

Evaluación del efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *E coli* en la cría de pollos

Evaluation of the effect of *Saccharomyces cerevisiae* on *E coli* of interest in farming poultry

Nora Guida,^{1*} | Ph.D, María Mesplet,¹ | Ph.D, Fiorella Kotsias,¹ | Ph.D, Solange Gonzalez, Vet., | Carla Bustos,¹ Esp., | Mariano Laiño,¹ | Esp., Pablo Franco,¹ | Esp., Jorge Picos,¹ Vet., Marcela Mascolo,¹ Vet.

Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia: NGuida@fvvet.uba.ar

RESUMEN

Objetivos. Verificar la acción aglutinante de *Saccharomyces cerevisiae* sobre distintos géneros bacterianos y sobre *E coli* aisladas de materia fecal de animales alimentados con y sin aditivos de *Saccharomyces cerevisiae* in vitro.

Material y métodos. Se estudio la propiedad de aglutinación de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y de *E coli* aisladas de pollos alimentados con y sin aditivos, de *Saccharomyces cerevisiae* con la técnica de aglutinación en portaobjetos y observación microscópica.

Resultados. Las *E coli* aisladas fueron positivas a la aglutinación *in vitro* y se observó la reducción en el número de bacterias entéricas totales en el grupo de animales tratados con aditivo con respecto al grupo no tratado.

Conclusiones. En este estudio se demostró la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* de aglutinar cepas bacterianas *in vitro*. La reducción en el número de bacterias entéricas totales en el grupo de animales tratados con respecto al grupo control, sugiere que un fenómeno similar se estaría produciendo *in vivo*, evitando probablemente la unión de las bacterias a la pared intestinal.

Palabras clave: prebiótico, polisacáridos bacterianos, suplementos dietéticos, pollos (DeCs)

ABSTRACT

Objectives. To verify binding action of *Saccharomyces cerevisiae* on different bacterial genera, and E coli isolated from feces of animals fed with and without additives, *in vitro*.

Material and methods. The binding property of E. coli and Pseudomonas aeruginosa and E. coli isolated with slide agglutination technique microscopic observation and study.

Results. The E coli isolates were positive for agglutination *in vitro* and reduction was observed in the total number of enteric bacteria in the group of treated animals compared to untreated group.

Conclusions. In this study it was demonstrated the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to bind bacterial strains *in vitro*. The reduction in the total number of enteric bacteria in the group of animals treated with the control group, suggesting that a similar phenomenon will be produced *in vivo*, probably preventing binding of bacteria to the intestinal wall

Prebiotic, polysaccharides, Bacterial , Dietary Supplements , chickens

INTRODUCCIÓN

Las bacterias intestinales tienen un papel importante en la salud por sus efectos sobre la morfología visceral, nutrición, patogénesis de la enfermedad intestinal y la respuesta inmune. La ecobiota microbiana también protege contra la colonización del intestino por bacterias patógenas, estimula la respuesta inmune y es responsable de degradar cantidades copiosas de moco producido por las células caliciformes del intestino. En los pollos de engorde muchos factores pueden afectar la composición de la comunidad bacteriana , como la composición de la dieta, la administración de antibióticos y la infección con organismos patógenos.

La patogénesis de la enfermedad bacteriana es el resultado de un proceso multifactorial que depende del estado inmune del hospedero, la naturaleza de la especie bacteriana, los factores de virulencia y el número de organismos en la exposición inicial. Un número limitado de bacterias es responsable de la mayoría de enfermedades infecciosas en individuos sanos.

La infección bacteriana por lo general es iniciada por la adhesión del microbio a una superficie epitelial específica. La adherencia implica interacciones entre componentes externos de la célula bacteriana (adhesinas) y la célula del hospedero (receptores). *E. coli* posee varios tipos diferentes de adhesinas, como las fimbrias, que se unen a los receptores de las células intestinales

(Stordeur P 2001). Se han determinado las bacterias predominantes en el intestino y los ciegos de los pollos por secuenciación del gen 16S rRNA. En el intestino cerca del 70% de las secuencias correspondieron a *Lactobacillus*, 11 % a *Clostridiaceae*, 6.5% a *Enterococcus*.. En el ciego el 65 % correspondió a *Clostridiaceae*, *Fusobacterium* el 14%, *Lactobacillus* 8% y 5% *Bacteroides* (Blanco JE 1997). En ambas las Enterobacterias representan aproximadamente el 20 %.

E. coli se comporta como patógeno oportunista, ya que aprovecha los períodos en que las defensas del huésped están disminuidas para manifestar su acción patógena. (Possemiers S, 2015) Solamente aquellas cepas que poseen factores de virulencia que les permitan burlar las defensas del huésped y causar daños son realmente patógenas. La virulencia de *E. coli* es multifactorial y en las cepas aviares se han descrito fimbrias tipo 1, P y S que le permiten adherirse a los receptores, el sideróforo aerobactina que le capacita para captar y concentrar el hierro necesario para poder crecer en los tejidos corporales, las resistencias al suero y a la fagocitosis asociadas especialmente con la presencia del antígeno capsular K1. También se ha asociado con la virulencia una proteína Tsh (118 kDa) que es responsable de una actividad hemoaglutinante sensible a la temperatura. Las cepas septicémicas aviares se reparten en un amplio abanico de serotipos, pero la tercera parte se pueden englobar en tan solo cinco: O2:H5, O2:H6, O18:H7, O78:H9 y O78: H-. (Blanco J, E. 1997) Se han encontrado algunas cepas humanas y aviares que comparten serotipos y factores de virulencia. (Stacy AK, 2014)

La inoculación oral con bacterias de la flora intestinal de aves adultas logra proteger a aves jóvenes de la colonización intestinal efecto que fue definido como exclusión competitiva. (Spring, P, 2000). Basándose en este concepto se logró descubrir a lo largo de varias investigaciones que la incorporación en la dieta de mananos oligosacáridos fosforilados derivados de una cepa específica de levaduras *Saccharomyces (S.) cerevisiae* tenía el mismo efecto de exclusión competitiva evitando la adhesión de los patógenos a las células epiteliales del intestino al bloquear las fimbrias de tipo 1 que poseen algunos microorganismos, y que son las que le permiten atacar la superficie epitelial intestinal. Fija las bacterias por adsorción a las fimbrias I aglutinándolas. (Amabile De Campos, T, S. 2005, Stacy AK, 2005)

La comunidad microbiana gastrointestinal en última instancia refleja la coevolución de microorganismos en su anfitrión animal y la dieta adoptada. Los cambios en la composición de la ecobiota del animal pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales sobre la salud, el crecimiento, y la maduración. La preocupación por el empleo agrícola de antibióticos que promueven crecimiento y la aparición de resistencia a esos antibióticos en humanos para patógenos zoonóticos aumenta la presión para eliminar esta práctica de la agricultura animal.

En este estudio se realizaron distintas experiencias para evaluar el efecto de los glucomanos sobre enterobacterias de interés en la producción aviar.

El objetivo fue verificar la acción aglutinante de glucomananos de *S cerevisiae* sobre distintas cepas bacterianas *in vitro*, por la técnica de aglutinación microscópica y evaluar los aislamientos de *E coli* aisladas de materia fecal de animales alimentados con y sin aditivos de *S cerevisiae* in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnica de aglutinación para observación microscópica

Se realizó el control de esterilidad del producto aditivo dietético conteniendo *S. cerevisiae* por cultivo en medio Sabouraud y agar tripteína soja (ATS) (Britania®). Se preparo una solución de *S cerevisiae* al 1% en PBS pH7,2-7,41 Cultivos a estudiar: 1 ml de una suspensión bacteriana de un cultivo de 24 hs con densidad igual a N° 2 de la escala de McFarland, Se colocaron 1ml de solución de *S cerevisiae* y 1 ml de cultivo bacteriano en estufa a 37°C durante 5 minutos. Luego se realizó un extendido de la mezcla sobre un portaobjetos y se realizó la coloración de Gram observando si hubo aglutinación en microscopio óptico a 1000 x con aceite de inmersión.

Controles:

- *S. cerevisiae* y PBS para verificar que no haya autoaglutinación
- *S. cerevisiae* y *Salmonella tiphymurium*, control positivo posee fimbrias tipo 1.
- *S. cerevisiae* y *Salmonella gallinarum*, control negativo, no posee fimbrias Tipo 1

Inhibición de la aglutinación por manosa

Se utilizó una solución de manosa al 10%, en PBS pH7,2-7,4 esterilizada por filtro Milipor 0,2 um. Luego se colocaron 1ml de la suspensión bacteriana más 1 ml de la solución de manosa en estufa a 37°C durante 5 minutos. Se adicionó 1ml de solución de *S. cerevisiae* a la mezcla anterior e incubó en estufa a 37°C durante 5 minutos

Se realizó un extendido de la mezcla sobre un portaobjetos y efectuó la coloración de Gram observando si hubo aglutinación en microscopio óptico a 1000 x con aceite de inmersión

Evaluación de la acción aglutinante de glucomananos de *S cerevisiae* sobre distintas cepas bacterianas

Se comparó la propiedad de aglutinación de una cepa de *E. coli* (cepario UBA 2005) y una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (cepario UBA 2004).

Análisis de los cultivos materia fecal de animales alimentados con glucomananos de *S. cerevisiae* alojados en su ambiente natural de cría

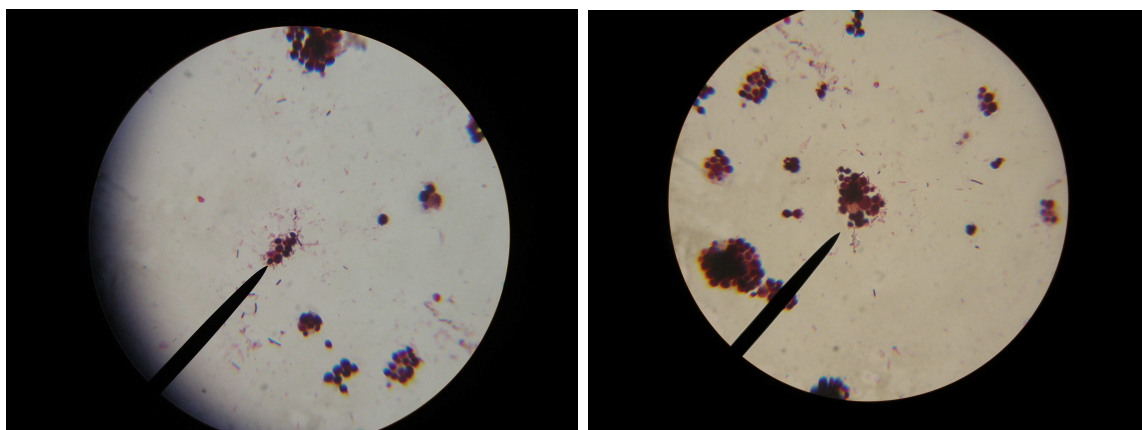
Se recibieron en el laboratorio 12 muestras de materia fecal refrigerada, proveniente de galpones de pollos parrilleros de la provincia de Entre Ríos,

Argentina, zona se concentran de establecimientos de engorde de pollos, con dieta adicionada con *S cerevisiae*. Las muestras se cultivaron por microdiluciones en base 10, en microplacas de 96 pocillos. Las diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-8} fueron cultivadas por el método de la gota Drop Method. (Barbosa,Hr,1995) por siembra directa en medios ATS, XLD (Britania ®) Se estudiaron además 12 muestras de materia fecal proveniente de galpones de pollos parrilleros que no incluían en su dieta *S cerevisiae* como grupo control. Con las cepas aisladas se evaluó la capacidad de aglutinación e inhibición de la aglutinación con manosa .

RESULTADOS

Evaluación de la acción aglutinante de glucomananos de *S cerevisiae* sobre distintas cepas bacterianas

S. cerevisiae fue capaz de aglutinar cepas de *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa*. En la figura 1 se observa aglutinación de bacterias alrededor de las morfologías levaduriformes de *S cerevisiae* y agrupamientos de morfologías bacterianas en forma de agregados. (figuras 1 y 2)



Figuras 1 y 2: Aglutinación microscópica de *S serevisiae* y *E coli*, Coloración de Gram, 1000x. Se pueden observar los cuerpos de las levaduras con las bacterias Gram negativas adheridas a su pared

Análisis de los cultivos de materia fecal de animales alimentados con glucomananos de *S cerevisiae* y grupo control, alojados en su ambiente natural de cría

Todos los cultivos revelaron la presencia de *E coli*. Las cepas aisladas fueron positivas a la aglutinación *in vitro* en portaobjetos y la misma fue inhibida por manosa al 10 %.
En el Grupo control sin aditivos se obtuvo una media de Bacterias totales de $1,07 \times 10^7$ y en el Grupo con *S cerevisiae* como aditivo se obtuvo una media de BT= $6,23 \times 10^6$

DISCUSIÓN

La preocupación por el empleo agrícola de antibióticos que promueven crecimiento y la aparición de resistencia a esos antibióticos en humanos para patógenos zoonóticos aumenta la presión para eliminar esta práctica de la agricultura animal. (Blanco M , 1996)

El uso de aditivos en el alimento ha marcado una nueva etapa en la producción y es una alternativa totalmente natural y económicamente viable para hacer frente a los patógenos intestinales. Actualmente, los antibióticos utilizados en la alimentación animal pueden ser sustituidos por alternativas naturales como los mananoligosacáridos. Estos aditivos naturales, cuando son incluidos en la ración, no dejan residuos químicos en los productos finales, mejoran el desempeño productivo y el perfil sanitario de los animales. Muchos patógenos entéricos se adhieren a azúcares por medio de la fimbria tipo 1, que reconoce la manosa. Estudios previo, han demostrado que *S cerevisiae* es capaz de bloquear la adhesión bacteriana y por consiguiente la colonización por medio de la ocupación del lugar de adhesión de la lectina en la fimbria tipo 1 (Brufau MT, 2015).

En este estudio se demostró la capacidad de *S cerevisiae* de aglutinar cepas bacterianas patógenas *in vitro*. La reducción en el número de bacterias entéricas totales en el grupo de animales tratados con el producto con respecto al grupo control, sugiere que un fenómeno similar se estaría produciendo *in vivo*, evitando probablemente la unión de las bacterias a la pared intestinal. La técnica del Drop Method resultó práctica y eficaz para evaluar la cuenta viable por diluciones en un gran número de muestras. La determinación del poder aglutinante de *S cerevisiae in vitro* y la inhibición por manosa resultó ser de fácil desarrollo con la técnica modificada, utilizada en este ensayo.

La comunidad microbiana gastrointestinal va a reflejar en última instancia la coevolución de microorganismos en los animales y la dieta. Los cambios en la composición de la microflora pueden tener efectos beneficiosos o perjudiciales sobre la salud, el crecimiento, y la maduración de los individuos.

Segun Brufau (2015), los tratamientos que contienen *Saccharomyces* producen más moco, un efecto que puede ser asociado con la observación de más células caliciformes por los efectos beneficiosos de estos *Saccharomyces* sobre la morfología intestinal. Los efectos de estos prebióticos incluyen cambios graduales en la estructura de la comunidad bacteriana en general, la reducción de patógenos potenciales, aumento cuantitativo de los lactobacilos y modulación cualitativa de las bifidobacterias. (Fedorak RN, 2004) Finalmente, el reemplazo de los antibióticos por este tipo de productos permitiría abrir el campo de exportación hacia los países en los cuales la implementación de antibióticos esta prohibida lo que representaría un ingreso importante en las políticas económicas de los países en desarrollo.

GRADECIMIENTOS

Facultad de Ciencias veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.
Vet. Eugenio Machi por la provisión de las muestras de materia fecal.

REFERENCIAS

- Amabile De Campos, T , Guedes Stehling, E .; Ferreira, A , Pestana de Castro, A. F , Brocchi, M. and Dias da Silveira, W. , Adhesion properties, fimbrial expression and PCR detection of adhesin-related genes of avian *Escherichia coli* strains *Veterinary Microbiology*, 2005, 106: 275-285.
- Barbosa, Hr, Rodrigues, MFA, Campos CC, Chaves ME, Nunes, I, Juliano, Y, Novo, NF counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. *Journal of Microbiological methods*, 1995, 22, 39-50)
- Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J Production of toxins (enterotoxins, verotoxins and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens. Relationship with in vivo pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology* 1997, 35:2953-2957
- Blanco M, Blanco JE, Mora A, Blanco J (*Escherichia coli* septicémicos aviares: serotipos, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y desarrollo de vacunas. *Medicina Veterinaria*, 1996, 13:525-537
- Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Curr Opin Gastroenterol*, 2004, 20:146-55
- Possemiers S, Pinheiro I, Verhelst A, Van den Abbeele P, Maignien L, Laukens D, et al A Dried Yeast fermentate selectively modulates both the luminal and mucosal gut microbiota and protects against Inflammation, As Studied in an Integrated in Vitro Approach. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61 (39), pp 9380-9392
- Spring, P., C. Wenk, K. A. Dawson, and K. E. Newman.. The effects of dietary mannanoligosaccharides on caecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the caeca of salmonella-challenged broiler chicks. *poultry Science* , 2000, 79: 205-211
- Stacy AK, Mitchell NM, Maddux JT, et al. Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among Avian Pathogenic *E. coli* and Its Role in virulence. Chang Y-F, ed. *PLoS ONE*. 2014;9(1
- Stordeur P, Marlier D, Blanco J, Oswald E, Biet F, Dho-Moulin M, Mainil J Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*: *Veterinary Microbiology* 2000, 84:231-241

REDVET: 2014, Vol. 16 N° 08

Este artículo Ref. 081508_RED VET (JUL1508_RED VET) está disponible en

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080815.html>

concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080815/081508.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>