



PRODUCCIÓN DE UN CULTIVO MICROBIANO PARA USO ANIMAL OBTENIDO POR FERMENTACIÓN VEGETAL

Mussín, Jonatan Efrén

*Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas FBCB-UNL
Instituto de Lactología Industrial
INLAIN-CONICET
Director/a: Burns, Patricia
Codirector/a: Vinderola, Gabriel*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Lactobacillus, Probióticos, Antibióticos

INTRODUCCIÓN

La adición, a gran escala, de antibióticos promotores del crecimiento (APC, o AGP del inglés *Antibiotic Growth Promoter*) a la alimentación animal ha contribuido al aumento de la producción ganadera. Sin embargo, el uso excesivo de AGP ha dado lugar a la aparición de microorganismos resistentes, con el potencial de transferir genes de resistencia a los antibióticos de la microbiota animal a la humana (Mingmongkolchai & Panbangred, 2018). Se vuelve imperativo, por lo tanto, encontrar soluciones alternativas y eficaces para reemplazar los antibióticos. Una estrategia que ha demostrado ser eficaz y segura para la salud animal y humana, es el uso de probióticos. Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, ejercen un efecto benéfico en la salud del hospedador (Hill *et al.*, 2014).

OBJETIVOS

- Obtener cepas autóctonas de lactobacilos para la producción de un alimento fermentado potencialmente probiótico para la industria animal (bovinos y porcinos).

Título del proyecto: PRODUCCIÓN DE UN CULTIVO MICROBIANO PARA USO ANIMAL
OBTENIDO POR FERMENTACIÓN VEGETAL

Instrumento: PICT

Año convocatorio: 2019

Organismo Financiador: CONICET

Director/a: Burns, Patricia Graciela



Federación
Universitaria
del Litoral

100



UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL LITORAL

METODOLOGÍA

Se recibieron en el INLAIN muestras refrigeradas (1 litro) de fermentaciones líquidas a base de trigo, maíz y arroz, elaboradas por la empresa Nutreza S.R.L. (Fig. 1). Las mismas correspondían a tiempo 0 y 48 h de fermentación espontánea. Se realizaron diluciones decimales de las mismas en agua de peptona (0,1% p/v) y se sembraron en superficie en agar MRS para el recuento y aislamiento de bacterias lácticas (BAL) (Vinderola & Reinheimer, 2000); y en agar HyL, para el recuento y aislamiento de levaduras. Las placas se incubaron a 37°C, durante 48 h en anaerobiosis (BAL) o a 25°C por 7 días en aerobiosis (mohos y levaduras).

Los aislamientos bacterianos no móviles, catalasa negativos, no esporulados, Gram (+), cocos o bacilos (BAL presuntivas), se purificaron por estriados sucesivos en agar MRS y se congelaron en caldo MRS (Biokar), adicionado de glicerol 20% (v/v) (Cicarelli) a -20°C y -70°C. La identificación preliminar de las BAL presuntivas aisladas se llevó a cabo mediante MALDI-TOF-MS, y la identidad de las cepas seleccionadas se confirmó mediante secuenciación parcial del gen de ARN ribosómico 16S (Edwards *et al.*, 1989). Los aislamientos obtenidos a partir de los diferentes sustratos (trigo, maíz y arroz) se denominaron XTix, donde X puede ser M (maíz), T (trigo) o A (arroz); T_i es el número de tratamiento o elaboración (1, 2 o 3) y x puede ser a, b, c, etc., lo que corresponde a sucesivos aislamientos diferentes dentro de una misma placa de medio de cultivo.

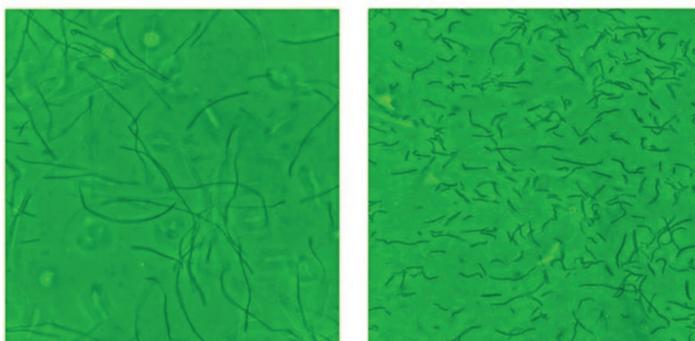


Figura 1: Imagen de microscopía óptica (1000x) de cultivos del género *Lactobacillus*, perteneciente a la colección de cultivos del INLAIN (CONICET-UNL, Santa Fe).

A partir de los aislamientos efectuados se generó un *stock* de cultivos de *Lactobacillus* y a dicha colección se le realizó un *screening* para determinar cuáles cepas presentan adecuada capacidad de desarrollo en el medio de fermentación líquido a base vegetal, preparado por la empresa Nutreza S.R.L. Con el fin de evaluar la cinética de fermentación (recuentos microbianos y capacidad de acidificación), se inoculó el medio vegetal desarrollado por la empresa con las tres cepas seleccionadas que mejor capacidad de desarrollo presentaron en el *screening*. Finalmente, se determinó el efecto protector de los inoculantes con potencial probiótico en estudios de sobrevida a la infección por *Salmonella* en modelo experimental murino. La mortalidad acumulada durante el período posterior a la infección se representó gráficamente frente al tiempo y los resultados se expresaron como supervivencia (%) a la infección (Fig. 2).

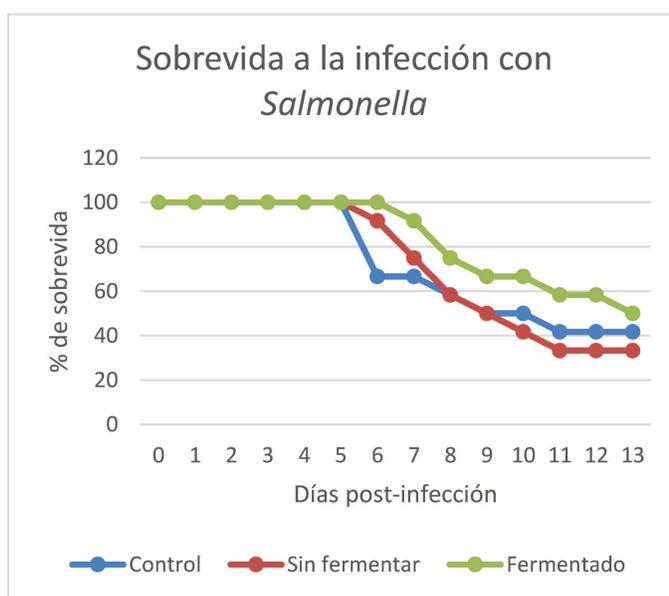


Figura 2: Sobrevida (%) de ratones BALB/c infectados con *Salmonella Typhimurium*; grupo control de agua de red (●); probiótico sin fermentar (●) y probiótico fermentado (●).

CONCLUSIONES

El presente trabajo se desarrolló en el marco del proyecto *Producción de aditivos probióticos para uso animal obtenidos de sustratos vegetales sometidos a fermentación controlada con microorganismos nativos*, PICT-2018-0043 de colaboración público-privada, a cargo del grupo de microbiología del INLAIN junto a la empresa Nutreza S.R.L. (Malabrigo, Santa Fe) y financiado por la Agencia Santafesina de Ciencia Tecnología e Innovación (Acta Nro. 11/18). Dicho trabajo tenía por objeto la mejora microbiológica de la tecnología desarrollada por la empresa santafesina, basada en la fermentación espontánea de una mezcla de sustratos vegetales, para nutrición animal. En función de ello, se lograron aislar un total de 13 cepas de bacterias lácticas, de las cuales se seleccionaron 3 por su capacidad de desarrollo en medios de cultivos vegetales en base a trigo, arroz y maíz. *L. plantarum* MT_{3b2} y TT_{3a2} y *L. paracasei* MT_{1d} fueron seleccionadas y demostraron su capacidad de dominar la fermentación del producto elaborado por la empresa. El producto fermentado por estas cepas demostró una tendencia a la protección contra la infección por *Salmonella* en un modelo murino, lo cual debería confirmarse en un estudio con mayor tamaño poblacional. Actualmente se están realizando estudios de eficacia en terneros y cerdos con el producto obtenido con las tres cepas seleccionadas para determinar su capacidad probiótica, y las cepas están siendo además actualmente utilizadas por la empresa para la estandarización del producto elaborado, habiéndose realizado en la empresa la transición de una fermentación espontánea, y por lo tanto variable, a una fermentación controlada y estandarizada por el uso de cepas autóctonas seleccionadas y caracterizadas en este trabajo de tesina.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., & Böttger, E.** (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. *Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA.*, 17: 7843-7853.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D., Pot, B. M., . . . Calder, P. &** (2014 Aug). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11(8):506-14.
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W.** (2018). Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1334–1346.
- Vinderola, C., & Reinheimer, J.** (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 10, 271-275.