Estabilidad de las cepas anaerobias *Butyrivibrio fibrisolvens* (B9), *Streptococcus bovis* (C2), *Ruminococcus flavefaciens* (Rf) y *Fibrobacter succinogenes* (Fs) formuladas en un vehículo oleoso

Chaparro Martha Liliana [1], Grijalba Bernal Erika [2], Rodríguez Villamizar Fernando [3], Gómez Álvarez Martha Isabel [4]

[1]Microbióloga Industrial. Investigador AGROSAVIA Sede Central. mlchaparro@agrosavia.co
[2]Químico farmacéutico. Investigador M.Sc. AGROSAVIA Sede Central. egrijalba@agrosavia.co
[3]Zootecnista. Investigador Ph.D. AGROSAVIA Centro de investigación. frodriguez@agrosavia.co
[4]Químico farmacéutico. Investigador Ph.D. AGROSAVIA Sede Central. mgomeza@agrosavia.co

AGROSAVIA seleccionó cuatro bacterias anaerobias ruminales capaces de reducir en un 65 % la incidencia de diarreas en terneros y aumentar su peso corporal. Para estas bacterias se diseñó una formulación oleosa, buscando garantizar la supervivencia de las bacterias anaerobias a través del tiempo. Inicialmente se evaluó la estabilidad de las bacterias *Butyrivibrio fibrisolvens* (B9), *Streptococcus bovis* (C2), *Ruminococcus flavefaciens* (Rf) y *Fibrobacter succinogenes* (Fs) formuladas individualmente y en conjunto. Estas se envasaron en jeringas de polipropileno de alta densidad (12 mL). El estudio siguió un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento para un total de 15 tratamientos. Las muestras fueron almacenadas a 6±2ºC y 18±2ºC durante 6 meses, evaluando la viabilidad de las bacterias y el contenido de contaminantes mediante el método de tubo rodante y recuento en placa respectivamente. Las muestras almacenadas tanto a 6±2ºC y 18±2ºC presentaron un contenido de contaminantes inferior a 10^4 UFC/mL. Con respecto a la viabilidad, los tratamientos que presentaron la mayor pérdida a 6±2ºC fueron las formulaciones que contenían únicamente la cepa C2 (38,12%), y las que contenían mezclas de las cepas C2 con B9; C2, B9 y Fs (21,03%) o C2, B9 y Rf (12,17%). A 18±2ºC, los tratamientos que presentaron mayor pérdida de viabilidad fue el tratamiento que contenían solamente la cepa C2 (38,12 %), la mezcla de C2 y Rf (16,34 %) y C2, B9 y Fs (15,80 %) y C2, B9 y Rf (12,50 %). En general, se encontró que los tratamientos que presentaron la mayor pérdida de viabilidad tanto a 6±2ºC como a 18±2ºC fueron los que incluyeron las cepas *Streptococcus bovis* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, lo que sugiere que estas cepas tanto individualmente como en conjunto fueron menos estables en la formulación, mientras que las formulaciones que contenían las cepas Fs y Rf presentaron la mayor estabilidad en el tiempo. Esto se debe posiblemente, a que las cepas C2 y B9 tienen un metabolismo más rápido, que permite una mayor producción de ácido butírico y acético, y que puede estar afectando la viabilidad de los microorganismos y por tanto causar su muerte.

Introducción

En Colombia la morbilidad de terneros neonatos causada por la incidencia de diarreas puede alcanzar un 60 %, con una mortalidad cercana a un 20 % (Aldana et al., 2009). Para su tratamiento generalmente se emplean antibióticos que disminuye la calidad de la leche y aumentan la resistencia de los patógenos a los agentes antimicrobiales (FAO, 2016). En AGROSAVIA, se seleccionó un coctel microbiano formado por bacterias aisladas de bovinos nativos, que consistió en cuatro bacterias ruminales anaerobias que redujeron la incidencia de diarreas hasta en un 65 % en terneros neonatos. Para estas bacterias se diseñó una formulación (emulsión) que busca proteger a las bacterias reduciendo su contacto con oxígeno.

Objetivo

Determinar la estabilidad después de 6 meses de almacenamiento a 6±2ºC y 18±2ºC de las formulaciones a base de las bacterias *Butyrivibrio fibrisolvens, Streptococcus bovis, Ruminococcus flavefaciens y Fibrobacter succinogenes*

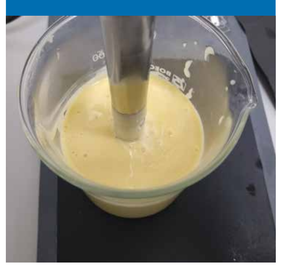
Metodología

Proceso General de Elaboración de la Formulación

FERMENTACIÓN DE BACTERIAS

39±2ºC, 600 mL, caldo de crecimiento para anaerobios

FORMULACIÓN



Mezcla fase acuosa (bacterias fermentadas) y fase oleosa, ultraturrax IKA T18®, 14.000 rpm

ALMACENAMIENTO

6 meses, 6±2ºC y 18±2ºC en jeringas de polipropileno (12mL)

Formulaciones	Cepas
T1	C2
T2	B9
T3	C2, B9
T4	C2,B9, Rf
T5	C2, B9, Fs, Rf
T6	B9,Fs
T7	C2,B9,Fs
T8	Rf
T9	Fs, Rf
T10	C2, Fs, Rf
T11	Fs
T12	C2, Fs
T13	B9, Rf
T14	B9, Rf, Fs
T15	C2, Rf

VARIABLES EVALUADAS

- Pérdida de Viabilidad (%): Técnica "Roll tube" en Medio para microorganismos anaerobios (Hungate, 1969).
- Contaminantes (UFC/mL):
  Recuento en placa de bacterias: Agar Nutritivo, 37ºC, 24 horas
  Recuento en placa de hongos: Agar PDA, 25ºC, 7 días.

Diseño experimental completamente al azar con 15 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento.
Unidad experimental: jeringa de polipropileno (12 mL).
Análisis de datos con el programa Statistix 8.0

Resultados y Discusión

Las formulaciones a base de las cepas de *Streptococcus bovis y Butyrivibrio fibrisolvens* y algunas formulaciones con estas cepas combinadas fueron las que presentaron la mayor pérdida de viabilidad después de 6 meses de almacenamiento a las dos temperaturas (T1, T2, T7 y T4). Esto se debe posiblemente a que *Streptococcus bovis* tiene un metabolismo y un crecimiento rápido (Zanine et al. ,2016; klieve et al., 2003.) y las dos bacterias generan una gran cantidad de ácidos grasos volátiles como ácido butírico, acético, propiónico y láctico (Kalmokoff., et al 2000; Zanine et al.,2016) que en grandes cantidades puede afectar la viabilidad de los microorganismos llegando a causarles la muerte. En general los demás tratamientos presentaron una pérdida de viabilidad inferior al 20 % debido a la protección que genera la formulación sobre las bacterias.

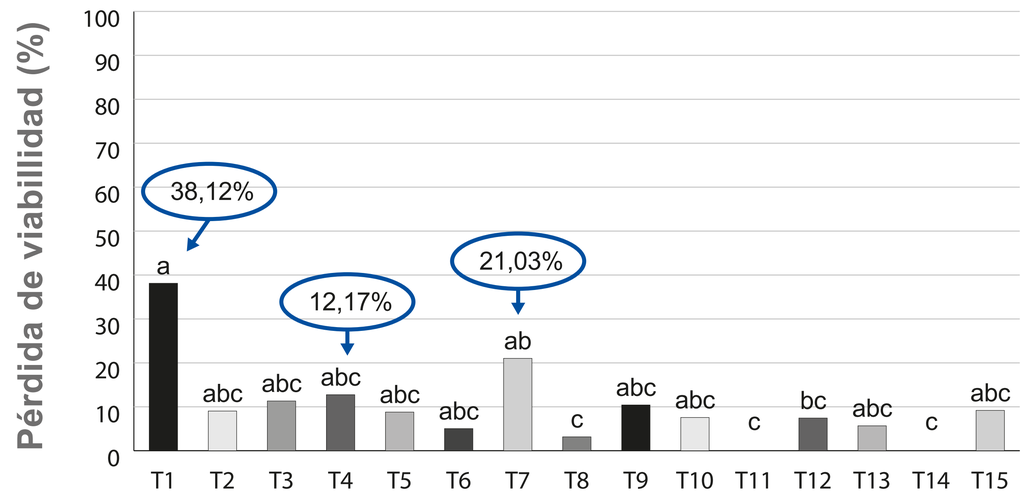


Figura 1. Pérdida de viabilidad de las bacterias formuladas individualmente y en conjunto almacenadas a 6±2ºC. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis con intervalo de confianza del 95 %.

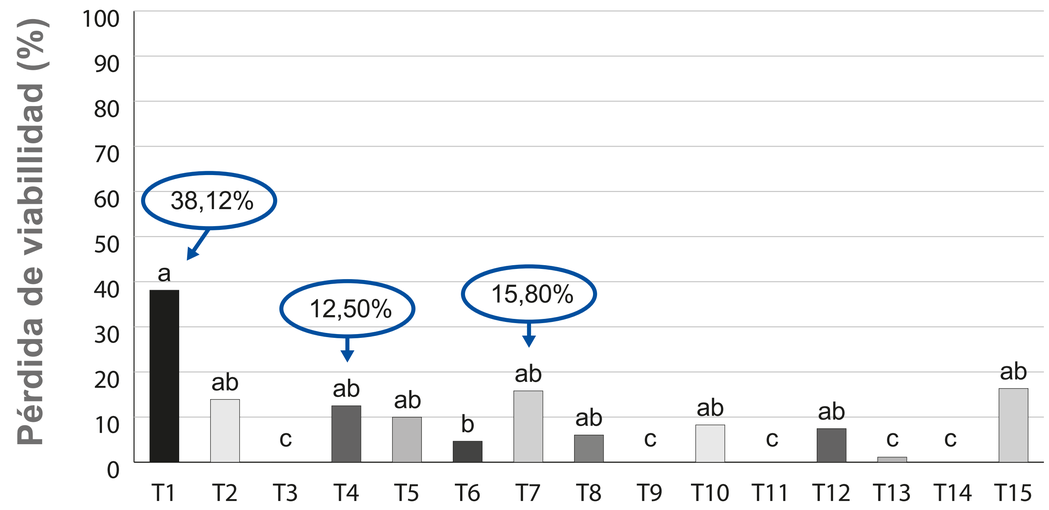


Figura 2. Pérdida de viabilidad de las bacterias formuladas individualmente y en conjunto almacenadas a 18±2ºC. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Kruskal-Wallis con intervalo de confianza del 95 %.

Conclusiones

- Las cepas *Streptococcus bovis y Butyrivibrio fibrisolvens* formuladas indiviualmente y combinadas en la misma formulación son menos estables que las otras cepas a 6±2ºC y 18±2ºC.
- Las cepas *Fibrobacter succinogenes* sola y combinada con otras bacterias fue la bacteria que presento mayor estabilidad a 6±2ºC y 18±2ºC

Bibliografía

- Aldana C, Cabra S.M, Ospina C.A, Carvajal F, Rodríguez F. (2009). Effect of a probiotic compound in rumen development, diarrhea incidence and weight gain in young Holstein calves. WASET: World Academy of Sciences. Engineering and Technology. Vol. 57. Pág. 510-513.
- Hungate, R.E. (1969) A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. In Methods in Microbiology ed. Norris., J.R. and Ribbons, D.W. London: Academic Press. Pág. 117–132.
- Zanine A, Alencar E, Lima de Souza A, Ferreira D, Santos E, Divino M, Valerio L.J, Araujo R.M. (2016). Effects of Streptococcus bovis Isolated from Bovine Rumen on the Fermentation Characteristics and Nutritive Value of Tanzania Grass Silage. The Scientific World Journal. Vol. 2016. Pág.1-6.
- Klieve A.V, Henness D, Ouwerkerk D, Forster R.J, Mackie R.I, Attwood G.T. (2003). Establishing populations of Megasphaera elsdenii YE 34 and Butyrivibrio fibrisolvens YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. Journal of Applied Microbiology. Vol. 95. Pág. 621–630.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR por la financiación de este proyecto