

COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LOS SUPLEMENTOS REDUCTORES DE OXÍGENO DISUELTO SOBRE EL RECuento DE BIFIDOBACTERIUM SPP.*

COMPARISON EFFECT OF DISSOLVED OXYGEN REDUCE SUPPLEMENTS ON THE ENUMERATION OF BIFIDOBACTERIUM SPP.

*Virginia Medina*¹; *Blanca Barrios*² y *Tony Garcia*³

*Tesis de Maestría del Área de Postgrado, UNELLEZ-San Carlos

¹MSc. (UNELLEZ). Tecnológico de Acarigua, Acarigua, Estado Portuguesa, Venezuela.

²MSc. (UNELLEZ). UNEFA, Tinaquillo, Estado Cojedes, Venezuela.

³MSc. (UNELLEZ). Tutor Académico. Programa Ingeniería Agroindustrial.

Decanato de Agronomía. UCLA. Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela.

Email: tonnygarcia@gmail.com

Recibido: 25-10-2006 / Aceptado: 23-01-2007

RESUMEN

La recuperación de un cultivo puro liofilizado de *Bifidobacterium spp.*, en caldo de MRS (Man Rogosa and Sharpe), bajo dos condiciones de suplementación, L-Cisteína-HCL y L-Cisteína, con concentración de 0,05% (p/v), se les evaluó la densidad celular, mediante lecturas espectrofotométricas a una longitud de onda de 600 nm. Adicionalmente, se realizó una enumeración de colonias, a través de un recuento en placa, utilizando como medio de crecimiento el agar MRS, haciendo siembras en las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} ; manteniéndose, la suplementación antes mencionada. Al comparar si existía diferencia significativa entre los suplementos utilizados se encontró que ambos son diferentes, es decir, el mayor crecimiento microbiano, tanto en lecturas de densidad celular como Log de ufc/g, se debe al efecto de la L-Cisteína bajo las condiciones de estudio.

Palabras clave: *Cultivo puro liofilizado, Bifidobacterium spp, densidad celular, caldo MRS.*

SUMMARY

The recovery of lyophilized pure culture of *Bifidobacterium spp*, in broth of MRS (Man Rogosa and Sharpe), under two supplementation conditions, L-cysteine-HCL and L-cysteine, with concentration of 0,05% (m/v), the cellular density were, by means of readings espectrofotometricas to a wavelength of 600 nm. Additionally, was carried out by counting of colonies, through a recount in badge, using medium of MRS the agar, making isolation in the dilutions 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} ; maintaining the supplementation mentioned before. When comparing if significant difference existed among the utilized supplements it was found that both are different, that is to say, the biggest microbial growth, also in readings of cellular density as ufc/ gr Log, is due to the effect of the L-cysteine under the study conditions.

Keywords: *lyophilized pure culture, Bifidobacterium spp, cellular density, MRS broth*

INTRODUCCIÓN

Las Bifidobacterias han sido frecuentemente descritas como “probióticos”, palabra de origen griego que significa “a favor de la vida”; término que se ha utilizado para definir aquellas bacterias que tienen efectos benéficos sobre la salud del hospedero, manteniendo una relación simbiótica, mientras habita en el tracto gastrointestinal.

Este grupo se caracterizan por ser bacilos gram-positivos, inmóviles, no esporulados, y catalasa negativo. Su morfología celular se presenta como bacilos de forma variada característica como bastones únicos o en cadena, en forma de “Y” o “V” agrupados, sus extremos por lo general muestran protuberancias y pueden o no tener una o más ramificaciones (Salminen et al., 1.993). Es anaerobio estricto; pueden fermentar un amplio rango de sustratos, incluyendo la lactosa. Pueden no crecer a temperaturas menores de 20° C y en general no son termorresistentes a temperaturas por debajo de los 46 °C. Presenta un estrecho rango de pH óptimo para el crecimiento comprendido entre 6,5 a 7 y no presenta crecimiento a pH inferior a 5 y superior a 8 (Tamine, 1995).

Investigaciones desarrolladas en esta área, han reportado que las Bifidobacterias compiten por la colonización en el intestino (Hoover, 1993) y a través de ensayos realizados in vitro y en animales, se ha demostrado que previenen la infección, estimulando el sistema inmunológico, síntesis de la vitamina del complejo B , mejora la tolerancia a la lactosa además de efectos antitumorogénicos y anticancerígenos (Ishibashi and Shimamura, 1993). Por tal motivo es que se han elaborado una diversidad de preparados a partir de probióticos, con la finalidad de combatir la diarrea en niños y el estreñimiento en ancianos. Estos preparados han sido incorporados a varios productos de origen lácteos tales como: helados, yogurt, leches fermentadas entre otros. También se han combinado con otros microorganismos como: *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus bulgaricus* y *acidophilus*. Para el momento de consumo de estos productos, se debe mantener una concentración superior a 10⁶ ufc/g del microorganismo, confiriéndole las propiedades benéficas antes mencionados (Samona and Robinson, 1991). Debido a ello, es importante conocer durante la elaboración como al momento de distribución del producto, el recuento viable de Bifidobacterias.

Desafortunadamente, la viabilidad y recuperación de las cepas liofilizadas de

Bífidobacterias, ha sido difícil de evaluar ya que diferentes medios de cultivos reportados en la literatura, no son suficientemente selectivos para estos; inhibiendo su crecimiento, resultando recuentos inadecuadamente bajos (Payne et al., 1999).

Existen varios factores que pueden ocasionar lesión a las células, como lo es: la temperatura, pH y principalmente el oxígeno pues la presencia de este último en el medio de recuperación y enumeración es letal.

Su sensibilidad al oxígeno, se debe a su incapacidad de eliminar los productos tóxicos derivados del oxígeno metabolizado.

Cuando se reduce el oxígeno, se producen algunos elementos tóxicos tales como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilo (OH^-). Muchos anaerobios estrictos son ricos en enzimas flavínicas, que reaccionan espontáneamente con el oxígeno y de no presentar enzimas como: Super-oxido dismutasa y la catalasa, el microorganismo está indefenso ante efectos nocivos del superóxido y del peróxido de hidrógeno acumulados.

Para solventar este inconveniente de autooxidación, los medios deben ser prerreducidos, por ello encontramos estudios realizados para comparar medios de recuperación y enumeración selectiva para Bifidobacteria, que difieren en su composición, pero en la mayoría de los casos son suplementados con L-Cisteína HCL al 0,05 % (p/v) que actúa como agente reductor del contenido de oxígeno. Además sirve como fuente esencial de nitrógeno, pero en estudios aislados, se ha reportado la aplicación de otro suplemento como L-Cisteína en agar modificado VF-Bouillon (extracto de hígado y carne magra de vacuno), obteniéndose como resultado en este último, el 99 % del organismo probiótico recuperado (Caliccia et al 1993., citado por Payne et al 1999).

Considerando todo lo antes discutido se realizó una investigación para comparar el efecto de los suplementos L-Cisteína HCL y L-Cisteína al 0,05 % (p/v) sobre el recuento de *Bifidobacterium spp* en caldo y agar MRS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Partiendo de una cepa comercial de *Bifidobacterium spp.* (Chr. Hasen Laboratories), en forma de cultivo puro liofilizado, el cual debía ser reconstituido, inoculando el 9 % (p/v) de dicha cepa en cada de los tubos de ensayo con tapa de rosca (seis repeticiones), los cuales contenían caldo MRS previamente estéril y al mismo tiempo se procedió a adicionar 0,05% (p/v) de L-Cisteína HCL constituyéndose una unidad experimental. De igual manera fue inoculado otros seis tubos con tapa de rosca que contenían el mismo caldo estéril, pero le fue añadido L-Cisteína, manteniendo la misma concentración, conformándose la segunda unidad experimental. Posteriormente se procedió a incubar bajo condiciones anaeróbicas a una temperatura de 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido este período de tiempo, se procedió a transferir todo el contenido de los tubos incubados a otra batería de tubos con tapa de rosca que contenían caldo estéril y el suplemento correspondiente, manteniéndose la concentración inicial de 9 %;

incubándose nuevamente bajo las condiciones ya descritas. Transcurridas las 24 horas el microorganismo ya se encuentra reconstituido, por lo tanto se comenzó a estimar el crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría, realizando lecturas de absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro digital marca Baush Lomb modelo 20, a cada tubo que complementa ambas unidades experimentales, obteniéndose así la densidad celular y al mismo tiempo, se realizó una siembra por profundidad en placas de Petri desechables, a partir de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} preparados con agua peptonada al 0,1 % también para cada tubo de ensayo de ambas unidades experimentales. En cada placa se aplicó una sobrecapa de agar para garantizar las condiciones anaeróbicas, además de adicionarle a dicha cubierta un agente antibiótico denominado Polimixina B al 0,005 % (p/v), luego las placas fueron incubadas en condiciones anaeróbicas del sistema de jarra Gaspak BBL a 37 °C durante 72 horas, quedando así determinado el número de células viables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1, se observa que las muestras donde se adicionó el suplemento HCL- Cisteína registra menores valores en; absorbancia y Log ufc/g de *Bifidobacterium spp.* que las unidades experimentales tratadas con L-Cisteína, siendo esto indicativo que el mayor crecimiento microbiano ocurrió en las unidades experimentales con el suplemento L-Cisteína.

Al realizar un análisis de correlación de Pearson a las respuestas bajo estudio se encontró que existía una alta correlación negativa entre la respuesta Tramitancia y absorbancia (-0,9903); mientras que la correlaciones de la tramitancia y absorbancia con respecto al Log ufc/g no tenían efecto significativo. (Probabilidad > 5%)

Cuadro 1. Valores de espectrofotometría y recuentos del *Bifidobacterium spp.* por efecto de los reductores de oxígeno.

Suplemento	absorbancia	Tramitancia	Log ufc/g
HCL- Cisteína	1,769	1,7	9,20
	1,856	1,4	8,48
	1,866	1,4	8,48
	1,894	1,3	8,60
	1,856	1,4	8,48
	1,888	1,3	8,48
L_ cisteína	1,872	1,4	8,90
	1,950	1,1	9,00
	1,981	1,1	9,26
	1,999	1,0	9,00
	1,999	1,0	9,30
	1,936	1,2	9,18

Análisis de la respuesta Recuento *Bifidobacterium* spp. (Log ufc/g).

Para comprobar si existe diferencia estadística significativa se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (K-W), ya que los datos de la respuesta Log ufc/g no cumplieron con los supuestos del análisis de la varianza. Cochran's =0,92 y Bartlett's =1,84 tienen efecto significativo, es decir no existe varianza constante en los datos. Al verificar la normalidad se encontró valores superiores al rango -2 y 2. De curtosis y sesgo estandarizada expuesto por ascombe y tukey, (1953).

Los resultados del análisis de varianza de K W y pruebas de medias de rangos se observa en el cuadro 2 y 3, respectivamente. Del cuadro 2, se puede inferir que existe diferencia significativa entre los suplementos utilizados para el crecimiento del *Bifidobacterium* spp. Con un nivel de confianza del 5%. Al estudiar el cuadro 3. Se observa que no existe homogeneidad entre los grupos, es decir, son diferentes estadísticamente. Esto indica que el suplemento L-Cisteína por poseer el mayor rango de media es el que causa un efecto mayor sobre el crecimiento del *Bifidobacterium* spp., bajo las condiciones de estudio. Resultados semejantes encontró Caliccia et al., (1993) donde sustituyó HCL Cisteína por L- Cisteína como suplemento logró mayor tasa de crecimiento de organismos probióticos. Payne et al., (1999) contrariamente reportó un efecto inhibitor de crecimiento en medios selectivos con L- Cisteína.

Cuadro 2. Análisis de varianza de K-W para rangos del recuento en log ufc/g del *Bifidobacterium* spp. Por efecto de los suplemento. HCL y L -Cisteína.

FV	gl	SC	CM	χ^2	P
Suplemento	1	65,53	65,53	9,05	0,01
error	10	72,17	7,22		
Total	11	137,50			

Análisis de la respuesta Tramitancia y Absorbancia.

En el cuadro 4, refleja las pruebas de rangos múltiples por Duncan al 95% aplicadas a las variables tramitancia y absorbancia. Al visualizar la columna de grupos homogéneos se observó que para ambas variables no existía diferencia entre grupo, es decir que no hay efecto alguno de los suplementos adicionados sobre las respuestas tramitancia y absorbancia, lo cual indica que estas variables no explican directamente el crecimiento del microorganismo.

Cuadro 3. Comparación de las medias de los rangos del recuento en log ufc/g del *Bifidobacterium* spp. Por efecto de los suplemento. HCL y L -cisteína.

Respuesta	Suplemento	Medias	Grupo Homogéneos
Absorbancia	L -cisteína	1,85	I
	HCL-cisteína	1,85	I
Tramitancia	L -cisteína	1,42	I
	HCL-cisteína	1,42	I

Cuadro 4. Comparación de medias para las respuestas: Tramitancia y absorbancia aplicando Duncan al 95%

Suplemento	Rangos de medias	Homogeneidad de grupos
L-cisteína	8,83	I
HCL-cisteína	4,17	II

CONCLUSIONES

- Existe diferencia significativa en el crecimiento de *Bifidobacterium* spp. por efecto del agente reductor de oxígeno.
- El mayor efecto sobre el crecimiento del microorganismo ocurrió en las unidades tratadas con L-Cisteína,
- No existe diferencia significativa entre el crecimiento (ufc/g) del microorganismo y la tramitancia del medio.
- No existe correlación significativa entre el crecimiento (ufc/g) del microorganismo y la absorbancia del medio.
- Las respuestas tramitancia y absorbancia no poseen sensibilidad para indicar los cambios por crecimiento del *Bifidobacterium* spp.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASCOMBE, F.J. AND TUKEY, J.W. 1963. The examination and analysis of residuals. *Technometrics* 5 (2): 141 -160
- HOOVER, D.G. 1993 *Bifidobacteria: activity and potential benefits.* *Food Tecnology.* 47, 120-124.
- HUGHES, D. AND HOOVER, D. 1991. *Bifidobacteria: Their Potential for Use in American Dairy Products.* *Food Tecnology.* 45 (4). 74-83.

- ISHIBASHI, N. AND SHIMAMURA, S. 1993 Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food Technology* 47, 126-135.
- PAYNE, J.F., MORRIS, A.E.J. AND BEERS P. 1999 Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* spp. in milk. *Journal of Applied Microbiology* 86, 353-358.
- SALMINEN, S., ISOLAURI, E. AND SALMINEN, E. 1993. Clinical uses of Probiotics for Stabilizing the Gut Mucosal Barrier Successful Strains and Future Challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70: 347-358.
- SAMONA, A. AND ROBINSON, R.K. 1991 Enumeration of Bifidobacteria in dairy products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 44, 64-66.
- TAMINE, A., MARSHALL, V. AND ROBINSON, R. 1995. Microbiological and Technological Aspects of Milk Fermented By Bifidobacteria. *Journal of Dairy Research*. 62, 151-187.