

VII JORNADAS DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN – FCV-UNL

RESUMEN EXTENDIDO

EFFECTO INHIBITORIO DE *Lactobacillus plantarum* AISLADOS DESDE LAS DISTINTAS ETAPAS DE LA CADENA PRODUCTIVA DE CARNE PORCINA FRENTE A *Campylobacter coli*

Ruiz MJ¹, Etcheverría AI³, Sirini NE¹, Soto LP1², Sequeira G², Martí LE², Zbrun MV1²

¹Laboratorio Análisis de Alimentos, ICIVET-Litoral, UNL-CONICET.

²Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL.

³Laboratorio de Inmunología y Biotecnología, CIVETAN-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA

* Correspondencia: Ruiz MJ. E-mail: jruiz@vet.unicen.edu.ar

Editado por: R. Sobrero, V. Matiller, C. Baravalle

INHIBITORY EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ISOLATED FROM THE DIFFERENT STAGES OF THE PORCINE MEAT PRODUCTION CHAIN AGAINST *Campylobacter coli*

SUMMARY.

Lactobacillus plantarum has a great capacity to adapt to environmental and have antibacterial capacity against different pathogen. This is a potential alternative for the control of pathogen in food coming slaughter animal. The objective of this work was to determine the antibacterial effect of *L. plantarum* strains against *C. coli* strains. *L. plantarum* LP1, LP3, LP5 and LP7 of porcine origin and a reference strain of *Campylobacter coli* NCTC 11366 were used. *C. coli* and *L. plantarum* was reactivated. Lyophilized ELC and ELCn were obtained. *C. coli* was distributed on the surface of mCCDA by swab and the ELC and the ELCn were inoculated in wells previously made on the agar. After 48 h, the diameter of the zone of inhibition was measured. The inhibition halos produced were 23.2 mm. The ELCn showed less antagonistic activity. The LP5 ELC generated higher inhibition halos and ELCn showed no differences between the four strains studied. *L. plantarum* strains, isolated from the pig production chain, could potentially be applied to control *C. coli*. This data is added to the scarce scientific evidence of the inhibitory effect of *L. plantarum* before this zoonotic pathogen of importance in public health.

Palabras clave: Inhibición, *Lactobacillus plantarum*, *Campylobacter coli*, producción porcina

Keywords: Inhibition, *Lactobacillus plantarum*, *Campylobacter coli*, swine production

Numerosas bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. son consideradas seguras y con múltiples efectos beneficiosos sobre la salud animal y humana. Esta propiedad es atribuida principalmente a

su capacidad para unirse a la pared intestinal y competir ante patógenos intestinales y a la producción de un heterogéneo grupo de sustancias de tipo peptídico, ácidos orgánicos tales como láctico, fórmico,

acético, propiónico y butírico, peróxido de hidrógeno, radicales libres, diacetilo, propionato, fenil-lactato, hidroxifenil-lactato, dipéptidos cíclicos, CO₂, acetoína, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos, antibióticos y bacteriocinas de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas u otras sustancias antimicrobianas (Soriano et al., 2014). Estas atribuciones convierten a algunas bacterias en potencialmente probióticas. La ingesta de *Lactobacillus* spp. y otras bacterias incluidas en el grupo de bacterias ácido lácticas se considera segura para la salud. Sin embargo, los estudios publicados hasta la fecha tienen gran diversidad en su diseño y muestran, originando una importante dificultad para el desarrollo de guías definitivas de tratamiento que faciliten un uso racional de los mismos. Cada cepa debe superar un protocolo de cumplimiento de estatus legal de “*Generally Recognised as Safe*” (GRAS) según la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE. UU., o de “*Qualified Presumption of Safety*” (QPS) por la *European Food Safety Authority* (EFSA). Esto se debe a que no todas cumplen con los criterios de inclusión tales como taxonomía, familiaridad, patogenicidad y destino de uso (Hernández, Rodríguez, & Vázquez, 2020). No obstante, en los últimos años, el interés en los probióticos como suplementos nutricionales y como medicamentos ha aumentado significativamente y representa una tendencia a nivel global no solo para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales sino también para la mejora de la salud humana en general (Toscano, De Grandi, Pastorelli, Vecchi, & Drago, 2017). *Lactobacillus plantarum* es una bacteria ácido láctica que presenta gran versatilidad de adaptación a nichos ambientales y ecológicos diferentes, tales como verduras, carne y pescado, y productos lácteos, así como el tracto gastrointestinal de animales y humanos (Bringel et al., 2005). Esto se debe a la capacidad de *L. plantarum* de codificación para la absorción y utilización de diferentes azúcares, captación de péptidos y formación de aminoácidos vinculados al potencial de asociación a superficies y sustratos para su crecimiento (Kleerebezem et al., 2003). Varios estudios demostraron que ciertas cepas pueden tener efectos beneficiosos sobre la funcionalidad intestinal de los mamíferos y algunas se han desarrollado como cultivos probióticos (Galdeano, 2006). La heterogeneidad de *L. plantarum* la convierte en una especie ampliamente utilizada en alimentos y salud, sumado a su capacidad antibacteriana frente a diferentes bacterias patógenas (Kostinek et al., 2005). De esta manera, su aplicación en los sistemas de producción de alimentos resulta una alternativa potencial para el control de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) relacionadas con el consumo de carne porcina (Colello et al., 2018). Las especies termotolerantes de *Campylobacter* (CT) han tomado gran relevancia debido a que son los principales agentes zoonóticos causantes de enfermedades entéricas de transmisión alimentaria. *Campylobacter coli*, de mayor prevalencia en cerdos, junto con *Campylobacter jejuni* son las principales especies patógenas para humanos dentro de este

género. La transmisión al humano se produce directamente por contacto de la persona con materia fecal de animales, o indirectamente, por el consumo de alimentos de origen animal poco cocidos o por la contaminación cruzada con alimentos preparados listos para consumir (Rossler et al., 2017). Se estima que entre un 50-80% de las cepas de CT que infectan humanos provienen desde la industria avícola mientras que entre el 15-20% lo hace desde la cadena cárnica porcina. Existe una gran variedad de metodologías para determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* y su estudio permitiría dilucidar si las cepas probióticas tendrían más chances de ejercer efectos benéficos *in vivo*. El uso de enfoques *in vivo* para explorar el potencial probiótico permitiría la descripción de una gran diversidad de modelos de mayor complejidad y de una forma biológica integral y sistemática. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antibacteriano de cepas de *L. plantarum* aisladas desde distintas etapas de la cadena de producción de la carne porcina frente a *C. coli*.

En este estudio fueron utilizadas cuatro cepas de *L. plantarum* (LP1, LP3, LP5 y LP7) de origen porcino (Ruiz, Colello, Padola, & Etcheverría, 2017). La toma de muestra se realizó previamente en un establecimiento de producción porcina de ciclo completo del Partido de Tandil. Fueron realizados hisopados en instalaciones, utensilios, cortes de carne fresca y productos finales en las distintas etapas de producción de carne de cerdo: criadero (categorías: gestación, maternidad, lechón, destete, recría y terminación), sala de recepción de reses, cámara de desposte, sala de elaboración de embutidos, boca de expendio. Las muestras fueron tomadas según el Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Diario Oficial de la Unión Europea L 338/1) y al Reglamento (UE) N° 209/2013 de la Comisión de 11 de marzo de 2013 que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005. Cada muestra fue tomada mediante un hisopo estéril en un área de 10 cm x 10 cm y conservada en medio de transporte Stuart, (Deltalab®, España) a temperatura ambiente hasta ser procesada. Las muestras obtenidas fueron procesadas el mismo día de su recolección. El aislamiento de colonias presuntivas de BAL se realizó con base en la metodología descrita por De Angelis et al. (2006). Se suspendieron y homogeneizaron los hisopos en 90 ml de solución fisiológica estéril. A partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en superficie 100 µl de cada dilución sobre placas de agar MRS (Britania®, Argentina) con espátula de Drigalsky y se incubaron a 37 °C por 48 h en microaerofilia. Las colonias características fueron cultivadas en caldo MRS y conservadas con 20% de glicerol a -70 °C. Las colonias individuales fueron sometidas a un primer “*screening*” por morfología de colonia, tinción de Gram, movilidad y reacción de catalasa. Luego, fueron identificados genéticamente mediante la técnica de Reacción en Cadena de la

Polimerasa (PCR) monoplex para determinación de género y PCR multiplex para especie. Finalmente, los aislados LP1, LP3, LP5 y LP7 fueron caracterizados mediante secuenciación de Sanger por el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba, España y confirmados como *Lactobacillus plantarum*. La cepa de *Campylobacter coli* de referencia utilizada como indicadora del efecto inhibitorio, fue amablemente proporcionada por la Dra. Marta Cerda Cuéllar (Laboratorio de Microbiología, CRESA, IRTA-Universidad Autónoma de Barcelona) y nombrada como NCTC 11366. *Lactobacillus plantarum* LP1, LP3, LP5 y LP7 fueron evaluadas frente a *C. coli* NCTC 11366, según la metodología descrita por Zimmermann et al. (2016), con modificaciones. *C. coli* fue reactivado en agar Muller Hinton (MH, Biokar, Francia) durante 48 h a 37°C en microaerofilia ($H_2:CO_2:O_2 = 85:10:5$). Paralelamente, *L. plantarum* fue cultivado en caldo MRS (Biokar, Francia) a 37°C durante 24 h en aerobiosis. El cultivo fue centrifugado dos veces a 6.000 xg durante 15 min para obtener el extracto libre de célula (ELC), el cual fue liofilizado durante 24 h y concentrado hasta 4X. Una porción del ELC obtenido de cada cepa fue neutralizado a un pH de 6,3 con NaOH 10N para obtener un extracto libre de células neutralizado (ELCn). A partir del cultivo de *C. coli* fue realizada una suspensión bacteriana a una DO_{630} de $0,8 \pm 0,05$ y distribuida sobre la superficie de placas con *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base (mCCDA, Oxoid, Reino Unido) mediante hisopo en 3 direcciones diferentes con reposición de cultivo. Luego de 3 a 5 min a temperatura ambiente, el ELC y el ELCn fueron inoculados en pocillos de 5 mm de diámetro previamente realizados sobre el agar. Como control positivo fue utilizado ácido láctico (85%) diluido a 1/32 en uno de los pocillos. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia y analizadas midiendo el diámetro de la zona de inhibición alrededor de cada pocillo con un calibre. Los resultados fueron informados como valores promedio en mm sin considerar el diámetro del pocillo y evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre cepas de los halos de inhibición producidos por los ELC y ELCn frente a *C. coli*. El experimento fue analizado con 10 réplicas.

Los halos de inhibición producidos por los ELC frente a *C. coli* en promedio fueron de 23,2 mm (Fig. 1). Los ELCn (pH 6,3) mostraron menor actividad antagonista frente a *C. coli*, siendo en promedio de 13,15 mm. El control positivo mostró un halo de 11,4 mm. El ELC de LP5 generó halos de inhibición mayores ($P \leq 0,05$) frente a *C. coli* que el resto de las cepas de *L. plantarum*. En cambio, los halos de inhibición generados por los ELCn no mostraron diferencias entre las cuatro cepas estudiadas ($P \geq 0,05$).

Estudios demuestran que a lo largo de la cadena productiva de carne de cerdo se han aislado bacterias involucradas en ETA (Ruiz M.J., 2017). La contaminación por *C. coli* comienza a nivel de granja y

las infecciones humanas aumentan a medida que aumenta la prevalencia en animales. La presencia de *C. coli* en animales de abasto destinado a consumo aumenta la propagación a otros alimentos a través de la contaminación cruzada a lo largo de la cadena agroalimentaria y la manipulación inadecuada del consumidor, principalmente en el hogar (Signorini et al., 2013). El consumo de alimentos y el contacto directo con animales de granja han sido reportados como las fuentes más importantes de campilobacteriosis humana (Rossler et al., 2019). Debido a esto, es prioritario la búsqueda de estrategias pre-matanza para disminuir la incidencia de estos patógenos zoonóticos en la cadena agroalimentaria (Zimmermann et al.). La implementación de *L. plantarum* con propiedades probióticas y la evidencia sobre la versatilidad y potencial de adaptación a distintos nichos de *L. plantarum*, debería servir como base científica para implementar estrategias alternativas destinadas a obtener productos de origen porcino seguros. Los resultados del presente trabajo concuerdan con numerosos estudios respecto de la capacidad inhibitoria de *L. plantarum* frente a bacterias patógenas. Un dato importante recae en la presencia de alguna sustancia además del ácido con actividad antibacteriana debido a que los pocillos que contenían ELCn también produjeron efecto inhibitorio.

Las cepas de *L. plantarum*, aislados desde la cadena productiva de cerdo, podrían ser potencialmente aplicados para controlar *C. coli*. Este dato se suma a la escasa evidencia científica del efecto inhibitorio de *L. plantarum* ante este patógeno zoonótico de importancia en la salud pública. Esto representa un importante indicio para el desarrollo de estrategias de control *in vivo* de patógenos como alternativa al uso de

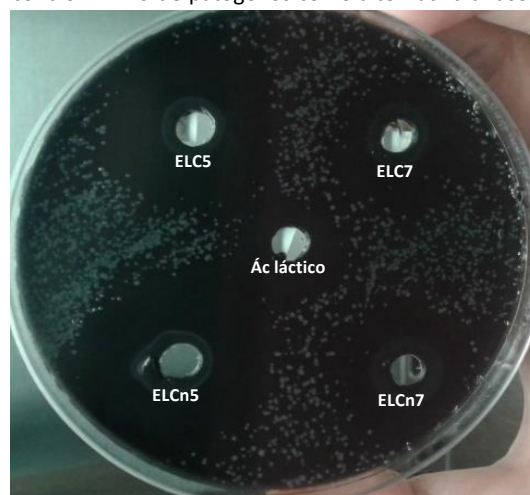


Figura 1. Halos de inhibición generados por el ELC y el ELCn de LP5 frente a *C. coli* en agar mCCDA.

Bibliografía

Colello, R., Ruiz, M. J., Padín, V. M., Rogé, A. D., Leotta, G., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. (2018). Detection and

Characterization of *Salmonella* Serotypes in the Production Chain of Two Pig Farms in Buenos Aires Province, Argentina. *Frontiers in microbiology*, 9, 1370.

Hernández, A. H., Rodríguez, C. C., & Vázquez, J. G. (2020). Novedades en probióticos: evidencias, indicaciones y seguridad. *PediatríaIntegral*, 151.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., . . . Fiers, M. W. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1990-1995.

Rosler, E., Fuhr, E. M., Lorenzón, G., Romero-Scharpen, A., Berisvil, A. P., Blajman, J. E., . . . Signorini, M. L. (2017). Presencia de serotipos de *Campylobacter jejuni* O: 19 en la cadena avícola Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 178-182.

Rosler, E., Signorini, M. L., Romero-Scharpen, A., Soto, L. P., Berisvil, A., Zimmermann, J. A., . . . Frizzo, L. S. (2019). Meta-analysis of the prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in food-producing animals worldwide. *Zoonoses and public health*, 66(4), 359-369.

Ruiz M.J. , C. R., Padola N.L., Etcheverría A.I. (2017). *Aislamiento y caracterización molecular de cepas de Lactobacillus spp. de origen porcino para su potencial aplicación probiótica*. Paper presented at the XII Encuentro de Biólogos en Red, Mar del Plata, Bs As.

Ruiz, M. J., Colello, R., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 174-177.

Signorini, M., Zbrun, M., Romero-Scharpen, A., Olivero, C., Bongiovanni, F., Soto, L., . . . Rosmini, M. (2013). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis by consumption of salad cross-contaminated with thermophilic *Campylobacter* spp. from broiler meat in Argentina. *Preventive veterinary medicine*, 109(1-2), 37-46.

Soriano, A. P., Mamud, L. L., Kim, S.-H., Choi, Y. J., Jeong, C. D., Bae, G. S., . . . Lee, S. S. (2014). Effect of *Lactobacillus mucosae* on in vitro rumen fermentation characteristics of dried brewers grain, methane production and bacterial diversity. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(11), 1562.

Toscano, M., De Grandi, R., Pastorelli, L., Vecchi, M., & Drago, L. (2017). A consumer's guide for probiotics: 10 golden rules for a correct use. *Digestive and Liver Disease*, 49(11), 1177-1184.

Zimmermann, J., Berisvil, A., Romero-Scharpen, A., Fusari, M., Astesana, D., Blajman, J., . . . Soto, L. Inhibición in-vitro

de *Campylobacter coli* por bacterias ácido lácticas de origen porcino.

Zimmermann, J., Berisvil, A., Romero-Scharpen, A., Fusari, M., Astesana, D., Blajman, J., . . . Soto, L. (2016). Inhibición in-vitro de *Campylobacter coli* por bacterias ácido lácticas de origen porcino.
