

Aplicación de fluorocromos para el estudio de la viabilidad de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) presentes en productos lácteos

Viability of Lactic Acid Bacteria (LAB) in dairy products by using fluorescent dyes

MORENO, Y.; HERNÁNDEZ, M.; COLLADO, M. C. Y HERNÁNDEZ, E.

Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, 14, 46002 Valencia.
Ehernand@btc.upv.es

RESUMEN

Se estudió la viabilidad de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) procedentes de diversas leches fermentadas de origen comercial, almacenadas en refrigeración a 4°C. Las bacterias viables y cultivables fueron enumeradas en los medios TPY (Bifidobacterias), MRS (Lactobacilos) y M17 (Estreptococos). Los recuentos totales (viables y muertas) se llevaron a cabo mediante el uso del sistema comercial LIVE/DEAD® Bac Light™ VIABILITY. La viabilidad de las BAL fue estudiada antes y después de la fecha de caducidad de los productos lácteos. Las bacterias procedentes de los distintos productos analizados presentaron diferencias en su viabilidad. Las BAL deben permanecer vivas en los productos para poder ejercer beneficios para la salud tras el consumo de los mismos. La técnica de recuento microbiano basada en el uso de fluorocromos, es una vía rápida y efectiva para la enumeración de microorganismos viables y no viables en productos lácteos, evitando la utilización de los tediosos medios tradicionales.

PALABRAS CLAVE: BAL, viabilidad, fluorocromos.

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) viability during the storage of several commercial fermented milks at 4°C was studied. Viable culturable bacteria were enumerated on TPY (Bifidobacteria), MRS (Lactobacilli) and M17 (Streptococci) culture media. Total counts (viable and dead) were made by using LIVE/DEAD® Bac Light™ VIABILITY kit. Viability was monitored before and after expiration date of the dairy products. Bacteria analysed showed a different viability behaviour. LAB must survive in the product in order to obtain a health benefit from them. The microbial counting technique by using fluorescent dyes is a rapid and effective way of enumerating both viable and dead microorganisms in dairy products avoiding the tedious traditional methods.

KEYWORDS: LAB, viability, fluorescent dyes.

INTRODUCCIÓN

La leche fermentada en general, y más concretamente el yogur tiene la propiedad de contener microorganismos vivos que les confieren cualidades organolépticas y nutricionales. Estos productos se consideran probióticos ya que al ingerirse en ciertas cantidades, ejercen efectos beneficiosos para la salud (Schaafsma

1996a,1996b). Las bacterias lácticas consideradas como probióticos son entre otras *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*.

Los efectos de las BAL sobre la salud son muy variados, se puede destacar el mantenimiento de la flora intestinal, mejora de la digestión de la

lactosa, actividad inmunomodulante, actividad anticancerígena y reducción de los niveles de colesterol.(Sanders 1993; Tannock 1999).

Pero la presencia de bacterias lácticas vivas exige que se respeten algunos imperativos de conservación y de fecha de caducidad, para garantizar a los consumidores todos los beneficios.

Se ha sugerido que para que las bacterias lácticas ejerzan su acción como probióticos deben llegar al intestino vivas y en una cantidad suficiente (10^6 - 10^7 bacterias/mL) para que se puedan apreciar sus efectos y consigan adherirse, implantarse o multiplicarse en el tracto intestinal(Kurmann y Rasic 1991; Bouhnik 1993). Por todo ello, es de especial interés mantener la viabilidad de las bacterias lácticas(Anonymous 1998).

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la viabilidad de las BAL en productos lácteos durante su almacenamiento a 4°C.

Debido a los problemas derivados de los métodos tradicionales de recuento, como la elección de un medio de cultivo adecuado, la utilización de atmósferas controladas y los largos periodos de incubación, se puso a punto una técnica de recuento basada en la tinción de las células con los fluorocromos SYTO9 y yoduro de propidio (PI). La aplicación de fluorocromos permite realizar recuentos de bacterias sin la necesidad de recurrir a los tediosos métodos culturales y en un breve período de tiempo(Beimfohr et al. 1993).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de yogur

Las muestras fueron productos comerciales que contenían bifidobacterias además de los fermentos tradicionales de yogur como son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*. Todas las muestras de yogur se almacenaron a 4°C durante la duración del estudio. En el etiquetado de todos los yogures comerciales estaba indicada la presencia de fermentos ácido lácticos viables y bifidobacterias. Las muestras se estudiaron a diferentes intervalos que van desde 2-3 semanas antes y después de su caducidad.

Enumeración de bacterias ácidas lácticas

Para los recuentos bacterianos de los productos lácteos, se preparó una primera dilución usando 90 mL de agua de peptona tamponada (25,5 g/L) (Sigma) a la que se añadieron 10 mL de muestra. A partir de la misma, se realizaron una serie de diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} , en tubos de 9 mL de agua destilada con polisorbato 80 (4mL/L). Los diluyentes fueron previamente esterilizados a 121°C durante 15 minutos en el autoclave.

Se emplearon distintos medios de cultivo para la enumeración de las BAL de los distintos productos lácteos a estudiar. En el medio general LS-Diferencial *Lactobacillus delbrueckii* crece en forma de colonias lobuladas rojas de 1-1,5 mm de diámetro rodeadas de una zona blanca opaca

y *Streptococcus thermophilus* crece en este medio formando colonias ovales o redondas de aproximadamente 0,5 mm de diámetro como máximo con un pequeño halo claro a su alrededor. También crecen bifidobacterias (Nebra y Blanch 1999) que aparecen como pequeñas colonias rojas sin halo a su alrededor. Para enumerar *Lactobacillus* se empleo el medio para lactobacilos MRS (Man Rogosa y Sharpe) (Merck) y para *Streptococcus* se usó el medio específico M-17 (Merck). Para el recuento de las bacterias del género *Bifidobacterium* se emplearon los medios específicos BFM (Nebra y Blanch 1999) y TPY (Scharlau Schemie) suplementado con 0,1 g/L sulfato de neomicina de (Panreac), 15 mg/L de ácido nalidíxico (Guinama) y 3 g/L de cloruro de litio (Panreac). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 3 días en condiciones de anaerobiosis total creadas mediante el empleo de sobres de AnaeroGen (Oxoid).

Identificación de las cepas aisladas

Las bacterias aisladas en los medios MRS y M-17, LS-diferencial y BFM, se identificaron morfológicamente mediante tinción Gram. El sistema comercial de identificación bioquímica API 50 CHL (BioMerieux) fue usado para la identificación de las cepas aisladas. El sistema API 50 CHL consiste en una galería de 50 carbohidratos que son fermentados por las BAL, este sistema se empleó según las ins-

trucciones del fabricante y se incubó en condiciones anaerobias durante 48 horas. Los resultados establecieron el perfil bioquímico de cada cepa.

Para la identificación de las bacterias del género *Bifidobacterium* se utilizó la técnica de hibridación *in situ* (FISH) con una sonda específica de una región de ARN 16S del género *Bifidobacterium* (Langendijk et al. 1995) marcada con fluorescencia, ya que no se encontró ninguna batería de pruebas bioquímicas adecuadas.

Recuentos totales (vivas/muertas) mediante fluorocromos

Los recuentos totales de bacterias, tanto viables como muertas, fueron obtenidos mediante el empleo del Kit LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes) que contiene dos marcadores de ácidos nucleicos (SYTO9 y PI). El fluorocromo SYTO9 es una pequeña molécula que puede penetrar en las bacterias que poseen intacta la membrana plasmática, proporcionando una fluorescencia verde. El fluorocromo yoduro de propidio (PI) penetra en las membranas dañadas,

por lo tanto no viables, proporcionando una fluorescencia de color rojo (Defives et al. 1999).

Todas las muestras fueron asépticamente homogeneizadas mediante agitación en su propio envase y a continuación fueron diluidas en tampón PBS (130 mmol L⁻¹ de cloruro sódico, 10 mmol L⁻¹ de fosfato sódico, pH 7,3). Este tampón se empleó para la eliminación de la grasa de los productos lácteos. A continuación una alícuota de 250 µL de cada una de las muestras se tiñó con 0,8 mL de la mezcla de fluorocromos (1:1) contenidos en el Kit y se incubaron en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Las bacterias fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia (microscopio Olympus, mod. BX50).

El recuento total de la población bacteriana se obtuvo mediante la suma del número de microorganismos verdes y rojos (viables y muertos) que se observaban en el campo del microscopio de fluorescencia. Un mínimo de 20 campos fueron seleccionados para realizar los recuentos. Se consideraba que sólo células que poseían fluorescencia verde estaban vivas y el resto se consideraron muertas.

RESULTADOS

El recuento inicial en placa de las BAL osciló entre 10⁷-10⁸ UFC por mililitro de producto en todos los productos analizados. En las leches fermentadas con bifidobacterias (productos A, E, F y G) las tasas de aislamiento fueron entre un 6-10 % para las bacterias del género *Bifidobacterium*, del 70-90% para los estreptococos y entre un 5-10 % para los lactobacilos.

En el caso de los yogures con fermentos clásicos (C, G y H) el porcentaje de aislamiento para los estreptococos fue entre un 80-90 % y entre un 10- 20% para los lactobacilos.

Todas las BAL enumeradas se identificaron mediante el sistema comercial de pruebas bioquímicas API 50-CHL (Bio Merieux). Los resultados de la identificación de los microorganismos de los productos se muestran en la Tabla 1.

La técnica de hibridación *in situ* (FISH) para la identificación de las bacterias del género *Bifidobacterium* resultó una técnica rápida y altamente específica para la identificación de las mismas. Todas las cepas aisladas del medio TPY dieron positiva la reacción de hibridación.

TABLA I. Recuento bacteriano de los diferentes productos analizados e identificación de los microorganismos aislados.

PRODUCTO	RECUESTO LS UFC/mL	pH	IDENTIFICACIÓN
A	9,20 x 10 ⁸	4,31	<i>L. delbrueckii</i> <i>S. thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> ^a
B	4,45 x 10 ⁸	3,93	<i>L. delbrueckii</i> <i>S. thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> ^a
C	1,13 x 10 ⁸	3,90	<i>L. delbrueckii</i> <i>S. thermophilus</i>
D	1,04 x 10 ⁸	3,94	<i>L. delbrueckii</i> <i>S. thermophilus</i> <i>L. acidophilus</i>
E	9,70 x 10 ⁸	4,23	<i>L. delbrueckii</i> <i>S. thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> ^a
F	2,50 x 10 ⁸	4,38	<i>L. delbrueckii</i> <i>S. thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> ^a
G	3,20 x 10 ⁸	4,19	<i>L. delbrueckii</i> <i>S. thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> ^a
H	3,05 x 10 ⁸	4,06	<i>L. delbrueckii</i> <i>S. thermophilus</i>

^a Identificados mediante hibridación *in situ*

La viabilidad de las bacterias se comprobó mediante el recuento en placa y a la vez realizando recuentos al microscopio de fluorescencia mediante la tinción con SYTO9 y PI.

Mediante el recuento por fluorocromos el número total de bacterias al inicio del ensayo, resultó ser aproximadamente de 10⁸-10⁹ bacterias/mL en todas las muestras, pero solo

entre un 80-97% de estas resultaron ser viables (Tabla 2). El recuento en placa resultó ser inferior al recuento mediante fluorocromos, debido a que las bacterias viables no cultivables y las muertas no aparecen en el medio de cultivo, mientras que si pudieron ser enumeradas mediante el empleo de los fluorocromos.

TABLA II. Porcentajes de bacterias viables respecto al número de bacterias totales en las distintas tomas de muestra.

PRODUCTO	2 Semanas antes	1 Semana antes	Caducidad	1 Semana después
A	92	88	75	64
B	96,7	75	73	70
C	89	74	60	52
D	83	73,5	66	55
E	97,7	83	74	62
F	84	82	70	60
G	80	77,7	68	60
H	80	71	60	54

Los recuentos de las BAL durante el período anterior a la fecha de caducidad disminuyeron paulatinamente hasta la fecha de caducidad del producto, a partir de la cual, se observó una importante disminución de las bacterias en estado viable. Se observaron diferencias en función del producto analizado; siendo la disminu-

ción más acusada en los productos de pH más ácido.

Mediante métodos culturales y observación morfológica tras la tinción con fluorocromos, se pudo comprobar que la viabilidad de las bacterias del género *Bifidobacterium* fue la más afectada durante el período de almacenamiento a 4°C.

DISCUSIÓN

La identificación bioquímica mediante el sistema API 50CHL no resultó reproducible al 100% y la identificación solo llegó a nivel de especie. En el caso de las bifidobacterias no se encontró ninguna batería de pruebas bioquímicas que diferenciara claramente este género, a pesar de que algunos autores consideran este sistema adecuado para su identificación (Shin et al. 2000; Nighswonger et al. 2000). Por lo tanto hubo que recurrir a otra técnica más específica y rápida (FISH) para la identificación de las bifidobacterias presentes en los productos fermentados.

Mediante la tinción con fluorocromos para los recuentos totales, bacterias viables y muertas (LIVE/DEAD BacLight), se evitaron los problemas derivados de la utilización de técnicas culturales, como pudiera ser la elección de un medio de cultivo selectivo para el crecimiento de todas las BAL presentes en los productos lácteos. Además, el tiempo de análisis disminuyó

considerablemente mediante esta técnica, obteniendo resultados en pocas horas.

La disminución significativa de la viabilidad de las BAL a partir de la fecha de caducidad y sobre todo en los productos con pH más ácidos, se corresponden con los resultados obtenidos por otros autores (Shin et al. 2000; Nighswonger et al. 2000).

La diferencia en la disminución de BAL viables entre los distintos productos lácteos estudiados, indica el uso de cepas más o menos resistentes dentro de la misma especie en los procesos de manufacturación. Por ello, es necesario que el contenido inicial de BAL sea lo suficientemente elevado como para que en el momento de la caducidad de los diversos productos lácteos, las BAL se encuentren en una cantidad suficiente (10^6 - 10^7 microorganismos por mL) para que puedan ejercer su acción beneficiosa sobre la salud. Así mismo, la elección de cepas resistentes resulta de gran interés para la elaboración de productos lácteos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con la colaboración de la empresa Danone S.A.

BIBLIOGRAFÍA

- Anonymous.(1998). Cultured products of tomorrow. Dairy Foods. 8:46.
- Amann R.I., Krumholz L. and Stahl D.A.(1990). Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinate, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriology*. 172: 762-770.
- Beimfohr C., Krause A., Amman R., Ludwig W. and Schleifer K-H.(1993). *In situ* identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. *System. Appl. Microbiol.* 16: 450-456.
- Bouhnik Y.(1993). Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés. *Lait*. 73: 241-247.
- Defives C., Guyard S., Oularé M.M., Mary P., Hornez J.P.(1999). Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: a case study. *J. Appl. Microbiol.* 86: 1033-1038.
- Kurmann J.A., Rasic J.L.(1991). The health potential of products containing bifidobacteria, In R.K. Robinson (ed.), Therapeutic properties of fermented milks, Elsevier Applied Food Sciences, London. pp.117-158.
- Langendijk P.S., Schut F., Gijsbert J.J., Raangs G.C., Kamphuis G.R., Willeinson M.H.F., Welling G.W. (1995). Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium spp.* with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3069-3075.

- Nebra Y., Blanch A. R.(1999). A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5173-5176.
- Nighswonger B.D., Brashears M.M., Gillilan S.E.(2000). Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. *J. Dairy Science.* 79: 212-219.
- Sanders M.E.(1993). Effect of consumption of lactic cultures on human health. In J. Kinsella (ed.), *Advances in food and nutrition research.* Academic Press, San Diego, California. pp.67-130
- Schaafsma G.(1996 a). Significance of probiotics in human diets. In SOMED 21st International Congress on microbial ecology and disease. Paris, October 28-30, 1996. Paris : Institut Pasteur, p. 38.
- Schaafsma G.(1996 b). State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr. Newsl.* 5: 23-24.
- Shin H., Jong-Hwa L., Pestka J., Ustunol Z.(2000). Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage. *J. Food Protect.* 63: 327-331.
- Tannock J.(ed.)(1999). *Probiotics: a critical review.* Horizon Scientific Press, Norfolk, England.