

Efecto 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 LP^{1,2}, Sequeira G², Martí LE², Zbrun MV^{1,2}.

¹Laboratorio Análisis de Alimentos, ICIVET-Litoral, UNL-CONICET. ²Departamento de Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. ³Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, CIVETAN-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA.

Numerosas bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* presentan un alto potencial probiótico. En los últimos años, el interés en los probióticos como suplementos nutricionales y como medicamentos ha aumentado significativamente. *Lactobacillus plantarum* es una bacteria ácido láctica que presenta gran versatilidad de adaptación a nichos ambientales debido a la capacidad 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. *L. plantarum* tiene la particularidad de presentar capacidad antibacteriana frente a diferentes bacterias patógenas. Esto lo convierte en una alternativa potencial para el control de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) relacionadas con el consumo de carne porcina¹. 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 hombre 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 consumir². 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 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*.

Cuatro cepas de *L. plantarum* (LP1, LP3, LP5 y LP7) de origen porcino fueron evaluados frente a *C. coli* (NCTC 11366, Doyle 1948) según la metodología descrita por Zimmermann⁴, con modificaciones. LP1, LP3, LP5 y LP7 fueron aisladas de distintas etapas de la cadena productiva de carne porcina e identificadas mediante secuenciación de Sanger en la Universidad de Córdoba, España. *C. coli* fue reactivado en agar Muller Hinton (MH, Biokar, Francia) durante 48 h a 37°C en microaerofilia (H₂:CO₂:O₂ = 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 DO₆₃₀ de 0,8±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.

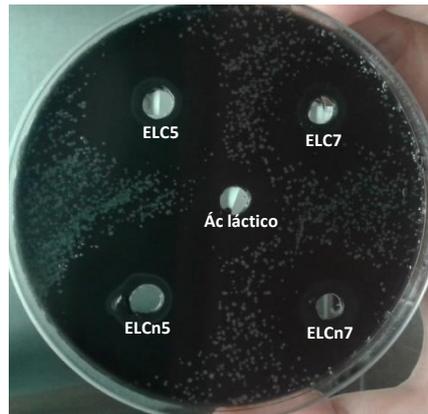


Fig. 1: Halos de inhibición generados por el ELC y el ELCn de LP5 frente a *C. coli* en agar mCCDA.

Estudios demuestran que a lo largo de la cadena productiva de carne de cerdo se han aislado bacterias involucradas en ETA³. 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.

Los *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 antibióticos para la obtención de productos cárnicos con menor carga de bacterias involucradas en ETA.

Bibliografía

1. Colello, R., Ruiz, M.J.; Padín, V.M., Rogé, A.D.; Leotta, G.; Padola, N.L. (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.
2. Rossler, E.; Fuhr, E.M.; Lorenzón, G.; Romero-Scharpen, A.; Berisvil, A.P.; Blajman, J.E. (2017). Presencia de serotipos de *Campylobacter jejuni* O: 19 en la cadena avícola Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2):178-82.
3. 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):174-7.
4. Zimmermann, J.A.; Berisvil, A.; Romero-Scharpen, A.; Fusari, M.; Artesana D.; Blajman, J. (2017) Inhibición in-vitro de *Campylobacter coli* por bacterias ácido lácticas de origen porcino. II Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Rosario. Casilda y Zavalla. ISBN 978-987-46406-2-8