

Supervivencia de cepas probióticas encapsuladas destinadas a terneros jóvenes frente condiciones gastrointestinales simuladas.

Astesana, D.M.¹; Zbrun, M.V.^{1,2}; Olivero, C.R.¹; Signorini, M.L.^{2,3}; Martí, E.L.²; Sequeira, G.J.²; Soto, L.P.^{1,2}

¹Laboratorio de Análisis de alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina. ²Dpto. de Salud Pública, Facultad de Ciencias veterinarias, UNL. ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Rafaela (CONICET-INTA). diego_fidela@hotmail.com

Los probióticos son definidos por la organización mundial de la salud como “microorganismos vivos, que administrados en un adecuado número, confieren beneficios al hospedador”¹. Varios factores como el proceso de producción, las condiciones de almacenamiento y las bio-barreras del hospedador, desafían inevitablemente la supervivencia de las bacterias probióticas. Para que ejerzan su efecto beneficioso, los probióticos deben estar presentes a un nivel mínimo (NMS) de 6 o 7 log UFC/g en el alimento a consumir o una ingesta diaria mínima de 8 log UFC². La utilización de cápsulas de tamaño similar al pellet del alimento balanceado iniciador (macrocápsulas), puede facilitar su administración a los terneros junto con la alimentación³. El objetivo de este estudio fue evaluar la tasa de supervivencia de dos cepas de *Lactobacillus* encapsuladas en condiciones gastrointestinales simuladas. Las cepas estudiadas fueron *L. casei* DSPV 318T y *L. plantarum* DSPV 354T, de origen bovino. Ambas cepas fueron activadas en placas con medio MRS (Man Rogosa Sharpe), a 37°C por 72 h en anaerobiosis. Luego se realizaron dos cultivos consecutivos, ambas cepas por separado, en caldo MRS a 37°C durante 16 h. Posteriormente fueron cultivadas, en co-cultivo, en un medio líquido desarrollado en el “Laboratorio de Análisis de Alimentos del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet UNL-CONICET)”, el cual contenía: permeado de suero de queso (60 g/l), extracto de levadura 50 (g/l), MgSO₄. (0,2 g/l), MnSO₄ (0,003 g/l) y tween 80 (1 g/l). Una vez concluido el tiempo de crecimiento del inóculo, el mismo fue neutralizado (pH 6,5) con solución NaOH estéril y posteriormente centrifugado a 4500 g por 15 min. El sedimento obtenido se resuspendió en suero de queso para obtener una suspensión que contenía aproximadamente 11 log UFC/ml. Posteriormente le fue agregada una solución de alginato de sodio y glicerina en proporción 70:30 con respecto al medio de cultivo. La concentración final en la macrocápsula (CAP) para el alginato de sodio fue de 20 g/l y de 75 g/l para la glicerina. Esta mezcla fue depositada en moldes de 1 ml y posteriormente almacenados a -20°C durante 8 h para solidificar el contenido. Posteriormente, fueron sumergidos, primero en agua hirviendo durante tres segundos, para despegar las CAP del molde y luego en una solución de 0,1M CaCl₂ durante 1 h para que el alginato polimerice. Luego, las cápsulas fueron recuperadas por filtración y fueron llevadas a freezer -80°C por 8 h para su posterior liofilización. La misma se llevó a cabo durante 12 h con una presión de 0,06 mbar y una temperatura de -54°C. Las CAP fueron conservadas en freezer -20 °C hasta su utilización. Para llevar a cabo la digestión *in vitro* las CAP se incubaron en 9 ml de solución de jugo gástrico simulado (JGS) que tenía 3 g/l de pepsina y pH 2 a 37°C durante 2 h. Posteriormente, se simuló la solución de jugo intestinal simulado (JIS) para lo cual, el pH de la solución se ajustó a 5,0 (pH similar al del duodeno de los terneros) y se adicionó pancreatina (1 g/l) y sales biliares (1,8 g/l) y se incubó nuevamente a 37°C por 2 h. Por último, el pH se ajustó a 7,5 (pH similar a la porción distal del intestino delgado de los terneros) y se mantuvieron las concentraciones de sales biliares y de tripsina. Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 h para un total de 6 h de análisis. Como control, se realizó el mismo tratamiento a bacterias no capsuladas (CNE). Para esto se realizó un cultivo fresco de las dos cepas probióticas en medio de suero de queso. Una vez finalizado el tiempo de incubación las cepas probióticas se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con buffer PBS. Posteriormente se resuspendió en 9 ml de JGS (con una concentración de 10⁹ UFC/ml) y se procedió de la misma manera descripta anteriormente. La

V JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

Noviembre 2017 · Esperanza · Santa Fe · Argentina

ÁREA TEMÁTICA: **PRODUCCION ANIMAL**

viabilidad bacteriana fue evaluada a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas de incubación, mediante recuento en placa. Para esto, se realizaron diluciones decimales seriadas en agua peptonada bufferada. A continuación, se sembraron en placas con agar MRS y se incubaron a 37°C durante 72 h en anaerobiosis. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La diferencia de viabilidad bacteriana entre las CNE y las CAP se analizó utilizando un ANOVA de medidas repetidas. La pérdida de viabilidad bacteriana a través del tiempo se analizó utilizando un ANOVA de una vía. Se consideró que existía una diferencia significativas cuando $P < 0,05$. En cuanto a los resultados, la viabilidad de las cepas probióticas, frente a las condiciones gastrointestinales simuladas, fue mayor en las CAP que para las CNE a lo largo del ensayo ($p < 0,001$). En el tiempo cero los recuentos bacterianos fueron de 11,17 log UFC/ml y 9,52 log UFC/ml para las CAP y las CNE respectivamente. La viabilidad de las CNE se redujo significativamente a partir de la primera hora de ensayo ($p < 0,001$) siendo la tasa de supervivencia del 61% (5,76 log UFC/CAP), habiendo una pérdida de viabilidad de 3,75 log UFC/ml. En cambio en las CAP se redujo significativamente la viabilidad a partir de la segunda hora de ensayo ($p < 0,001$) siendo la tasa de supervivencia del 97% (10,80 log UFC/CAP), habiendo una pérdida de viabilidad de 0,37 log UFC/CAP. Posteriormente, luego de 2 h de digestión en JIS a pH5, se observó una pérdida de 0,81 log (UFC/CAP) para las CAP y de 4,15 log UFC/ml para las CNE siendo la tasa de supervivencia de 93% y 49% respectivamente. La tasa de supervivencia al final del ensayo fue 46% para las CNE y del 90 % para las CAP siendo la pérdida de viabilidad de 4,35 Log UFC/ml y de 1,07 log UFC/CAP respectivamente en relación al tiempo 0 ($P < 0,001$). El recuento final fue de 10,1 log UFC/CAP para las CAP y de 5,18 log UFC/ml para las CNE. El presente estudio ha demostrado que la encapsulación de probióticos en una matriz de suero con alginato de sodio y glicerina y posterior liofilización, mejoran significativamente la supervivencia en medio gastrointestinal simulada. Estas macrocápsulas permitirán a los microorganismos llegar viables a su sitio de acción y ejercer un efecto beneficioso para el animal.

Bibliografía

1. FAO/WHO, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Food and agriculture organization of the United Nations and World Health Organization. Córdoba, Argentina.
2. Lian, W. C., Hsiao, H. C., & Chou, C. C. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, 86(3), 293-301.
3. Soto L. P., Frizzo L. S., Avataneo E., Zbrun M. V., Bertozzia E., Sequeira G., Signorini M. L., Rosmini M. R. (2011). Soto, L. P., Frizzo, L. S., Avataneo, E., Zbrun, M. V., Bertozzi, E., Sequeira, G., Signorini M. L & Rosmini, M. R. (2011). Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. *Animal Feed Science and Technology*, 165(3), 176-183.