

Acción antibiótica de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas del tracto digestivo del lechón (*Sus scrofa domesticus*)

Antibiotic action of lactic acid bacteria (LAB) isolated from the digestive tract of the piglet (*Sus scrofa domesticus*)

Héctor Sánchez S.¹; Gloria Ochoa M.²

Resumen

Los animales van adquiriendo bacteria benéfica que se establecen y permanecen durante las diferentes etapas de su vida, estas ejercen acciones antimicrobianas, formando la flora natural del animal. Con el objeto de estudiar y medir la acción benéfica de estas bacterias del tracto digestivo del lechones (*Sus scrofa domesticus*), se aislaron, identificaron y caracterizaron 9 bacterias cultivables a las cuales se midió su acción bactericida para el control de patógenos del tracto digestivo del lechón, se realizaron pruebas de antagonismo directa, pruebas de pocillo con extracto bacteriano ácido y neutros, como respuesta se presentaron halos de inhibición, las bacterias ácido lácticas (BAL) fueron extraídas del tracto digestivo de dos lechones provenientes del estómago, duodeno, yeyuno e íleon del intestino delgado y además del ciego, colon y recto, para la acción BAL se descartaron bioquímicamente, a 9 de ellas se realizó pruebas de antagonismos enfrentándolas a patógenos del lechón *Escherichia* y *Shiguela*, los halos de inhibición determinan la susceptibilidad contra los patógenos, encontrándose el mayor efecto con el extracto bacteriano sin neutralizar y la BAL 07 como la mejor, a las cuales se le puede denominar como BAL con capacidad antimicrobiana.

Palabras clave: bacterias; ácido lácticas; lechones; microbiología molecular; BAL.

Abstract

The animals are acquiring beneficial bacteria that are established and remain during the different stages of their life, these exert antimicrobial actions, forming the natural flora of the animal. In order to study and measure the beneficial action of these bacteria of the digestive tract of the piglets (*Sus scrofa domesticus*), 9 cultivable bacteria were isolated, identified and characterized, which were measured bactericidal action for the control of pathogens of the digestive tract of the Piglet, Tests of direct antagonism, well tests with bacterial acid extract and neutrals were carried out, in response there were inhibition halos, lactic acid bacteria (LAB) were extracted from the digestive tract of two piglets from the stomach, duodenum, jejunum and ileum of the small intestine and in addition to the blind, colon and rectum, for LAB action were discarded biochemically, to 9 of them were tested for antagonism against pathogens of the piglet *Escherichia* and *Shiguela*, the inhibition halos determine the susceptibility against the pathogens, being the greatest effect with the bacterial extract without neutralizing and the LAB 07 as the best, which can be called as LAB with antimicrobial capacity.

Key words: lactic acid; piglets; molecular microbiology; LAB.

1 Departamento Académico de Sanidad Vegetal y Producción Pecuaria; Universidad Nacional de Tumbes.
2 Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

* Autor correspondiente: hsanchezs@untumbes.edu.pe. (H. Sánchez)

Introducción

En cría de cerdos intensiva donde la demanda de carne como fuente proteica es cada vez mayor, la crianza de lechones, es la fase crítica en el proceso de producción ya que determina la viabilidad de la misma, en esta edad es muy frecuente la presencia de cuadros diarreicos al momento del destete para lo cual se empleando antibióticos y otros compuestos sintéticos como promotores de crecimiento, que aumentan los costos de producción y los riesgos ambientales de su uso (Cadillo, 2008).

La retirada de los antibióticos como promotores de crecimiento en la UE desde enero de 2006, ha creado la necesidad de avanzar en la búsqueda de otros aditivos

nutricionales no antibióticos (Metzler 2006). Debido a esto, se ha estudiado la influencia de diversos microorganismos, en especial de bacteria nativas del género *Lactobacillus*, sobre la eficiencia productiva del lechón (Cueto-Vigil *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012).

A fin de solucionar la problemática formulada, se planteó la hipótesis de encontrar *Lactobacilos* con capacidad probiótica en el tracto digestivo del lechón *Sus escrofa domesticus*.

En este contexto los objetivos de la investigación fueron: evaluar el efecto de las bacterias BAL del lechón frente a patógenos del tracto digestivo del lecho.

Materiales y Método

Se extrajeron las BAL de dos lechones de traspatio sanos de siete días pos destete y alimentados con alimento comercial sin antibióticos, y las Bacterias Patógenas de cerdos con síntomas de diarrea, donde se obtuvieron las muestras. El muestreo se realizó mediante hisopado de diferentes regiones del tracto digestivo del lechón, estómago anterior y posterior, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon (animales sanos).

Fase de laboratorio. Las muestras obtenidas en campo fueron llevadas al laboratorio de Biología molecular de la facultad del departamento de biología en la UNT, para su procesamiento, análisis correspondiente y posterior envío a secuenciar:

Métodos: Bacterias Nativas, se aislaron bacterias nativas, se seleccionó un lechón de crianza de 42 días de edad y una semana pos destetado, alimentado con dieta base sin antibiótico, (lechón 2) y se seleccionó un lechón de 39 días de edad de una semana pos destetado de edad alimentados con una dieta sin antibióticos (lechón 1), obteniendo del estómago (06 EE y 06 E), Duodeno (02 D), Yeyuno (05 Y), Ilion (04 I) ciego (06 C) y colon (6 Co). Y del lechón 02, 39 muestras (03 EE y 03 E), Duodeno (04 D),

Yeyuno (07 Y), Ilion (06 I) ciego (03 C) y colon (10 Co).

Microbiología. Aislamiento de cepas patógenas

Las muestras se obtuvieron de la parte final del tracto digestivo del lechón con síntomas de diarrea, fueron transportadas en tubos falcón de 50 ml conteniendo como medio líquido caldo Brain Heart Infusión (BHI) Agar medio para bacterias *Escherichia* y *Shigella* a temperatura ambiente.

Medio específico para encontrar *Escherichia* (agar Eosina azul de metileno) y para *Salmonella* y/o *Shigella* (Agar *Salmonella Shigella*).

Los sobrenadantes obtenidos en los tubos Falcón que contenían las muestras, fueron utilizados como soluciones madre para realizar diluciones decimales, las cuales fueron depositadas en tubos Eppendorf.

Paralelamente se agregaron los medios de cultivo en placas Petri, se sembraron por estría agar McConkey (recomendada para bacterias Gram negativas) y con la ayuda de un esparcidor metálico autoclavado se extendió por toda la placa.

Las placas fueron dejadas a temperatura entre 37 °C a 40 °C por un período de

tiempo de 24 horas, para el desarrollo de microorganismos. Luego se realizaron diluciones seriadas hasta 20^{-2} y fueron sembradas posteriormente por superficie en placas de Petri con agar Mueller Hinton (recomendados para pruebas de sensibilidad). Se realizaron purificaciones consecutivas hasta obtención de bacterias purificadas (Figura 1).

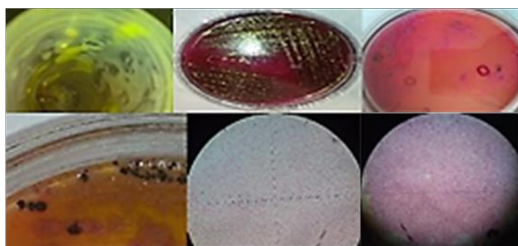


Figura 1. Procedimiento de extracción de bacterias patógenas a). Muestra excretas, b) Colonias verde plateadas agar para *Escherichia*, c) y d) Colonias rosado y negro medio *Salmonella Shigella*, e) y f) Bacterias Gram Negativo.

Microbiología. Pruebas de inhibición bacteriana. Para la selección de bacterias con propiedades antibacterianas, se utilizó el método de inhibición, según Ramírez (2009), enfrentándose directamente a discos de agar MRS (6 mm de diámetro) impregnado con la bacteria ácido láctica (BAL) después de 48 horas de incubación con las cepas bacterianas patógenas aisladas del tracto digestivo del lechón, sembradas por extensión en placas de agar Mueller Hinton.

La producción de halos de inhibición (zonas claras alrededor del disco), demostraron la actividad antibacteriana de las cepas aisladas, se tomaron datos de la medida de los diámetros de los halos de inhibición. Para descartar el efecto inhibitorio por competición de nutrientes entre la bacteria patógena y la BAL, se realizó una prueba final utilizando el método de difusión en pocillo (Chythanya *et al.*, 2002), en el cual se perforaron hoyos de 6 mm en placas con agar Mueller Hinton previamente sembrado por superficie con bacterias patógenas aisladas del tracto intestinal de cerdos.

Se analizaron dos tratamientos, extracto

de cultivo líquido de BAL (48 horas de cultivo) libre de bacterias (por centrifugación a 10 000 g por 15 min), neutralizado con NaOH 5 M y otro sin neutralizar. A cada pocillo preparado se agregó 50 μ l de cada uno de los extractos y se procedió a incubar por 24 horas a 40 °C. Esto permitió evaluar si el efecto inhibitorio es producido por algún tipo de bacteriocinas u otro producto diferente a los ácidos orgánicos (Figura 2).



Figura 2. Preparación de pruebas de antagonismo, a). Extracción de discos de agar, b). Agar MH para patógeno, c). Discos bacterianos directos d). Extracto bacteriano, e). Neutralización del extracto bacteriano, f). Pocillo para extracto bacteriano.

Se realizó la extracción de ADN de BAL y patógenas por métodos convencional

Identificación molecular mediante secuenciación del gen 16S ARNr.

Las extracciones de ADN se realizarán utilizando el método estándar CTAB-DTAB (Gustincich *et al.*, 1991), adaptado para células bacterianas según Dulanto (2013).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para amplificar la región 16S ARNr, se utilizarán los cebadores universales 8F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1510R (5' GGC TAC CTT GTT ACG A 3')

descritos por Weisburg para estudios filogenéticos bacterianos (Monsalud, y otros, 2003).

Secuenciación. Para la secuenciación se utilizará 10 μ l de los productos obtenidos por amplificación en la PCR, y serán colocados en microtubos de 0,2 mL. Además, se prepararán en microtubos de 0,2 mL porciones de 5 μ l de cada

cebador universales para el gen 16S ARNr. Estas serán empacadas y enviadas a la empresa MacroGen de Korea, para realizar la secuenciación de las 2 cadenas de cada producto amplificado.

Procesamiento y análisis de datos

Obtenidas las secuencias de ADN de cada producto amplificado, éstas serán alineadas con el software libre MEGA 7 y comparadas posteriormente con las secuencias de 16S ARNr que se encuentra en la base de datos de acceso

público del GenBank mediante el software libre BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

La unidad experimental fue un animal. Los datos fueron registrados en una hoja electrónica y los datos procesados con el programa estadístico Excel; determinándose la prueba de análisis de varianza, y luego la prueba de significancia Duncan. Los datos se analizaron a un nivel de significación $\alpha = 0,05$ y pruebas de correlación (Alvitres, 2000).

Resultados y Discusión

Aislamiento de las bacterias cultivables BAL asociadas al tracto digestivo de lechón, mediante pruebas microbiológicas. Se recogieron 35 y 39 muestras de lactobacilos según medio específico, de dos lechones 1 y 2, de los cuales se obtuvieron 9 y 15 bacterias BAL por caracterizadas bioquímicamente y de ellas 07 y 02 presentaron características

probióticas (Tabla 1 y 2). Ocho de las Nueve cepas molecularmente identificadas fueron *Lactobacillus Fermentus* y la otra corresponde a *Lactococcus lactis*, con variaciones en su la identidad de sus cepas, clasificadas dentro del orden *Lactobacillales*, las que también son denominadas bacterias ácido lácticas (Tabla 1, Figura 3).

Tabla 1. Identificación molecular mediante el gen 16S ARNr de cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de lechón

Código	Porción del tracto intestinal	Tamaño de la secuencia (pb)	Especie identificada	Porcentaje de identidad	N° de accesoión
2 EE52	Estómago	1503		99	
4 433	Estómago	1507	<i>Lactobacillus</i>	99	AP008937.1
6EE52	Estómago	1499	<i>fermentum</i> IFO 3956	99	
991215	Estómago	1503		99	
1111.1	Estómago yeyuno	1494		99	
101014	yeyuno yeyuno	2110		99	
141418		2138	<i>Lactobacillus</i>	99	NR113335.1
881114		1932	<i>fermentum</i> NBRC	99	
771012	ileon	2461	<i>Lactococcus lactis</i>	94	KT159935.1

Para obtener mayor información sobre la referencia ingrese al siguiente enlace:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> y digite el código de accesoión de cada bacteria cultivable.

Tabla 2. Identificación molecular mediante el gen 16S ARNr de cepas bacterianas patógenas aisladas del de excretas del lechón

Código	Porción del tracto intestinal	Tamaño de la secuencia (pb)	Especie identificada	Porcentaje de identidad	N° de accesoión
Patog 01	excretas	1473	<i>Escherichia fergusonii strain ATCC35469</i>	99	NR_07 4902.1
Patog 02	excretas	1471	<i>Shigella sonnei strain CECT 4887</i>	99	NR_10 4826.1

Para obtener mayor información sobre la referencia digite el código de accesoión de cada bacteria cultivable en el siguiente enlace: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

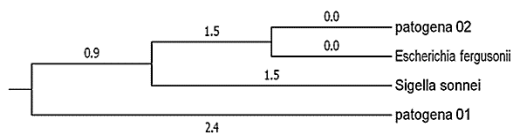


Figura 3. Árbol filogenético mostrando las relaciones de las bacterias patógenas aisladas del tracto digestivo del lechón.

Identificación molecular de las bacterias Patógenas

Los resultados de la identificación de las cepas purificadas por el gen 16S ARNr, de excretas de lechones, mediante programa de bioinformática MEGA 6 y Blast fueron: para las cepas *Escherichia fergusonii* strain ATCC 35469 y *Shigella sonnei* strain CECT 4887 16S, aislado de excretas con síntomas de diarrea con una identidad de 99% y cobertura de 99% de la secuencia nucleotídica y parcial con una identidad de 90% y cobertura de 100% de la secuencia nucleotídica. Dos cepas molecularmente identificadas fueron *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*, con variaciones en su la identidad de sus cepas, clasificadas dentro del orden Enterobacterales, las que también son denominadas bacterias fecales (Tabla 2, Figura 4).

Actividad antibiótica de las bacterias

En la Tabla 3 y 4 se presenta la acción antibiótica según el halo de inhibición y el porcentaje de incremento de estos halos. De las nueve bacterias aisladas e identificadas inicialmente (BAL 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 14), semejantes a *Lactobacillus fermentum* y *Lactococcus lactis*, se enfrentaron a dos bacterias patógenas: *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*; en tres métodos: directo, usando extracto bacteriano sin neutralizar y utilizando extracto bacteriano neutralizado. Se puede observar que existe mayor inhibición de las BAL frente al *Escherichia fergusonii*, por lo tanto, es el patógeno con mayor susceptibilidad a la acción antibiótica de las BAL, observando halos de diferentes tamaños. Los mayores halos obtenidos corresponden al método del extracto bacteriano sin neutralizar, que indicaría mayor carga de la sustancia antibiótica, produciendo el efecto más acentuado y halos más grandes como se encontró para la BAL 7 y la BAL 1. Notando que en el enfrentamiento por el método directo los valores de los halos están presentes, pero son menores.

Tabla 3. Acción antibiótica de cepas bacterianas BAL aisladas del tracto digestivo del lechón frente a cepas patógenas

CLAVE	Bacteria	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469 <i>Shigella sonnei</i> strain CECT 4887					
		Directa	Sin Neutralizar	Neutralizado	Directa	Sin Neutralizar	Neutralizado
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	+++		+	-	-	-
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	+	+	+	-	-	+
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	+	++	+	-	-	-
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	+	++	+	+	+	-
BAL 7	<i>Lactococcus lactis</i>	+++		++	-	-	-
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	++	++	+	-	-	-
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	+	+	+	+	+	+
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	+	+	+	+	+	+
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	+	+	+	-	+	+

+++ alta inhibicion ++ mediana inhibicion + baja inhibicion
- sin inhibicion

Tabla 4. Porcentaje del incremento de halos de inhibición de cepas bacterianas BAL aisladas del tracto digestivo del lechón frente a cepas patógenas

Clave	Bacteria	<i>Escherichia fergusonii</i> strain ATCC 35469			<i>Shigella sonnei</i> strain CECT 4887		
		Directa	Sin Neutralizar	Neutralizado	Directa	Sin Neutralizar	Neutralizado
BAL 1	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	30,16	87,25	36,69	0,00	0,00	0,00
BAL 2	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	12,96	30,49	27,01	0,00	3,33	13,33
BAL 4	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	19,06	76,28	30,24	0,00	0,00	0,00
BAL 6	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	21,76	60,81	26,43	10	13,33	0,00
BAL 7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	6,02	99,84	54,96	0,00	0,00	0,00
BAL 8	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	35,67	52,24	35,51	0,00	0,00	0,00
BAL 9	<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	19,98	42,56	20,01	16,67	26,67	16,67
BAL 10	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	11,34	38,83	40,28	6,67	20,00	20,00
BAL 14	<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC 15885	19,91	31,25	19,86	0,00	10,00	10,00

Valores Porcentuales del incremento del halo de inhibición.

Para el efecto de inhibición de los extractos sin neutralizar, el cual se expresa para todas las BAL frente a la *Escherichia fergusonii* y poco en algunos de las BAL frente a la *Shigella sonnei* se debe considerar que, al momento de neutralizar el efecto ácido del extracto bacteriano, estamos condicionando la acción antibiótica que producen los ácidos orgánicos por lo cual nos quedaría el extracto con alguna otra sustancia como el ácido láctico que produce el efecto antibiótico.

Procesamiento de datos de la actividad Antibiótica de las bacterias

Evaluación de los métodos de enfrentamiento de las BAL frente a la *Escherichia fergusonii*. Inicialmente se evaluó la eficiencia de los métodos utilizados en las pruebas de antagonismo, para evaluar los halos de inhi-

bición según los métodos utilizados, los cuales fueron: enfrentamiento directo, usando extracto bacteriano sin neutralizar y el otro con extracto bacteriano neutralizado, en función a los diámetros en mm de los halos obtenidos. En la tabla 5, 6 y figura 4 se observó que al ser enfrentadas las BAL (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 14) contra la bacteria patógena *Escherichia fergusonii*, la comparación entre los métodos es altamente significativa según el ANVA a nivel de significancia $f = 0,01$.

En la prueba Duncan $\alpha=0,05$, indica que existe diferencia entre los métodos lo cual indica para nuestro caso que son independientes entre sí. Tanto el ANVA y prueba Duncan, indican que los halos de inhibición obtenidos en los tres métodos de inhibición, se comportan independientes entre sí, cuando se enfrentan las BAL con la *Escherichia fergusonii*.

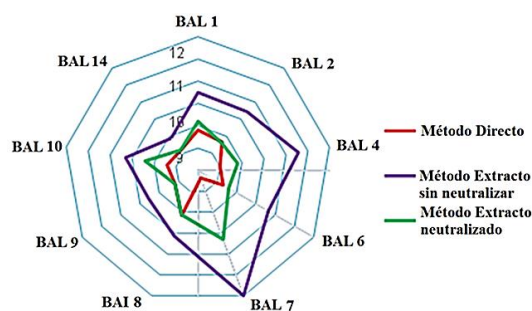
Tabla 5. Identificación molecular mediante el gen 16S ARNr de cepas bacterianas patógenas aisladas del tracto digestivo de lechón

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	F1%	Significancia
Entre grupos	23,667	2	11,834	17,041	0,000	3,403	5,95	**
Dentro de los grupos	16,666	24	0,694					
Total	40,333	26						

**Alta significancia

Tabla 6. Prueba Duncan $\alpha=0,05$ de la acción bacteriana de los métodos de inhibición de las BAL frente a *Escherichia fergusonii* en función al diámetro de los halos (mm)

Código	Promedio halos de inhibición (mm)	Significancia
Método extracto sin neutralizar	9,56	a
Método extracto neutralizado	7,94	b
Método Directo	7,34	C

**Figura 4.** Comparación del diámetro (mm) de los halos de inhibición, de los métodos en el enfrentamiento de BAL frente a *Escherichia fergusonii*.

En la tabla 6 se comparan los métodos de inhibición frente a la *Escherichia fergusonii* donde se puede apreciar que las letras son diferentes entre los métodos lo que indica que éstos se comportan independientemente entre sí, donde el método que utilizó el extracto sin neutralizar fue el que produjo los mayores halos de inhibición en promedio 9,56 mm, seguido del extracto neutralizado en promedio 7,94 mm y por último el método directo con 7,36 mm de promedio.

La Figura 4 representa la comparación de los métodos de inhibición, donde cada color es un método, el más externo es el de mayor halo de inhibición siendo el

color naranja el mejor, método que utilizó el extracto sin neutralizar, donde sobresale la BAL 7.

Evaluación de los métodos de enfrentamiento de las BAL frente a la *Shigella sonnei*

En la tabla 7, 8 y figura 5, se observa que al ser enfrentadas las BAL (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 14) con la bacteria patógena *Shigella sonnei*, en la comparación de los métodos, no hay significancia entre ellos según, indica que los métodos empleados para este caso tienen un comportamiento semejante, debido a que los valores de los halos obtenidos son muy bajos o no producen halo. Tanto el ANVA y prueba Duncan, indican que los halos de inhibición obtenidos en los tres métodos de inhibición, enfrentamiento directo, usando extracto bacteriano sin neutralizar y el otro con extracto bacteriano neutralizado, se comportan semejantes entre sí, cuando se enfrentan las BAL con la *Shigella sonnei*. En la tabla 7 se puede apreciar que estos se comportan independientemente entre sí, el método que utilizó el extracto sin neutralizar fue el que produjo algunos halos, siendo el promedio 6,44 mm, seguido del extracto neutralizar en promedio 6.4 mm y por último el método directo con 6,18 mm en promedio. La Figura 5 también representa la comparación de los métodos de inhibición frente a la *Shigella sonnei*, donde los colores representan los tratamientos, dando un ligero margen para el color naranja donde predomina la BAL 9 (método con extracto bacteriano sin neutralizar), seguido del color verde (extracto bacteriano neutralizado) donde sobresale la BAL 10.

Tabla 7. Análisis de varianza de la acción bacteriana de los métodos de inhibición de las BAL frente a *Shigella sonnei* según diámetro en mm de los halos de inhibición

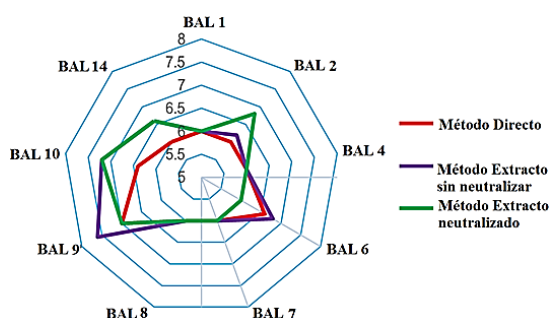
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	F1%	Significancia
Entre grupos	0,6422	2	0,231	0,930	0,408	3,403	5,95	NS
Dentro de los grupos	5,9644	24	0,249					
Total	6,4267	26						

NS: No hay significancia.

Tabla 8. Prueba Duncan $\alpha=0,05$ de la acción bacteriana de los métodos de inhibición de las BAL frente a *Shigella sonnei* en función al diámetro de los halos (mm)

Código	Promedio halos de inhibición (mm)	Significancia
Método extracto sin neutralizar	6,44	abc
Método extracto neutralizado	6,4	abc
Método Directo	6,18	abc

abc valores estadística semejantes entre ellas.

**Figura 5.** Comparación del diámetro (mm) de los halos de inhibición, de los métodos en el enfrentamiento de BAL frente a *Shigella sonnei*.**Evaluación comparativa de BAL frente a la *Escherichia fergusonii* para cada método de enfrentamiento**

Halos de inhibición de BAL frente a la *Escherichia fergusonii* para método directo. Según prueba Duncan (tabla 9), se presentan la comparación de los diámetro de los halos de inhibición (mm) del enfrentamiento de las BAL con *Escherichia fergusonii* mediante el método directo, la cual nos permite comparar independientemente la acción bactericida de cada una de las BAL para el efecto antibiótico, se puede apreciar que para este método los halos producidos por todas las BAL son estadísticamente semejantes entre sí, excepto la BAL 7 (color azul) que tiene el menor halo con un promedio de 6,361 mm y se diferencia con las de mayor diámetro de halo producido por BAL 8 con promedio de 8,140 mm (color rojo), BAL 1 con 7,81 mm (color amarillo) y BAL 2 con 7,67 mm (color verde) las cuales tienen mayor efecto antibiótico.

Tabla 9. Prueba Duncan $\alpha=0,05$ del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción antagonica de las BAL frente a *Escherichia fergusonii* por el método directo

Orden	Código	Promedio halos de inhibición (mm)	Significancia
1	BAL 8	8,140	a
2	BAL 1	7,810	a b
3	BAL 2	7,667	a b c
4	BAL 10	7,403	a b c d
5	BAL 6	7,306	a b c d e
6	BAL 9	7,199	a b c d e f
7	BAL 14	7,194	a b c d e f g
8	BAL 4	7,011	a b c d e f g h
9	BAL 7	6,361	a b c d e f g h i

abcdefgh valores con semejanza estadística entre ellas (BAL 8, 1, 2, 10, 6, 9, 14 y 4).

defghi valores con semejanza estadística entre ellas (BAL 10, 6, 9, 14, 4 y 7).

i valores con diferencia estadística (BAL 7 con BAL 8,1 y 2).

Halos de inhibición de BAL frente a la *Escherichia fergusonii* para cada método con extracto bacteriano sin neutralizar

En la tabla 10 se aprecia una marcada diferencia del diámetro promedio del halo de inhibición producido por la BAL 7 el cual es de 11,99 mm, el cual es estadísticamente diferente con el resto de las BALs pero semejante a la BAL 4 de 10,577 mm de diámetro, cuando se enfrenta a la *Escherichia fergusonii* en extracto bacteriano sin neutralizar,

también se puede apreciar un grupo de BALs que producen un halo estadísticamente representativo y que son semejantes entre sí que corresponde a las BAL 6 de 9,649 mm de diámetro, BAL 1 de 9,504 mm, BAL 2 de 9,438 mm, BAL 10 de 9,313 mm, BAL 8 de 9,135 mm y BAL 9 de 8,554 mm de diámetro.

Existen dos BAL la 9 con 8,554 mm semejante a la menor la BAL 14 con 7,875 mm de diámetro representado en la figura 14 de color morado, con el menor promedio de halo.

Tabla 10. Prueba Duncan al $\alpha=0,05$ del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las BAL frente a *Escherichia fergusonii* por el método extracto bacteriano sin neutralizar

Orden	Código	Promedio halos de inhibición (mm)	Significancia
1	BAL 7	11,990	a
2	BAL 4	10,577	b
3	BAL 6	9,649	b c
4	BAL 1	9,504	b c d
5	BAL 2	9,438	c d e
6	BAL 10	9,313	c d e f
7	BAL 8	9,135	c d e f g
8	BAL 9	8,554	c d e f g h
9	BAL 14	7,875	h i

^a valores con diferencia estadística entre (BAL 7 con BAL 4, 6, 1, 2, 10, 8, 9 y 14); ^b valores con diferencia estadística entre (BAL 4 con BAL 2, 10, 8, 9 y 14); ^{cdefgh} valores con semejanza estadística entre ellas (BAL 6, 1, 2, 10, 8 y 9); ^{hi} valores con diferencia estadística entre ellas (BAL 9 y 14 con BAL 7, 4, 6, 1, 2, 10 y 8)

Halos de inhibición de BALs frente a la *Escherichia fergusonii* para método con extracto bacteriano neutralizado

Para el caso del enfrentamiento de las BAL con *Escherichia fergusonii* por el método con extracto bacteriano neutralizado, se observa el parecido comportamiento con los obtenidos por extracto sin neutralizar (Tabla 11), pero son de menor tamaño, los halos de las

BAL también sobresale con diferencia estadística la BAL 7 el cual es de 9,289 mm, diferenciándose del resto de BAL, las cuales son un grupo que produce halos semejantes estadística-mente entre sí, donde encontramos la BAL 1 de 8,201 mm, BAL 8 de 8,130 mm, BAL 4 de 7,815 mm, BAL 2 de 7,621 mm, BAL 6 de 7,586 mm, BAL 9 de 7,201 mm y BAL 14 de 7,192 mm de diámetro.

Tabla 11. Prueba Duncan al $\alpha=0,05$ del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las BAL frente a *Escherichia fergusonii* por el método extracto bacteriano neutralizado

Orden	Código	Promedio halos de inhibición (mm)	Significancia
1	BAL 7	9,298	a
2	BAL 10	8,417	b
3	BAL 1	8,201	b c
4	BAL 8	8,130	b c d
5	BAL 4	7,815	b c d e
6	BAL 2	7,621	b c d e f
7	BAL 6	7,586	b c d e f g
8	BAL 9	7,201	c d e f g h
9	BAL 14	7,192	c d e f g h i

^a valores con diferencia estadística entre (BAL 7 con BAL 10, 1, 8, 4, 2, 6, 9 y 14); ^{bcddefgh} valores con semejanza estadística entre (BAL 10, 1, 8, 4, 2 y 6); ^{cdefghi} valores con semejanza estadística entre (BAL 1, 8, 4, 2, 6, 9 y 14).

Evaluación comparativa de BALs frente a la *Shigella sonnei* para cada método de enfrentamiento

Para el enfrentamiento de las BALs con *Shigella sonnei* los halos son más pequeños comparados con *Escherichia* e incluso algunas no lo producen; la BAL 9 y BAL 10 son las que generan siempre halo en los tres métodos, sobresaliendo siempre la BAL 9 sobre el resto (Tabla 12). Podemos observar que las BALs 1, 4, 7 y 8 no generan ningún halo en el enfrentamiento con *Shigella sonnei*, en cualquiera de los tres métodos empleados. Se muestra los halos de inhibición para el enfrentamiento de las BAL con la *Shigella sonnei* mediante el método directo, la BAL 9 con promedio de halo 7 mm estadísticamente supera a la Bal 6 de halo 6,60 mm y Bal 10 de halo 6,40 mm y estas dos producen halos semejantes entre sí. También podemos apreciar que en el enfrentamiento de las BAL 2, 14, 1, 4, 7 y 8 no presentaron algún halo frente a *Shigella sonnei* cuando se enfrentaron en el método directo.

Para la comparación de los halos de inhibición de las BAL frente a la *Shigella sonnei* por el método del extracto bacteriano sin neutralizar (Tabla 13) se muestra que una diferencia de los otros dos métodos es donde se produce halo de 5 de la nueve BALs experimentales, en la cual podemos observar que la BAL 7 sigue siendo la de mayor halo de inhibición estadísticamente diferente a todas las demás, con 7,2 mm de diámetro de promedio, continua en tamaño de halo de la BAL 10 con 6,8 mm de diámetro de promedio tiene también con diferencia estadística frente a las demás. Los tres restantes corresponden a la BAL 6 promedio de halo de 6,47 mm, la BAL 10 del halo 6,47 mm y la BAL 2 con halo de 6,40 mm las cuales estadísticamente los halos son iguales entre sí. También podemos apreciar que en el enfrentamiento de las BAL 1, 4, 7 y 8 no presentaron algún halo frente a *Shigella sonnei* cuando se enfrentaron en el método extracto bacteriano sin neutralizar.

Tabla 12. Prueba Duncan al $\alpha=0.05$ del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las BAL frente a *Shigella sonnei* por el método directo

Orden	Código	Promedio halos de inhibición (mm)	Significancia
1	BAL 9	7,00	a
2	BAL 6	6,60	b
3	BAL 10	6,40	b c
4	BAL 2	6,00	d
5	BAL 14	6,00	d e
6	BAL 1	6,00	d e f
7	BAL 4	6,00	d e f g
8	BAL 7	6,00	d e f g h
9	BAL 8	6,00	d e f g h i

^a valores con diferencia estadística entre ellas (BAL 9 con BAL 6,10, 2, 14, 1, 4, 7, y 8); ^{bc} valores con semejanza estadística entre ellas (BAL 6 con 10 diferencias BAL 2, 14, 1,4, 7, y 8); ^{defghi} valores con semejanza estadística entre ellas (BAL 2, 14, 1, 4, 7, y 8).

Tabla 13. Prueba Duncan al $\alpha=0,05$ del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las BAL frente a *Shigella sonnei* por el método extracto bacteriano sin neutralizar

Orden	Código	Promedio halos de inhibición (mm)	Significancia
1	BAL 9	7,20	a
2	BAL 10	6,80	b
3	BAL 6	6,47	c
4	BAL 14	6,40	c d
5	BAL 2	6,33	c d e
6	BAL 1	6,00	f
7	BAL 4	6,00	f g
8	BAL 7	6,00	f g h
9	BAL 8	6,00	f g h i

^a valores con diferencia estadística entre ellas (BAL 9 con BAL 10, 6,14, 2); ^b valores con diferencia estadística entre ellas (BAL 10 con BAL 6,14, 2.); ^{cde} valores con semejanza estadística entre ellas (BAL 6, 14 y 2); ^{fghi} valores con semejanza estadística entre ellas (BAL 1, 4, 7 y 8).

En el enfrentamiento de las BALs con la *Shigella sonnei* por el método con extracto bacteriano neutralizado (tabla 14) se puede observar que son también pequeños los halos de inhibición generados por las BAL se aprecian una semejanza estadística entre la BAL 10 con halo de 7,20 mm y la BAL 9 con halo de 7,00 mm, donde esta última BAL es semejante estadísticamente con la BAL 2 con un halo de 6,8 mm y BAL 14 con halos de 6,60 mm. En este grupo también se presentaron BAL que no generaron halo de inhibición como la BALs 6, 1, 4, 7 y 8.

En el análisis de las curvas de regresión

no existe tendencia de estimación de los halos de inhibición producida por las BAL relacionados con la predicción que se puede tener de las pruebas de antagonismos de los extractos bacterianos neutralizado y sin neutralizar en función a los halos producidos por las bacterias directas enfrentamientos con *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*, donde se aprecia que los valores de r son cercanos a cero. En el caso de la predicción de la acción de los extractos bacterianos neutralizadas en función a las sin neutralizar si existe una pequeña r siendo muy pequeña para su predicción (Figura 6 y 7).

Tabla 14. Prueba Duncan al $\alpha=0,05$ del promedio de los halos de inhibición (mm) de la acción bacteriana de las BAL frente a *Shigella sonnei* por el método extracto bacteriano neutralizado

Orden	Código	Promedio halos de inhibición (mm)	Significancia
1	BAL 10	7,20	a
2	BAL 9	7,00	a b
3	BAL 2	6,80	b c
4	BAL 14	6,60	b c d
5	BAL 6	6,00	e
6	BAL 1	6,00	e f
7	BAL 4	6,00	e f g
8	BAL 7	6,00	e f g h
9	BAL 8	6,00	e f g h i

^a valores con semejanza estadística entre (BAL 10 con 9 y diferentes BAL 2,14, 6,); ^{bcd} valores con semejanza estadística entre sí (BAL 9, 2 y 14); ^{defgh} valores con semejanza estadística entre sí (BAL 6, 1, 4, 7 y 8).

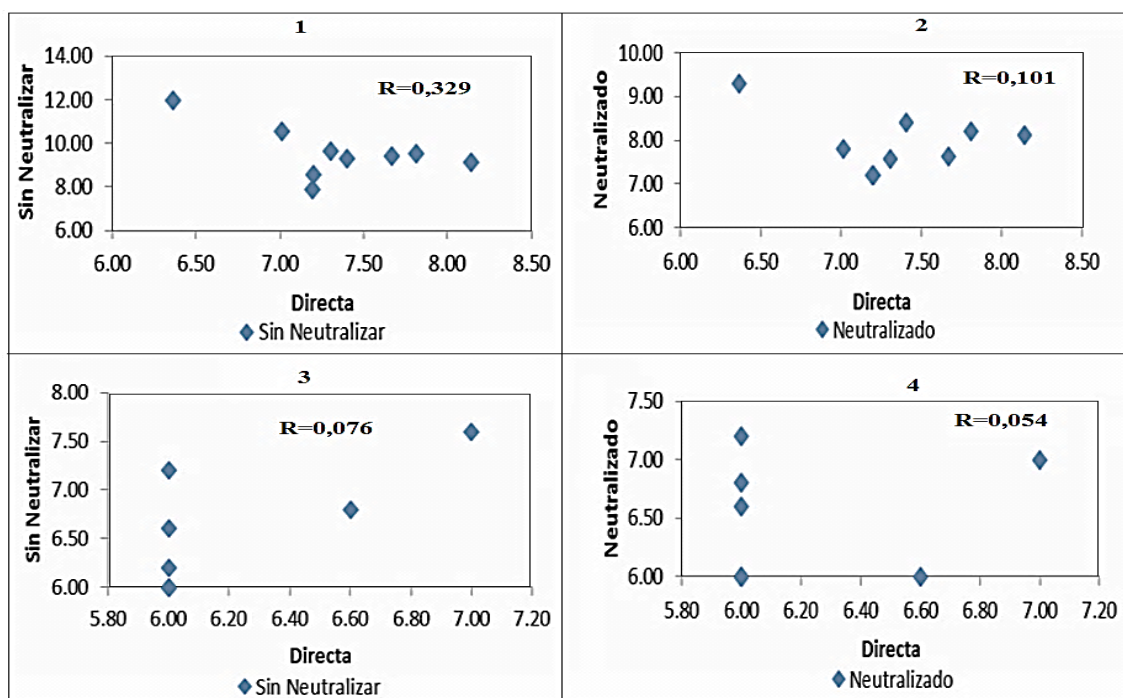


Figura 6. Curvas de regresión, de influencia de las pruebas de enfrentamiento de la Bal sin neutralizar frente a neutralizada en *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*.

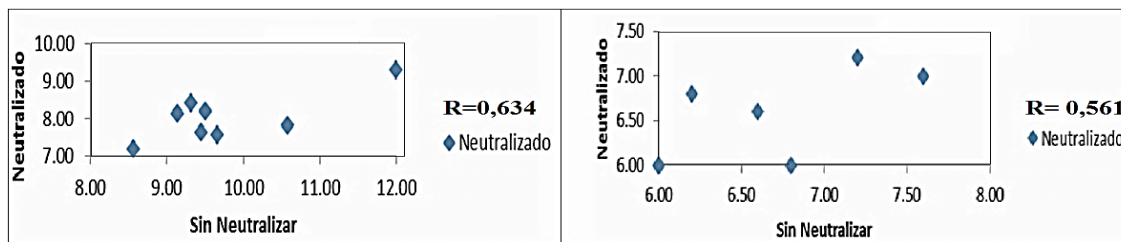


Figura 7. Curvas de regresión de influencia de las pruebas de enfrentamiento de la Bal sin neutralizar frente a neutralizada en *Escherichia fergusonii* y *Shigella sonnei*.

En el estudio de bacterias nativas con actividad bactericida, benéfico se encuentran en el tracto digestivo del lechón (Álvarez, 2004; Figuero y Sánchez, 2016; Bertullo, 2001; Lessi, 1994) La microbiota nativa tiene efectos benéficos (Guarner *et al.*, 2008; Borrue, 2007), mucho se menciona a bacterias benéficas con capacidad de producir compuestos orgánicos que actúan en forma benéfica en la Salud del animal llamadas Bacterias Acido Lácticas BALs con propiedades microbianas que la presencia de microorganismos patógenos (Konstantinov *et al.*, 2008) también se contempla que estas bacterias tienen efecto para controlar otras bacterias del tipo patógena que causa problemas digestivos. (Estrada *et al.*, 2005; Pluske *et al.*, 2003; Córdova, 1993; Castillo, 2000; Larsson *et al.*, 2014) Las bacterias que tienen la capacidad de tener sustancias que permiten la acción antagónica con bacterias patógenas son consideradas como BAL (Pérez *et al.*, 2007; Samaniego y Sosa, 2000; Isakow *et al.* 2007; Champagne *et al.*, 2005), están consideradas como productoras de ácidos en los cuales el de mayor encontrada en ellas es el ácido láctico (Pérez *et al.*, 2007; Samaniego y Sosa, 2000) este tipo de bacterias encontrada se le conoce como

BAL cuya acidez está por debajo de 4,5 y tienen un efecto bactericida (Frizzo *et al.* 2011; Gebert *et al.*, 2011; Gardiner *et al.*, 2004). Identificando molecularmente bacterias como lactobacillus fermentus, lactobacilos lácticos, bacillus firmus y lactobacillus saerimneri reportados de uso como probióticos, (Álvarez, 2004; Figuero y Sánchez, 2016; Bertullo, 2001; Lessi, 1994; García *et al.*, 2012; Partanen y Mroz, 1999 y Buhnik-Rosenblau *et al.*, 2012; NCBI, 2016) que enfrentadas a patógenos propios del cerdo producen halos de inhibición Nodarse (1998) el mayor efecto encontrado de susceptibilidad es con la bacterias *Escherichia*, que pueden causar cuadros diarreicos como lo manifiesta (Bhandari *et al.* 2010; Córdova, 1993) y de menor acción en el género shiguela (Córdova, 1993; Castillo 2000; Larsson *et al.*, 2014), cuando se concentra los productos bacterianos en extractos celulares tiene un mayor efecto encontrándose un acción independiente de cada forma de enfrentamiento, cuando se quiere descartar la acción bactericida por acción ácida se neutraliza el extracto y se realiza el enfrentamiento con patógenas los cuales permite determinar que existen otras (Torres, 2002; Gatti, 2013; Rodríguez, 2011; Bravo *et al.*, 2009).

Conclusiones

Se identificaron y caracterizaron molecularmente 15 bacterias con capacidad antibiótica frente a *Escherichia* y *Shigella*, asociadas al tracto digestivo del lechón pos destetado. Se identificaron 9 bacterias con capacidad de formar sustancias antibióticas en la inhibición frente a *Escherichia* y *Shigella*, asociadas al tracto digestivo del lechón pos destetado. La

mayor eficiencia antagónica de las BAL-prebióticas son aquellas en la cual se utiliza el extracto sin neutralizar con mayor efecto en *Escherichia*. No existe relación en las pruebas de regresión en el efecto antagónico que tienen las bacterias al ser usado en forma directa, extracto bacteriano sin neutralizar y extracto bacteriano neutralizado.

Referencias Bibliográficas

- Álvarez, J. 2004. Evaluación de diferentes dosis de un preparado biológico de bacterias lácticas en cerdos en ceba, *Revista Electrónica de Veterinaria* 5(6).
- Alvitres, V. 2000. Método científico: Planificación de la investigación. 2da ed. Chiclayo: Ciencia.
- Bertullo, E. 2001. Tecnología de los productos de la pesca: Guía de trabajos prácticos, Universidad de la República Uruguay: Facultad de Veterinaria. Instituto de Investigaciones Pesqueras: Montevideo-Uruguay.
- Bhandari S, Opapeju F, Krause D, Nyachoti C. 2010. Dietary protein level and probiotic supplementation effects on piglet response to *Escherichia coli* K88 challenge: performance and gut microbial population. *Livestock Sci* 133: 185-188.
- Borrueal, N. 2007. Probióticos y prebióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y patología* 30(7): 419-425.
- Bravo, L.; Correa, Y.; Clausell, J.; Fernández, A.; Ramírez, M.; Núñez, F.; Ledo, Y.; Cruz, Y. 2009. Caracterización de factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de pacientes con diarrea aguda en Cuba. *Revista Chilena de Infectología* 26(3):233
- Buhnik-Rosenblau K, Matsko-Efimov V, Jung M, Shin H, Danin-Poleg Y, Kashi Y. 2012. Indication for co-evolution of *Lactobacillus johnsonii* with its host. *BMC Microbiology* 12: 149.
- Cadillo, J. 2008. Producción de porcinos. Talleres gráficos Juan Gutember, Lima, Perú.
- Carro, M.; Ranillas, M. 2002. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. Albeitar, España, Departamento de Producción Animal I, Universidad de León, España.
- Castillo, W. 2000. Alteraciones en el sistema digestivo de lechones destetados precozmente. En: XXIII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Huánuco, Perú.
- Córdova, P. 1993. Alimentación animal. Perú: Ed EDITEC. 244 pp.
- Cueto-Vigil, M.; Acuña-Monsalve, Y.; Valenzuela-Riaño, J. 2010. Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas del suero costeño. *Actu Biol* 32: 129-138.
- Champagne, C.; Gardner, N.; Roy, D. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 61-84.
- Chythanya, R.; Karunasagar, I.; Karunasagar, I. 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture* 208(1): 1-10.
- Dulanto, G. 2013. Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de langostino blanco *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Tesis EAP Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Estrada, A.; Gutiérrez, L.; Montoya, I. 2005. Evaluación in vitro del efecto de bactericidas de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Rev.Fac.Nal.Agr.* 58(1): 601- 2609.
- Figuro, V.; Sánchez, M. 1994. Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesqueros y alimenticios en la alimentación animal, Taller regional Instituto de Investigación Porcina. FAO producción y sanidad animal, 134, IIP y la FAO, 8 de septiembre de 1994. La Habana, Cuba.
- Frizzo, L.; Soto, L.; Zbrun, M.; Signorini, M.; Bertozzi, E.; Sequeira, G.; Rodríguez A.R.; Rosmini, M. 2011. Effect of lactic acid bacteria and lactose on growth performance and intestinal microbial balance of artificially reared calves. *Livestock Sci* 140: 246-52.
- Gardiner, G.; Casey, P.; Casey, G.; Lynch, P.; Lawlor, P.; Hill, C.; Fitzgerald, G.; Stanton, C.; Ross, R. 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70: 1895-1906.
- Gatti, M. 2013. Cerdos Criados Con Antibióticos: Un Peligro Para La Salud Humana 2013. Universo Porcino. Investigación y desarrollo. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar
- Gebert, S.; Davis, E.; Rehberger, T.; Maxwell, C. 2011. *Lactobacillus brevis* strain 1E1 administered to piglets through milk supplementation prior to weaning maintains intestinal integrity after the weaning event. *Benef Microbes* 2(1): 35-45.
- Gustincich, S.; Manfiolett, G.; Del Sal, G.; Schneider, C.; Carnici, P. 1991. A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques* 11(3): 298-302.

- Isakow, W.; Morrow, L.E.; Kollef, M.H. 2007. Probiotics for Preventing and Treating Nosocomial Infections Review of Current Evidence and Recommendations. *Chest Journal* 132(1): 286-294.
- Kim, B.; Cho, M.; Kim, M.; Choi, H.; Kang, M.; Shim, H.; Ahn, T.; Kim, J.; Park, D. 2012. Rapid and specific detection of *Burkholderia glumae* in rice seed by real-time Bio-PCR using species specific primers based on an rns family gene. *Plant Dis.* 96: 577-580.
- Klose, V.; Bayer, K.; Bruckbeck, R.; Schatzmayr, G.; Loibner, A. 2010. In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. *Vet Microbiol* 144: 515-521.
- Konstantinov, S.; Smidt, H.; Akkermans, A.; Casini, L.; Trevisi, P.; Mazzoni, M.; De Filippi, S. 2008. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiol Ecol* 66: 599-607.
- Larsson, J.; Lindberg, R.; Aspan, A.; Grandon, R.; Westergren, E.; Jacobson, M. 2014. Neonatal piglet diarrhoea associated with enteroadherent *Enterococcus hirae*. *J Comp Path* 151: 137-147.
- Lessi, E. 1990. Ensilaje de pescado en Brasil para la alimentación Animal. Capítulo 3, CPTA/INPA, Manaus, AM, Brasil. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/APH134/cap3.ht m>.
- Nodarse, H. 1998. Valoración in vitro de discos para antibiogramas de producción nacional. *Revista Cubana de Medicina Militar* 27(2): 106-112.
- Perez, N.; Fajardo, P.; Méndez, J.; Cachaldora, P.; Pastrana, L. 2007. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Alimentation Animal Ciencia y Tecnologia* 134: 89-107.
- Ramírez, L.; Castaño D. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica* 15(42): 263-268.
- Rodriguez, I. 2011. Evaluación de dos bacterias lácticas probióticas bacteriocina productoras de ácido como inoculantes para el control de *Listeria monocytogenes* en hierba y maíz ensilajes. *Alimentación animal ciencia y tecnología* 175(3): 4.
- Samaniego, L.; Sosa, M. 2000. *Lactobacillus* spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Centro de Estudios Biotecnológicos, Facultad de Agronomía. Ciudad de Matanzas, Cuba. 2000.
- Torres, C.; Zarazaga, M. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales ¿Vamos por el buen camino? *Gaceta Sanitaria* 16(2): 109-112.