

CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA PRELIMINAR DE NUEVAS ESPECIES DE BIFIDOBACTERIAS AISLADAS DE HECES DE MONOS RECIÉN NACIDOS

Sarquis Ma. Agustina

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN), FIQ, UNL

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biología

Grupo: X

INTRODUCCIÓN

Las bifidobacterias, integrantes naturales de la microbiota intestinal, juegan un rol importante en el mantenimiento de la salud del hospedador. Si bien numerosos estudios hacen referencia a bifidobacterias aisladas del tracto intestinal humano, aquellos referentes a bifidobacterias en primates no humanos son muy escasos. Debido a ello, el estudio de la diversidad de las bifidobacterias en el tracto intestinal y las heces y el aislamiento de diferentes ambientes resulta muy interesante. Frente a la escasez de cepas de bifidobacterias para uso comercial (las existentes fueron aisladas del tracto intestinal humano), es necesario disponer de nuevas cepas correctamente identificadas y caracterizadas, con potencial no solo funcional sino también tecnológico, para el desarrollo de nuevos cultivos probióticos.

OBJETIVOS

El objetivo del trabajo fue evaluar el potencial tecnológico de especies de bifidobacterias inexistentes hasta el momento, para su potencial uso como probióticos en alimentos. Los objetivos particulares fueron: evaluar la tolerancia de las cepas al oxígeno, temperatura, la capacidad de sobrevivida durante el almacenamiento congelado y la capacidad de sobrevivida en leche acidificada y almacenada a 4°C durante 21 días.

METODOLOGÍA

Cepas: se utilizaron 4 cepas de nuevas especies de bifidobacterias aisladas en Italia a partir de heces de monos recién nacidos: *Bifidobacterium aesculapii* MRM3/1 y MRM4/2 y *B. aerophilum* TRE26 y *B. avesanii* TREC (Michelini y col., 2015; Modesto y col., 2014). Además se utilizó la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (aislada en el INLAIN a partir de leche materna humana y previamente caracterizada, Zacarías y col., 2011) y la cepa probiótica comercial *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12. Para las cepas de nuevas especies de bifidobacterias se observaron las características macroscópicas de las colonias y la morfología celular por microscopia óptica (100X).

Proyecto: Evaluación del potencial de las altas presiones (dinámica e hidrostática) para el mejoramiento de las características tecnológicas y probióticas de nuevas especies de bifidobacterias para alimentos probióticos

Director del proyecto: Burns, Patricia

Director del becario: Burns, Patricia

Co-director: Reinheimer, Jorge

Caracterización tecnológica. Se determinó la tolerancia de las cepas al oxígeno, la resistencia al almacenamiento congelado, la resistencia térmica y a la acidez.

Tolerancia al oxígeno: a partir de cultivos overnight de las cepas (20 hs de incubación, 37°C, anaerobiosis) en caldo MRSc (MRS + 0,1% cisteína), se inoculó (1% v/v) caldo MRSc y se incubó durante 24 hs, simultáneamente en aerobiosis y en anaerobiosis. Se calculó el porcentaje de crecimiento según: % Crecimiento = $DO_a/DO_{an} * 100$. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Resistencia al almacenamiento congelado: Cultivos overnight de las cepas en caldo MRSc fueron centrifugados (224424 x g, 8°C, 45 min), lavados con buffer PBS (pH 7,2) y resuspendidos en leche descremada estéril 20% (p/v). Se prepararon alícuotas y se conservaron a -20 y -70°C. Se determinó la viabilidad celular mediante recuentos a tiempo inicial, 15, 30, 60 y 120 días en agar MRSc (37°C, 48 hs, anaerobiosis).

Resistencia térmica: Cultivos overnight de las cepas en caldo MRSc fueron centrifugados, lavados con buffer PBS y resuspendidos en un volumen determinado de buffer PBS o en leche descremada estéril 10% (p/v) con el objetivo de que la concentración de todas las cepas fuera de aproximadamente 2×10^7 UFC/ml. Las suspensiones celulares se alicuotaron (1 ml) y se colocaron en baño de agua a 50 o 60°C durante 10 min. Inmediatamente la muestra fue enfriada en baño de hielo. Se determinó la resistencia térmica mediante recuentos en agar MRSc (37°C, 48 hs, anaerobiosis) antes y luego del tratamiento térmico. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Resistencia a la acidez: Cultivos overnight de las cepas en caldo MRSc fueron centrifugados, lavados con buffer PBS y resuspendidos en leche descremada estéril 10% (p/v) a pH 6,5 o acidificada con ácido láctico a pH 4,5 y 5,0. Para todas las cepas se realizaron las diluciones correspondientes para que la concentración inicial fuera de aproximadamente 2×10^8 UFC/ml. Se realizaron alícuotas de 12 ml (en tubos llenos, sin cámara de aire) y se almacenaron durante 21 días a 4°C. Se determinó la viabilidad de las bifidobacterias a tiempo = 0, 7, 14 y 21 días mediante recuento en agar MRSc (37°C, 48 hs, anaerobiosis).

RESULTADOS

Cepas. Características macroscópicas y morfología celular

Ambas cepas de *B. aesculapii* presentaron una colonia blanca, cremosa, de bordes regulares. Al microscopio óptico se observó una morfología celular poco frecuente para bifidobacteria, con forma de "serpiente enrollada" lo que dio origen a su nomenclatura (*Aesculapius*: Dios romano de la medicina). *B. aerophilum* TRE26 presentó colonias heterogéneas (colonias beige y blancas) y *B. avesanii* TREC colonias beige, cremosas con una superficie muy sobre elevada. Al microscopio óptico se observan células irregulares con varias bifurcaciones en la cepa *B. a.* TRE26 y células bifurcadas predominantemente en forma de Y para la cepa *B. a.* TREC.

Tolerancia al oxígeno

Las bifidobacterias se caracterizan por ser microorganismos anaerobios, sin embargo algunas de ellas presentan cierta tolerancia al oxígeno.

La tolerancia al oxígeno fue variable según la cepa estudiada. Las 2 cepas de referencia (*B. lactis* INL1 y *B. lactis* Bb12) al igual que *B. aerophilum* TRE26 y *B. avesanii* TREC presentaron elevada tolerancia al oxígeno con una sobrevida del 96%, 92%, 95% y 96%, respectivamente. Sin embargo, las 2 cepas de *B. aesculapii* fueron más susceptibles, con una sobrevida del 57% (*B. a.* MRM4/2) y 22% (*B. a.* MRM3/1).

Resistencia al almacenamiento congelado

La resistencia de las cepas al almacenamiento congelado fue satisfactoria a -70°C , siendo la cepa más sensible *B. aesculapii* MRM3/1 (pérdida de viabilidad de 1,35 órdenes log UFC/ml luego de 120 días). Ambas cepas de referencia (*B. lactis* INL1 y Bb12) al igual que las cepas de *B. avesanii* TREC y *B. aerophilum* TRE26 prácticamente no perdieron viabilidad durante 4 meses de almacenamiento a -70°C .

A -20°C (120 d) la pérdida de viabilidad fue entre 2,7 y 3,5 órdenes log para las 4 bifidobacterias aisladas de mono. En la **Figura 1** se observan los resultados obtenidos.

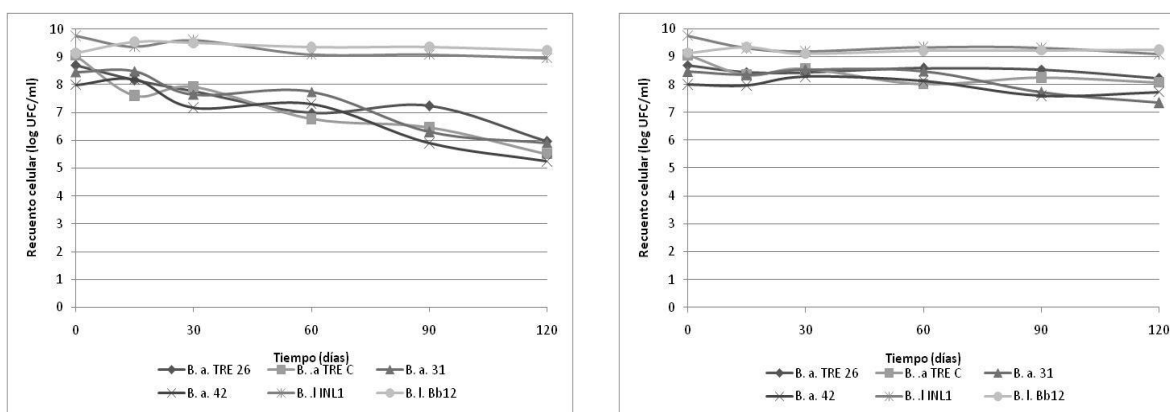


Figura 1. Recuento celular (log UFC/ml) durante el almacenamiento por 120 días a -20°C (izquierda) y -70°C (derecha).

Resistencia térmica

En la **Tabla 1** se observa la pérdida de viabilidad celular (Δ log UFC/ml \pm SD) de las cepas resuspendidas en PBS y en leche 10% mantenidas a 50°C durante 10 min.

La resistencia térmica de las cepas fue satisfactoria a 50°C durante 10 min, no así a 60°C (no se muestran los datos). Las cepas más termorresistentes a 50°C fueron *B. lactis* INL1, *B. lactis* Bb12, *B. aesculapii* MRM3/1 y *B. avesanii* TREC. La cepa más termosensible fue *B. aerophilum* TRE26.

Tabla 1. Resistencia térmica (muerte celular Δ log UFC/ml \pm SD) de las cepas a 50°C durante 10 minutos.

Cepa	Muerte celular (Δ log UFC/ml)	
	PBS	Leche 10% (p/v)
<i>B. lactis</i> INL1	0,12 \pm 0,21	0,02 \pm 0,07
<i>B. lactis</i> Bb12	0,84 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00
<i>B. aesculapii</i> MRM3/1	0,21 \pm 0,35	0,13 \pm 0,42
<i>B. aesculapii</i> MRM4/2	0,38 \pm 0,22	0,91 \pm 0,17
<i>B. avesanii</i> TREC	0,07 \pm 0,11	0,15 \pm 0,09
<i>B. aerophilum</i> TRE26	1,44 \pm 0,17	0,70 \pm 0,04

Resistencia a la acidez:

En leche acidificada a pH= 5 se observa que hubo menor pérdida de viabilidad que cuando las cepas se almacenaron en leche a pH más ácido (pH = 4,5), es decir que un cambio de 0,5 puntos de unidades de pH, mejora la viabilidad de las cepas durante la conservación. En las **Figura 2** se observan los resultados obtenidos. *B. aesculapii* MRM3/1 fue la cepa más resistente durante el almacenamiento en leche a pH 4,5 con pérdida de viabilidad de 4,5 órdenes log. La cepa más sensible fue *B. avesanii* TREC.

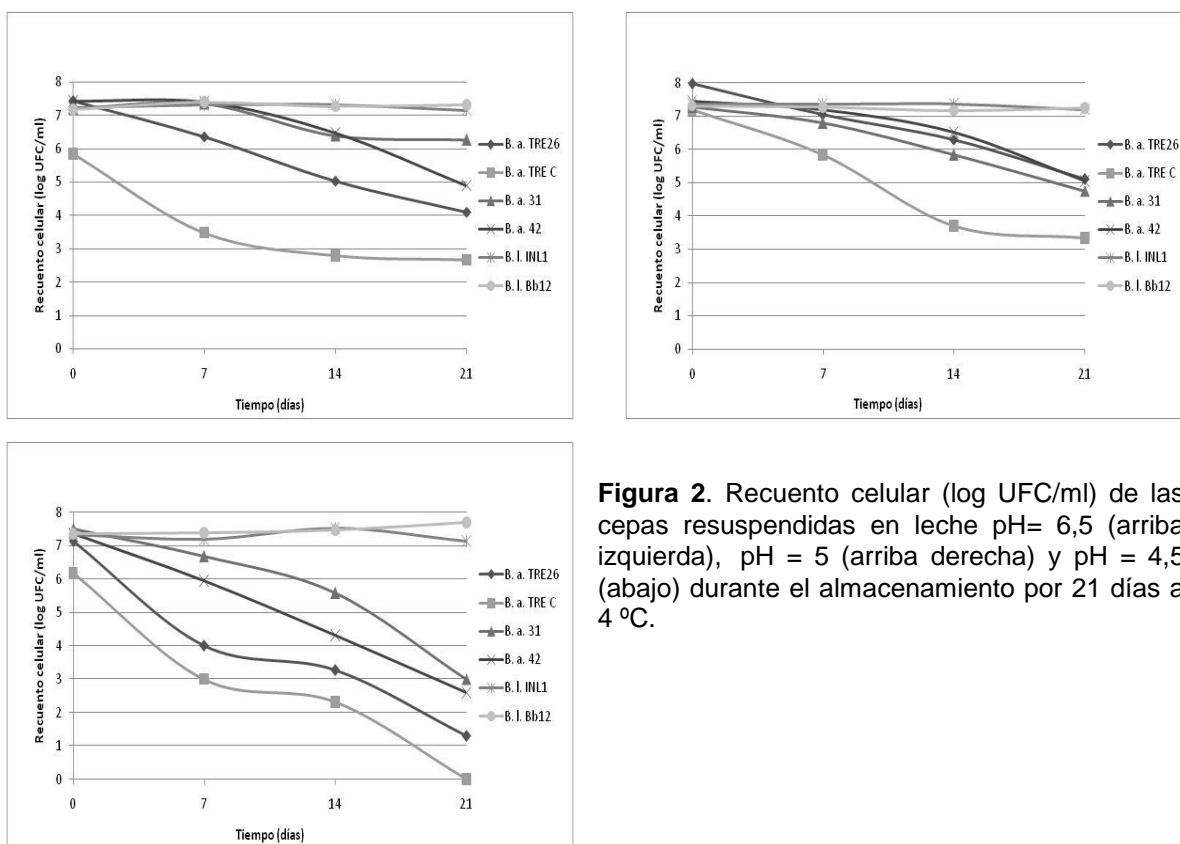


Figura 2. Recuento celular (log UFC/ml) de las cepas resuspendidas en leche pH= 6,5 (arriba izquierda), pH = 5 (arriba derecha) y pH = 4,5 (abajo) durante el almacenamiento por 21 días a 4 °C.

Conclusión: La caracterización tecnológica preliminar de las cepas de bifidobacterias aisladas de heces de monos recién nacidos resultó alentadora para algunas de ellas, dependiendo de la actividad realizada. Si bien se necesitan mayor cantidad de estudios, es evidente la importancia de la caracterización tecnológica de las cepas y la selección del alimento adecuado para su incorporación. No obstante, siempre resulta muy alentador e importante contar con nuevos aislamientos autóctonos que podrían ampliar el elenco de cepas para uso industrial.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Michelini S., Modesto M., Kaihei O., Stenico V., Stefanini I., Biavati B., Watanabe K., Ferrara A. y Mattarelli P. 2015, *Anaerobe*. 33, 101-104.
- Modesto M., Michelini S., Stefanini I., Ferrara A., Tacconi S., Biavati B. y Mattarelli P. 2014, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 2819-2827.
- Zacarías M.F., Binetti A., Laco M., Reinheimer J. y Vinderola G. 2011, *Int. Dairy J.* 21: 548-555.