, respectivamente. Los grupos 3 y 4 tuvieron el mismo comportamiento que a los 7 días (Tabla 2).

A los 21 días se encontró que en todos los grupos existió aislamiento de microorganismos gram negativos, incluso en los animales tratados, lo que coincide con una reducción del porcentaje de colonización por las bacterias lácticas. Se observaron valores de 16,6% y 11,1% en el Grupo 1 y 11% y 17% en el Grupo 2 para *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*, respectivamente. Los grupos 3 y 4 mantuvieron el mismo comportamiento durante todo el experimento (Tabla 3).

TABLA 1. Colonización del tracto digestivo a los siete días de aplicación de los tratamientos./ *Intestinal tract colonization at seven days of applying the treatments.*

Grupos	Total de animales	Animales con aislamiento de otros microorganismos.		Animales colonizados (%)			
		%	ES	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ES	<i>Streptococcus termophilus</i>	ES
Grupo 1	18	0 ^b	0,1147	88,88 ^a	0,1163	88,88 ^a	0,1163
Grupo 2	17	0 ^b	0,1180	100 ^a	0,1197	100 ^a	0,1197
Grupo 3	10	100 ^a	0,1539	0 ^b	0,1561	0 ^b	0,1561
Grupo 4	12	100 ^a	0,1405	0 ^b	0,1425	0 ^b	0,1425

Proporciones con letras diferentes por columnas difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Leyenda: Grupo 1: 5 ml de Probiótico vía oral al nacimiento, Grupo 2: 5 ml de Probiótico vía oral al nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento, Grupo 3: 5 ml del placebo por vía oral al nacimiento, Grupo 4: 5 ml del placebo por vía oral en el momento del nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento.

TABLA 2. Colonización del tracto digestivo a los 14 días de aplicación de los tratamientos./ *Intestinal tract colonization at 14 days of applying the treatments.*

Grupos	Total de animales	Animales con aislamiento de otros microorganismos.		Animales colonizados (%)			
		%	ES	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ES	<i>Streptococcus termophilus</i>	ES
Grupo 1	18	0 ^b	0,1147	72,22 ^a	0,1176	72,22 ^a	0,1178
Grupo 2	17	0 ^b	0,1180	82,35 ^a	0,1210	88,23 ^a	0,1212
Grupo 3	10	100 ^a	0,1539	0 ^b	0,1578	0 ^b	0,1580
Grupo 4	12	100 ^a	0,1405	0 ^b	0,1441	0 ^b	0,1443

Proporciones con letras diferentes por columnas difieren significativamente ($p \leq 0.05$)

Leyenda: Grupo 1: 5 ml de Probiótico vía oral al nacimiento, Grupo 2: 5 ml de Probiótico vía oral al nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento, Grupo 3: 5 ml del placebo por vía oral al nacimiento, Grupo 4: 5 ml del placebo por vía oral en el momento del nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento.

TABLA 3. Colonización del tracto digestivo a los 21 días de aplicación de los tratamientos./ *Intestinal tract colonization at 21 days of applying the treatments.*

Grupos	Total de animales	Animales con aislamiento de otros microorganismos.		Animales colonizados (%)			
		%	ES	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ES	<i>Streptococcus termophilus</i>	ES
Grupo 1	18	100	0	16,66	0,0666	11,11	0,0686
Grupo 2	17	100	0	11,76	0,0686	17,64	0,0686
Grupo 3	10	100	0	0	0,0894	0	0,0894
Grupo 4	12	100	0	0	0,0816	0	0,0816

Proporciones con letras diferentes por columnas difieren significativamente ($p \leq 0.05$)

Leyenda: Grupo 1: 5 ml de Probiótico vía oral al nacimiento, Grupo 2: 5 ml de Probiótico vía oral al nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento, Grupo 3: 5 ml del placebo por vía oral al nacimiento, Grupo 4: 5 ml del placebo por vía oral en el momento del nacimiento y 24 horas después del primer tratamiento.

En el transcurso del estudio se evidenció que con la aplicación del producto probiótico se logra, durante las primeras dos semanas post-tratamiento, una elevada colonización del tracto intestinal de los animales estudiados por los agentes componentes del producto, y se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los grupos tratados con respecto a los controles. Además, no se diagnosticaron otros microorganismos en los grupos tratados, aspecto esencial para la primera etapa de vida de los cerditos, a diferencia de los animales controles, donde se observó la presencia de gérmenes gram negativos durante todo el ensayo.

Se debe señalar que a los 21 días de aplicarse el tratamiento se evidencia la presencia de las bacterias gram negativas; no se encontraron diferencias signifi-

cativas al comparar los grupos tratados y controles, lo que parece estar determinado por el consumo de otros alimentos, que provoca la colonización del tracto intestinal de los cerdos por otros microorganismos.

Por otra parte, entre los grupos tratados no se encontraron diferencias significativas durante todo el experimento, lo que corrobora que no existe influencia de la frecuencia de tratamiento en el efecto de colonización por estos microorganismos.

Al realizar un análisis del comportamiento de la colonización por *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus* en los Grupos 1 y 2 a los siete, 14 y 21 días, se hallaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), a los siete y 14 días con respecto a 21 días.

DISCUSIÓN

Está descrito que los microorganismos que no colonizan el intestino, una vez concluida su administración a los animales, no se aíslan de las heces fecales, (12). En nuestro trabajo se demostró que los agentes administrados se aíslan de las heces fecales en un elevado número de animales, hasta 14 días post inoculación, lo que indica que los mismos colonizan el tracto digestivo, cumpliendo con uno de los requisitos señalados por diferentes autores para que un microorganismo pueda ser utilizado como probiótico, que es que sobreviva en el tracto intestinal (11, 18).

Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios realizados en humanos y animales. En humanos se evaluó la colonización de tres cepas bacterianas con efecto probiótico, una del género *Streptococcus* y dos del género *Bifidobacterium*, las que fueron detectadas en heces fecales inmediatamente después de su administración y hasta tres semanas después de concluida su administración (19). En cerdos, un estudio realizado con una cepa de *Escherichia coli* Nissle 1917, que presenta efecto probiótico, se demostró que esta se puede eliminar en las heces fecales hasta después de 30 días de su inoculación (20). En otro estudio realizado se recobró una cepa de *Lactobacillus plantarum* siete días después de la administración; con ello se demostró que esa cepa colonizó y creció en el tracto digestivo de porcinos (12).

Se ha demostrado que la presencia de microorganismos con efecto probiótico, aunque no colonicen el tracto intestinal, provoca cambios en el tracto digestivo que pueden llegar a límites no tolerados por otros microorganismos (13). En tal sentido se demostró, en el presente trabajo, que las cepas utilizadas son capaces de reducir la presencia de otros microorganismos potencialmente patógenos para los animales, ya que solo al reducirse los aislamientos de las cepas utilizadas en el producto probiótico en los animales, se incrementó la presencia de otros microorganismos.

Estos resultados coinciden con los planteados por otros autores, quienes señalan que las cepas probióticas pueden desplazar e inhibir el desarrollo de otros patógenos oportunistas, y con ello mejorar el comportamiento productivo de los animales (13, 21).

CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo demostraron que las cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* utilizadas son capaces de colonizar el

tracto digestivo de los cerdos recién nacidos y reducir la presencia de otros microorganismos que pudieran ser potencialmente patógenos.

REFERENCIAS

1. Seal BS, Lillehoj HS, Donovan DM, Gay CG. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Animal Health Research Reviews*. 2013;14(1):78-87.
2. Missotten JMA, Michiels J, Goris J, Herman L, Heyndrickx M, et al. Screening of two probiotic products for use in fermented liquid feed. *Livest Sci*. 2007;108:232.
3. Allen HK, Levine UY, Looft T, Bandrick M, Casey TA. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends Microbiol*. 2013;21(3):114-119.
4. Kenny M, Smidt H, Mengheri E, Miller B. Probiotics - do they have a role in the pig industry? *Animal*. 2011;5(3):462-470.
5. Heo JM, Opapeju FO, Pluske JR, Kim JC, Hampson DJ, Nyachoti CM. Intestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J Anim Physiol An N*. 2013;97:207-237.
6. Heinritz SN, Mosenthin, R, Weiss E. Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutr Res Rev*. 2013;26:191-209.
7. Guandalini S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45(Suppl):149-153.
8. Sahin I, Acar S, Ozaydın I, Ozaydın C, Calıpkın E, et al. Investigation of the effects of probiotic bacteria on bacterial translocation that developed during diagnostic laparoscopy: an experimental study. *Mikrobiyol Bul*. 2012;46(4):660-670.
9. Castillo NA, de LeBlanc AM, Galdeano CM, Perdigón G. Comparative study of the protective capacity against Salmonella infection between probiotic and nonprobiotic lactobacilli. *J Applied Microbiol*. 2013;114:861-876.

10. Mahmood T, Masud T, Imran M, Ahmed I, Khalid N. Selection and characterization of probiotic culture of *Streptococcus thermophilus* from dahi. *Int J Food Sci Nutr*. 2013;64(4):494-501.
11. Figueroa JL, Chi EE, Cervantes M, Domínguez IA. Alimentos funcionales para cerdos al destete. *Vet Mex*. 2006;37:117.
12. Tsuda H, Hara K, Miyamoto T. Survival and colonization of orally administered *Lactobacillus plantarum* 301102 in porcine intestinal tract. *Anim Sci J*. 2008;79:274.
13. Smajs D, Bures J, Smarda J, Chaloupkova E, Kvetina J, Forstl M, et al. Experimental Administration of the Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917 Results in Decreased Diversity of *E. coli* Strains in Pigs. *Curr Microbiol*. 2012;64:205-210.
14. Ihara Y, Hyodo H, Sukegawa S, Murakami H, Morimatsu F. Isolation, characterization, and effect of administration *in vivo*, a novel probiotic strain from pig feces. *Anim Sci J*. 2013;84:434-441.
15. García R. Programa para la determinación del tamaño de muestra. Universidad Veracruzana, Veracruz., México. 1998.
16. OXOID. Manual OXOID: Procedimiento para análisis microbiológico de muestras de alimentos. 2007: pag.14-18.
17. Duncan DB. Multiple range and multiple F tests *Biometrics*. 1955;11:1.
18. Fontana L, Bermúdez BM, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Brit J Nutr*. 2013;109:S35-S50.
19. Tobin JM, Garland SM, Jacobs SE, Pirota M, Tabrizi SN. Rapid assay to assess colonization patterns following in-vivo probiotic ingestion. *BMC Research Notes*. 2013;6:252.
20. Barth S, Duncker S, Hempe J, Breves G, Baljer G, Bauerfeind R. *Escherichia coli* Nissle 1917 for probiotic use in piglets: evidence for intestinal colonization. *J Applied Microbiol*. 2009;107:1697-1710.
21. Cheng S, Yeshe Y, Xiaona W, Xiuyu L, Dafeng S, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. *BMC Vet Res*. 2012;8:89.

Recibido: 20-6-2014.

Aceptado: 14-10-2014.