AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIOTICO PARA EL DESARROLLO DE UN ADITIVO ZOOTECNICO A BASE DE SUSTRATOS VEGETALES. CARACTERIZACION TECNOLOGICA Y FUNCIONAL.

Imbert, Denise

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Laboratorio de Microbiología General

Director: Martin Marchisio

Co-Directora: Mónica Mattio

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Probiótico, Bacillus, Levadura.

INTRODUCCION

En el campo de la alimentación animal, el interés en los probióticos está en constante aumento, impulsado por la necesidad de encontrar alternativas a los antibióticos. Investigaciones recientes han destacado el potencial de microorganismos como las levaduras y ciertas especies del género *Bacillus* como probióticos. Los *Bacillus*, conocidos por su capacidad de formar esporas, y las levaduras, por su habilidad para tolerar ambientes ácidos del tracto digestivo, están siendo estudiados por sus propiedades beneficiosas, que incluyen efectos antimicrobianos, antioxidantes y enzimáticos. Estos microorganismos no solo protegen el sistema digestivo de los animales de patógenos, sino que también mejoran la digestión, promueven la salud intestinal y potencialmente ofrecen otros beneficios para la salud. Sin embargo, antes de su implementación en la alimentación animal, es crucial realizar ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* para evaluar su eficacia y seguridad en condiciones específicas del sistema digestivo (Ruiz Sella *et al*, 2021).

En este trabajo, se investiga el uso de bacilos esporulados y levaduras como potenciales probióticos, ya que éstos actúan principalmente en el aparato digestivo, donde se ha visto que, cuando uno los ingiere, éstos ayudan a proteger el mismo de microorganismos nocivos, mejorar la digestión y la función intestinal, y además podrían proporcionar otros beneficios para la salud.

OBJETIVOS

- Aislar bacilos aerobios esporulados y levaduras a partir de diversas muestras de intestinos de animales y sustratos vegetales.
- Caracterizar a los aislamientos de acuerdo a su: tolerancia a acidez (pH 2,3 y 4) y propiedades antagonistas frente a patógenos.
- Realizar la identificación por espectroscopía de masas (MALDI-TOF).

Desarrollo de un aditivo zootécnico a base de sustratos vegetales fermentados con bacterias esporuladas y levaduras nativas con propiedades benéficas. Programa de Proyectos de Investigación y Desarrollo Orientados a Problemas Sociales y Productivos (CAID Orientado). Convocatoria 2021. Financiado por Universidad Nacional del Litoral (UNL). Código: 21820210100030LI. Directora: Dra. Patricia Burns.

METODOLOGIA

Se procedió a realizar el aislamiento de los microorganismos de interés a partir de muestras de sustratos vegetales sin fermentar, fermentado y sedimentado (Nutreza S.A) y de intestinos de *Myleus pacu* (Pacú) y *Gallus gallus domesticus* (Gallina). Para el procedimiento de las mismas, se realizó la técnica de recuento en placa en superficie y la técnica de las cinco estrías. Para el aislamiento de levaduras se empleó el medio Hongos y Levaduras (HyL) y se incubaron las placas 72 h a 28ºC en aerobiosis. Para bacterias aerobias esporuladas se realizó un choque térmico a 80 ºC por 15 minutos, se utilizó el medio Agar Tripteína Soja (ATS) y se incubaron las placas 24 h a 37ºC en aerobiosis.

Para la selección de las colonias a aislar, se analizaron tanto características macro como microscópicas. Para el estudio macroscópico se tuvieron en cuenta las características principales de los grupos microbianos de interés y para la evaluación microscópica se realizó tinción diferencial de Gram para las bacterias esporuladas y gota fresca para levaduras. Una vez seleccionados aquellos aislamientos que presentaron las características macro y microscópicas esperadas, se realizó la siembra de cada microorganismo mediante la técnica de las 5 estrías. Luego, los aislamientos de bacterias aerobias esporuladas se conservaron en Caldo Tripteína Soja (CTS) mientras que los aislamientos de levaduras se conservaron en Caldo Extracto de Malta (CEM), ambos con glicerol al 25%, y fueron almacenados a -80 °C.

Para su identificación, se realizaron cultivos frescos de los microorganismos y fueron derivados al Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral para ser procesados mediante la técnica de MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight*). Una vez identificados los aislamientos se inició con la caracterización tecnológica y funcional. Para ello, se comenzó trabajando con los aislamientos de levaduras, y la primera característica evaluada fue la resistencia a la acidez. La misma se llevó a cabo exponiendo 2 aislamientos de levaduras a un pH de 2, 3 y 4 (Yuma, 2020). Para tal fin, un inóculo controlado de cada aislamiento se incubó en el medio CEM acidificado a cada uno de los distintos pH durante 3 h a 37°C. Se realizaron recuentos microbiológicos utilizando la técnica de recuento en placa en superficie al inicio y al final del ensayo. Finalmente, se realizó una comparación entre el recuento inicial y final. Los resultados se expresaron como muerte celular luego de la exposición a los distintos pH (Δ log UFC/mL). Por otra parte, se comenzó con la caracterización funcional de 7 aislamientos de bacterias aerobias esporuladas, estudiando la capacidad de las mismos de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 y de Salmonella Typhimurium mediante la técnica de *spot test*. (Siroli *et al*, 2017).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Se obtuvieron 48 aislamientos de bacterias mesófilas y 13 de levaduras. Luego de la caracterización macro y microscópica, se seleccionaron 27 de los bacilos aerobios esporulados y todas levaduras.

Las características macroscópicas consideradas para la selección de los bacilos de interés incluyeron consistencia mucoide, bordes lobulados o irregulares, color blanco o claro y aspecto opaco. A nivel microscópico, se seleccionaron bacilos grampositivos con agrupación de a pares y formación de endosporas.

Para las levaduras, se consideraron colonias con color blanco o crema, baja elevación, forma ovoide o redondeada y consistencia cremosa. A nivel microscópico, se evaluaron el crecimiento unicelular, la morfología, el tamaño y los tipos de reproducción, tanto agámica como sexual.

Luego de la identificación por MALDI-TOF, se puedo observar que el mayor porcentaje de aislamientos de bacilos esporulados correspondieron a las especies de *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (Figura 1) y 3 de los aislamientos no pudieron ser identificados por esta metodología por lo cual se va a continuar con su identificación empleando técnicas moleculares.

Existen varias investigaciones recientes que evidencian el potencial probiótico de estas 3 especies mayoritarias aisladas. (Du et al, 2024).

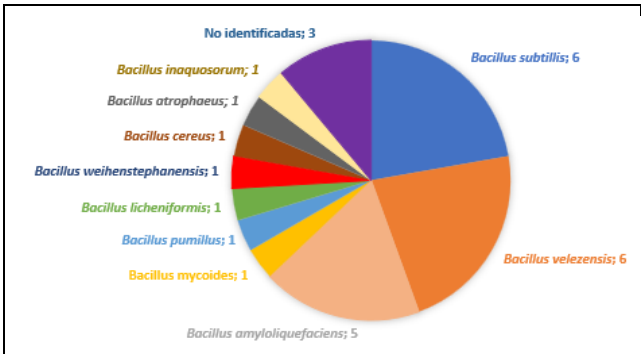

Figura 1: Distribución de las especies de *Bacillus* identificadas.

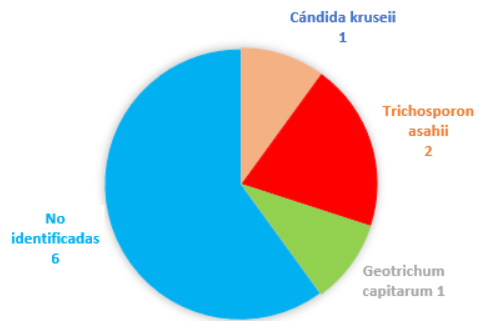

Figura 2: Distribución de especies identificadas en los aislamientos de levaduras

En cuanto a las levaduras 10/13 aislamientos se enviaron para su identificación por MALDI-TOF (Figura 2). De estos, 6/10 no pudieron ser identificados por esta metodología por lo cual se continuará con identificación por amplificación y secuenciación de ADNr. Dado que de los 4 aislamientos identificados 2 correspondían a los hongos filamentosos como *Trichosporon asahii y Geotrichum capitarum,* estos fueron desestimados para los estudios siguientes.

En relación a las pruebas de tolerancia a acidez, la misma se realizó hasta el momento para 2 aislamientos de levaduras. En la Figura 3 se puede observar que el aislamiento LDI1 mostro muerte celular a todos los pH evaluados, mientras que el aislamiento LDI2 a pH 2 evidenció crecimiento luego de las 3 horas y a pH 4 mantuvo la viabilidad celular.

Por otro lado, de los 7 aislamientos de bacilos evaluados en las pruebas de antagonismo, sólo 2 aislamientos [G1HE1 (*Bacillus subtilis)* Y G2LE9 (*Bacillus* sp.)] *mostraron* capacidad inhibitoria en el crecimiento de *Salmonella* Typhimurium *y Escherichia coli* (Tabla 1) y EDI 7 (*Bacillus amyloliquefaciens)* mostró capacidad inhibitoria para *Escherichia coli*.

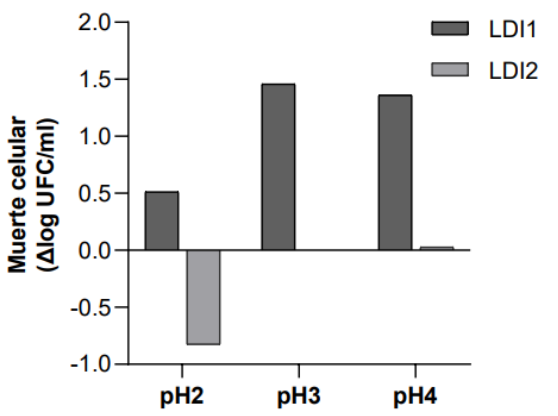

Figura 3: Muerte celular (Δ log UFC/ml) para cada microorganismo luego de ser sometido a diferentes pH. LDI1 y LDI2 corresponden los aislamientos de levaduras evaluados.

Tabla 1: Efecto inhibitorio del crecimiento de los distintos aislamientos estudiados. + (formación de halo)/ - (ausencia de halo).

Aislamiento	*Escherichia coli*	*Salmonella Typhirmurium*
G1HE1(*Bacillus subtilis*)	+	+
EDI 7(*Bacillus amyloliquefaciens*)	+	-
EDI 11(*Bacillus mycoides*)	-	-
EDI 15(*Bacillus licheniformis*)	-	-
EDI 16(*Bacillus pumillis)*	-	-
G2LE9(No identificado)	+	+
G2RE4(*Bacillus weihenstephanensis*)	-	-

En conclusión, en este trabajo se aislaron 27 bacilos aerobios esporulados, de los cuales 24 fueron identificados hasta el rango taxonómico de especie. De estos aislamientos un 66% pertenecen a especies con potencial probiótico según estudios previos (Brutscher *et al*,2024).

De los aislamientos de levadura, solo cuatro pudieron ser identificados hasta el nivel de especie. De estos, únicamente uno se identificó como una especie de interés con potencial para aplicaciones probióticas, según informes previos (Chu *et al*, 2023).

En cuanto a la caracterización tecnológica evaluada hasta el momento, sólo una de las levaduras mostró tolerancia a pH 2 y 4.

Con respecto a las pruebas de antagonismo, sólo 2 de los aislamientos G1HE1 y G2LE9 evidenciaron actividad frente a *E. coli* y S. Typhimurium y 1 aislamiento EDI 7 frente a *E. coli.*

Los resultados presentados en este trabajo, si bien son preliminares, son prometedores ya que se obtuvieron en un alto porcentaje especies reportadas en bibliografía con potencial probiótico.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

-**Ruiz Sella, S. R. B., Bueno, T., de Oliveira, A. A. B., Karp, S. G., & Soccol, C. R**. (2021). *Bacillus subtilis natto as a potential probiotic in animal nutrition*. *Critical Reviews in Biotechnology*, *41*(3), 355-369.

-**Yuma, YS.** (2018). Isolation and Characterization of Yeast as Potential Probiotics from Fermented Cereals Dough. Journal of Veterinary Medicine and Research, 7(6): 1202.

-**Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Parolin, C. Ñ., Palomino, R. A, Vitali, B., Lanciotti, R.** (2017). Determination of antibacterial and technological properties of vaginal lactobacilli for their potential application in dairy products. Frontiers in Microbiology, 8:166.

- **Du, H., Yao, W., Kulyar, M. F.-e.-A., Ding, Y., Zhu, H., Pan, H., Li, K., Bhutta, Z. A., & Liu, S.** (2024). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* TL106 isolated from Tibetan pigs on probiotic potential and intestinal microbes in weaned piglets. *Journal of Probiotic Research*, *15*(2), 123-135.

- **Brutscher, L. M., Gebrechristos, S., Garvey, S. M., & Spears, J. L.** (2024). Genetic and phenotypic characterization of *Bacillus velezensis* strain BV379 for human probiotic applications. *Microorganisms, 12*(3), 436.

- **Ye, Jingkang & Wu, Haiyang & Feng, Li & Huang, Qinghua & Li, Qingxin & Liao, Weiming & Wu, Jin.** (2024). Characterization of Bacillus amyloliquefaciens PM415 as a potential bio-preserving probiotic. Archives of Microbiology. 206.