

Titulo: PRODUCCION DE METABOLITOS PRODUCIDOS DURANTE EL
 CRECIMIENTO DE LACTOBACILLUS QUE INHIBEN E.
COLI ENTEROTOXIGENICO.
 AUTORES: DAMIAN, F.D Y ALVAREZ M. C.I
 INSTITUCION: COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
 AREA: SANIDAD ANIMAL.

INTRODUCCION

El sistema microbiológico que posee el intestino de los animales en general, juega un papel muy importante en el buen funcionamiento del aparato digestivo. Los lactobacilos son bacterias que constituyen cerca del 90% de la flora normal, el resto está integrado principalmente por Clostridium sp, Bacteroides, Enterococos, Fusobacterium sp, Eubacterium sp, Staphylococcus aureus, Proteus principalmente (Tannock y Smith, 1970). Estos organismos por un lado interactúan con otros y ayudan a una mejor digestión del alimento a través de sus enzimas, y por otro lado forman un importante antagonismo con las bacterias patógenas, impidiendo su colonización mediante competencia de nutrientes ó produciendo metabolitos (Acetatos, lactatos, propionatos, Ac. volátiles etc) así como de sustancias antibacterianas que dificultan su colonización o como en el caso de E. coli ent donde es bloqueada su actividad enterotoxigénica. Mitchell y Kenworthy, 1976; J.F WU, 1986; Sabine, 1963). En estudios realizados en cerdos recién nacidos, a las 2 horas se observa presencia de E. coli, mientras que la de Lactobacillus sp solo se detecta a las 18 horas lo que aumenta el riesgo de que la colonización inicial sea por un E. coli. Por lo tanto es de gran utilidad la administración de microorganismos benéficos tales como los lactobacilos a animales recién nacidos, que ayuden a prevenir el desarrollo y establecimiento de bacterias patógenas como E. coli. (Beck y Necheles, 1980, Collier y Hardy, 1986 y Muralidhara et al, 1977).

OBJETIVOS

1. Detectar la eficiencia de inhibición de Lactobacillus durante fase logarítmica y estacionaria para E. coli enterotoxigénico.
2. Relacionar la producción de metabolitos de 3 Lactobacillus sp con las diferentes fases de sus curvas de crecimiento.

MATERIAL Y METODOS

Cepas. Se emplearon tres cepas de Lactobacillus dos de origen comercial y una de origen porcino.
 Medios de cultivo. Los Lactobacillus fueron crecidos en Caldo Rogosa y el E. coli en Caldo Infusión Cerebro Corazón.
 Curva de crecimiento. Se tomó un cultivo bacteriano de Lactobacillus con una densidad óptica inicial de 0.1 y 0.2 a 550 nm de longitud de onda. Se fueron tomando lecturas

periódicas, y a su vez un conteo viable a las 0hrs, 24hrs, 48hrs, 72hrs, 96hrs, 144hrs y 180hrs.

Inhibición del crecimiento del *E. coli* ent. Se pusieron en contacto 4 ml de *Lactobacillus sp*, crecidos en leche, con 0.1ml de *E. coli* previamente estandarizados, dejándose en contacto 4 horas, al término de las cuales se llevó a cabo la cuantificación de los *E. coli* sobrevivientes a la acción del *Lactobacillus sp* comparándolo con el patrón.

RESULTADOS Y DISCUSION

El tiempo mínimo empleado y óptimo de incubación de los *Lactobacillus sp* lograron una buena inhibición de *E. coli* de 72 horas para la cepa 4c y SN1 y de 180 hrs para la cepa 9, indicando con esto que no todas las cepas tienen el mismo comportamiento in vitro. (Ver Cuadro 1) aunque la mayor actividad microbiana de *E. coli* es bastante aceptable con 24 horas de incubación de estos *Lactobacillus sp*. Con propósitos prácticos para realizarlo a nivel de granja, se podría utilizar leche previamente hervida por 20 a 30 minutos adicionando luego una suspensión concentrada de

Lactobacillus (1×10^9) en una proporción del 10% e incubarlo en el piloto de la estufa por 24 horas, manejándolo en las condiciones más asépticas posibles, para impedir la contaminación con gérmenes indeseables. Con la finalidad de acortar tiempos de incubación, se realizó un ensayo preliminar de la actividad inhibitoria de *E. coli*, incubando la mezcla a 40 C por 8 horas (ver cuadro 2), encontrándose ligeramente inferior a la temperatura de 24 y 72 horas.

Al analizar las curvas de crecimiento se observa (ver cuadros 3, 4 y 5) se observa que aunque el número de células vivas disminuyendo con el tiempo, su densidad óptica va aumentando así como su capacidad de inhibición (ver cuadro 1), parece que en esta fase estacionaria la bacteria estuviera eliminando mayor cantidad de metabolitos inhibitorios del crecimiento del *E. coli*.

BIBLIOGRAFIA

Beck, C and H. Necheles. (1980). Beneficial effects of administration of *Lactobacillus acidophilus* in diarrhea and other intestinal disorders. *Am. J. Gastroenterol* 35:522-530

Collier, B and B. Hardy. (1986). The use of enzymes in pig and poultry feeds. Part I Feed Compounder. March 14.

Mitchell I. and R. Kenworthy. (1976). Investigations on a metabolite from *Lactobacillus bulgaricus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *E. coli* pathogenic for pigs. *J. Appl. Bacteriol* 41: 163-164

Muraldihara, K.S;G.G Sheffeby,P.R., Elliker,D.C England and W.E Sandine. (1977). Effect of feeding lactobacilli on the coliform and Lactobacillus flora of intestinal tissues and feces from pigs. J. of Food Protection 40:228

Sabine,D.B.(1963). An antibiotic like effect of Lactobacillus acidophilus. Nature. 199:811

Tannock, G.W. and T.M. Smith(1970). The microflora of the pig stomach and its possible relationship to ulceration of the parts esophaga. J.Comp. Path. 80: 267-359.

Wu,J.F. (1986). The microbial function in developing action specific microorganisms. Alltec Second Annual Biothecnology Symposium. Lexington Ky April.

Cuadro 1. Porcentaje de inhibicion del crecimiento del E. coli por Lactobacillus cultivados en fase logaritmica y estacionaria.

Cepa	Tiempo			
	24 Hrs	72 Hrs	90 Hrs	180 Hrs
4 c	98.38	99.7	96.6	99.4
SW1	91.9	99.3	96.8	99.3
9	97.86	94.04	98.93	99.66

Cuadro 2. Comparacion de la inhibicion del E. coli por los Lactobacillus crecidos en leche a diferentes tiempos y temperaturas.

Cepas	Tiempo y temperatura		
	24 Hrs (37 °C)	72 Hrs (37 °C)	8 Hrs (40 °C)
4 c	98.38 %	99.7 %	97.14 %
SW1	91.9 %	99.3 %	94.2 %
9	97.86 %	94.04 %	96.53 %

cuadro 3

4

Relacion de crecimiento del *Lactobacillus* 4c con su densidad optica.

t Hrs	D.O	# celulas x 10 ⁵
0	0.02	3.61
24	0.18	966.50
48	0.635	1650.00
96	0.78	817.50
146	0.84	182.00

cuadro 4

Relacion de crecimiento del *Lactobacillus* sp 9 con su densidad optica.

t Hrs	D.O	# celulas x 10 ⁵
0	0.15	20
24	0.17	800
48	0.28	997
72	0.32	989
96	0.39	710

Cuadro 5. Relacion de crecimiento del *Lactobacillus* SNI con su densidad optica.

t hrs	D.O	# celulas x ml
0	0.01	123
24	0.14	698
48	0.29	900
72	0.35	830
96	0.37	665
144	0.41	500