

## CRECIMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PRESENCIA DE UNA CONCENTRACIÓN CRÍTICA DE INHIBICIÓN DE $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

X. Martínez-Ramírez<sup>a</sup>, G. M. Rodríguez-Serrano<sup>b</sup>, E. Contreras-López<sup>a</sup>,  
J. Añorve-Morga<sup>a</sup>, J. Jaimez-Ordaz<sup>a</sup>, L.G. González-Olivares<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México. <sup>b</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, AP 55-355 México D.F. \* [lggonzalez@uaeh.edu.mx](mailto:lggonzalez@uaeh.edu.mx)

### RESUMEN:

El selenio es un elemento traza esencial para el hombre. Sin embargo, se ha observado que los humanos presentan deficiencias por su baja biodisponibilidad. Es por ello que se han enriquecido alimentos con selenito de sodio, el cual es una forma inorgánica del selenio. Aún así, no se muestra un mejor aprovechamiento que su forma orgánica. Se ha observado que las bacterias probióticas transforman el selenio a su estado elemental. El objetivo de éste trabajo fue evaluar el comportamiento durante el crecimiento de bacterias ácido lácticas en caldo MRS enriquecido con una concentración crítica de inhibición de selenio inorgánico. Se utilizaron a las bacterias probióticas, *L. casei* Shirota y *L. johnsonni*. Se calculó el punto crítico de inhibición de selenito de sodio, sobre el crecimiento de ambos microorganismos. Se llevaron a cabo fermentaciones a 37° C para determinar la curva de crecimiento en presencia de selenito. Se observó que dichas bacterias son capaces de sobrevivir a concentraciones de selenito de sodio de 200 mg/L y 300 mg/L para *L. casei* Shirota y *L. johnsonni*, respectivamente. Las bacterias alcanzaron la etapa de desaceleración en la curva de crecimiento con las concentraciones de selenito de sodio correspondientes a las de inhibición.

### ABSTRACT:

Selenium is an essential trace element for man. However, it has been observed that humans deficient by its low bioavailability. That is why we have enriched foods with sodium selenite, which is an inorganic form of selenium. Still, no better use than its organic form shown. It has been observed that probiotic bacteria convert to its elemental selenium. The objective of this study was to evaluate the behavior during the growth of lactic acid bacteria in MRS broth enriched with a critical concentration of inorganic selenium inhibition. They were used to probiotic bacteria, *L. casei* Shirota and *L. johnsonni*. The critical point of sodium selenite inhibition on the growth of both organisms was calculated. They fermentations were carried out at 37 °C to determine the growth curve in the presence of selenite. It was observed that the bacteria are able to survive sodium selenite concentrations of 200 mg/L and 300 mg/L by *L. casei* Shirota and for *L. johnsonni* respectively. Bacteria reached the stage of slowing the growth curve with concentrations of sodium selenite corresponding to inhibition.

**Palabras clave:** Probióticos, Selenito de Sodio, Concentración Crítica de Inhibición

**Área:** Microbiología y Biotecnología

### INTRODUCCIÓN

Las bacterias probióticas son definidas como “microorganismos vivos adicionados a alimentos que son benéficos para la salud” (Aggett et al. 1999). Dichas bacterias no deben ser patogénicas y resisten el ácido gástrico biliar (Scholz-Ahrens et al., 2015)

para llegar al tracto gastrointestinal donde interactúan con él y dan un balance a la microflora nativa. De esta manera, estas bacterias evitan la colonización de bacterias patógenas, metabolizando nutrientes que el organismo por sí mismo no puede aprovechar produciendo sustancias antimicrobianas y nutraceúticas (Borchers, 2009) (Leroy, *et al.*, 2008). Éstas últimas, mejoran la respuesta del sistema inmune, reducen el nivel del colesterol en plasma sanguíneo e inhiben la aparición de cáncer (Yang *et al.*, 2009).

Por otro lado, el selenio (Se) es un elemento traza esencial que se encuentra principalmente como Se inorgánico (muchas veces como selenito o selenato) y Se orgánico en forma de selenometionina o selenocisteína. El Se orgánico, presenta una mayor biodisponibilidad (Chantiratikul, *et al.*, 2015) y en la salud del organismo humano, es de suma importancia debido a las selenoproteínas, en las que puede formar parte de la estructura o como cofactor de las mismas (Rayman y DPhil, 2000). En los sistemas biológicos los compuestos del Se tienden a ser metabolizados a estados más reducidos, con lo cual se forman los selenocompuestos (Combs Jr. y Combs., 1984). En general, selenato y selenito son metabolizados en la flora intestinal donde son absorbidos (Swanson *et al.*, 1991) y donde pueden interactuar con bacterias nativas (Krittaphol *et al.*, 2011).

La interacción de las bacterias probióticas con medios enriquecidos con selenio orgánico han tenido como resultado la mejora en la salud reproductiva (Pieniz *et al.*, 2013) y el desarrollo de sistemas de regulación de la hormona tiroidea, que se han establecido a partir de selenio inorgánico biotransformado por bacterias (Ibrahim., *et al.*, 2012). Uno de los principales problemas, es debido a que en algunos países las plantas destinadas al consumo humano y animal, carecen de la concentración adecuada de Se y por ello, se han suplementado alimentos con  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (selenito de sodio) o con bacterias que cumplen la función de transformar el selenio (Combs & Combs, 1984) ya que se ha comprobado que algunas bacterias reducen el selenito a Se elemental (Krittaphol *et al.*, 2011).

Así que, el objetivo de este trabajo fue observar el crecimiento de las bacterias probióticas *L. johnsonii* y *L. casei* Shirota en medios enriquecidos con una concentración crítica de inhibición de selenito de sodio. De esta manera se podrá determinar el nivel de absorción de selenio inorgánico y su respectiva biotransformación a orgánico durante las etapas de aceleración y desaceleración de la curva de crecimiento de cada uno de los lactobacilos.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Las bacterias *L. casei* Shirota y *L. johnsonii*, se obtuvieron del laboratorio de biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Dichas bacterias se propagaron en caldo MRS a 37°C durante 24 horas. Se comprobó la pureza del cultivo mediante tinción de Gram. Una vez propagadas las bacterias se inocularon  $10^6$  UFC/mL de cada microorganismo en tubos de caldo MRS enriquecidas con concentraciones de 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250 y 300 mg/L de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Para determinar el punto crítico de inhibición se utilizó el método de Talmage y Fitch modificado (Peña, 2007). Una vez determinada la concentración

crítica de inhibición, se enriquecieron medios de MRS con la misma, para determinar la zona de desaceleración del crecimiento de la bacteria, haciendo una cinética de fermentación a 37°C, tomando una muestra cada 2 horas durante 36 horas.

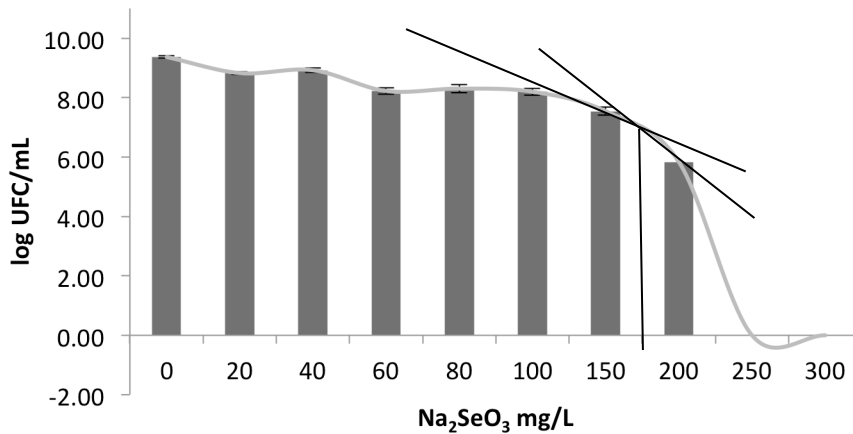
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Para la bacteria *L. casei* Shirota se puede observar (tabla I) que se obtuvo una cuenta viable de 9.37 log UFC/mL en un medio sin enriquecimiento con Se. Para las concentraciones de 20 hasta 100 mg/L se obtuvo una cuenta viable de aproximadamente 8 ciclos logarítmicos de UFC. Para la concentración de 250 y 300 mg/L no hubo crecimiento.

**Tabla I.** Crecimiento de *L. casei* Shirota con diferentes concentraciones de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

Concentración mg/L Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Log UFC/mL	Concentración mg/L Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Log UFC/mL
0	9.37 <sup>±0.04</sup>	100	8.20 <sup>±0.13</sup>
20	8.82 <sup>±0.07</sup>	150	7.54 <sup>±0.13</sup>
40	8.92 <sup>±0.109</sup>	200	5.83 <sup>±0.13</sup>
60	8.22 <sup>±0.13</sup>	250	0.0
80	8.30 <sup>±0.11</sup>	300	0.0

La concentración (Fig 1) de tolerancia calculada para *L. casei* fue de 197 mg/L. Dicha concentración es menor a la encontrada por Pusztahelyi y colaboradores (2015) quienes encontraron que para *L. casei* Shirota presentó una inhibición total a una concentración de 10 000 mg/L.

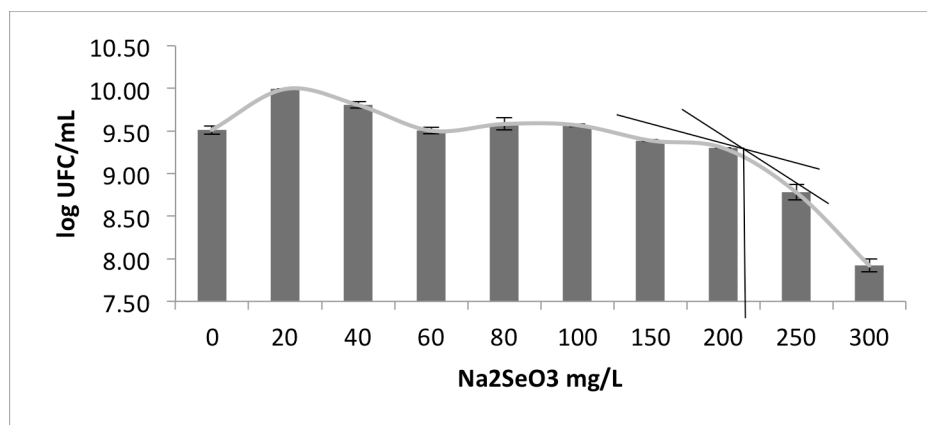


**Figura 1** Determinación de la concentración crítica de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> la inhibición de *L. casei* Shirota en medios enriquecidos.

Para el experimento realizado con *L. johnsonni* (tabla 2) se obtuvo que a partir de la concentración de 20 mg/L hasta 200 mg/L la cuenta viable se mantuvo de 9 ciclos logarítmicos, descendiendo en 250 mg/L a 8.78 UFC/mL y en 300 mg/L a 7.92 UFC/mL. *L. johnsonni*.

Tabla II. Crecimiento de <i>L. johnsonni</i> con diferentes concentraciones de Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>			
Concentración mg/L Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Log UFC/mL	Concentración mg/L Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Log UFC/mL
0	9.5 <sup>±0.05</sup>	100	9.57 <sup>±0.01</sup>
20	9.99 <sup>±0.00</sup>	150	9.39 <sup>±0.01</sup>
40	9.81 <sup>±0.03</sup>	200	9.30 <sup>±0.00</sup>
60	9.50 <sup>±0.03</sup>	250	8.78 <sup>±0.09</sup>
80	9.58 <sup>±0.07</sup>	300	7.92 <sup>±0.07</sup>

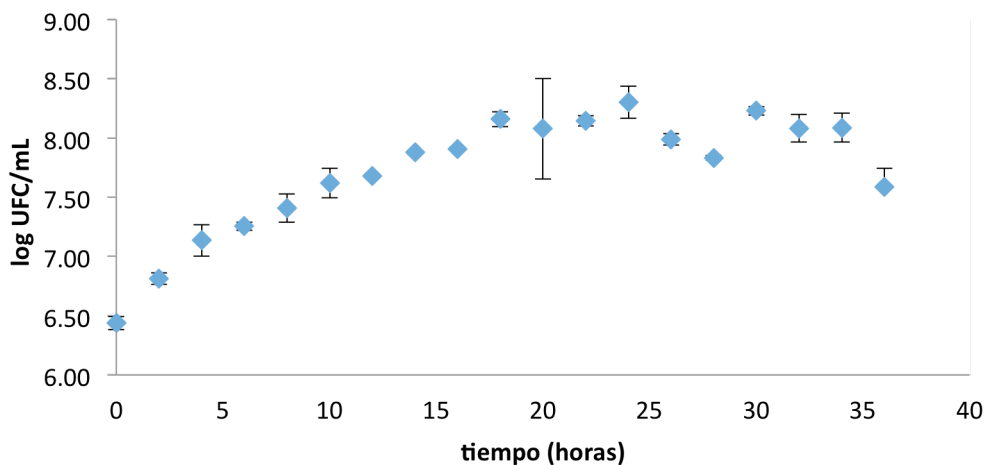
La concentración crítica de selenito de sodio que inhibió el crecimiento de *L. johnsonni* fue de 206 mg/L (figura 2), una concentración mayor a la obtenida para *L. casei* (197 mg/L). Dicha concentración también fue mayor a la reportada por González-Olivares (2015), quien encontró que a los 98 mg/L de selenito de sodio se tenía una inhibición para *L. johnsonni*. De acuerdo a Calomme y colaboradores (1995) las bacterias ácido lácticas son capaces de sobrevivir con concentraciones de 200 mg/L en medios enriquecidos con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.



**Figura 2** Determinación de la concentración crítica de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> para la inhibición del crecimiento de *L. johnsonni* en medios enriquecidos.

Se ha comprobado que algunas bacterias, especialmente las probióticas pueden reducir el selenito a selenio elemental y algunas otras pueden transformar el selenio elemental a selenuro de hidrógeno ( $H_2Se$ ), esto lo pudimos comprobar debido a que conforme avanzaba el tiempo de fermentación se observaba un precipitado color rosáceo que indica la presencia de Se elemental. Se cree que estos mecanismos de reacción sirven para proteger a la bacteria contra los daños de toxicidad de selenio (Krittaphol et. al., 2011). En este sentido, dichos mecanismos podrían no desactivarse en las concentraciones de tolerancia, por lo que ocurre una inhibición.

Después de determinar la concentración de selenio a la cual se inhibe la bacteria *L. casei* Shirota, se enriquecieron medios de MRS con dicha concentración de selenio. La fermentación se llevó a cabo durante 36 horas y se observó que se tuvo un aumento de la concentración, de un tiempo de cero horas ( $10^6$  UFC) hasta las 18 horas (8.6 UFC/mL). A partir de las 18 a 24 horas se tuvo una cuenta cercana a los 8 ciclos logarítmicos manteniendo una cuenta viable constante. A partir de las 36 horas se observó una disminución de la cuenta viable de 7.5 UFC/mL lo cual indicó el probable inicio de la fase de muerte.



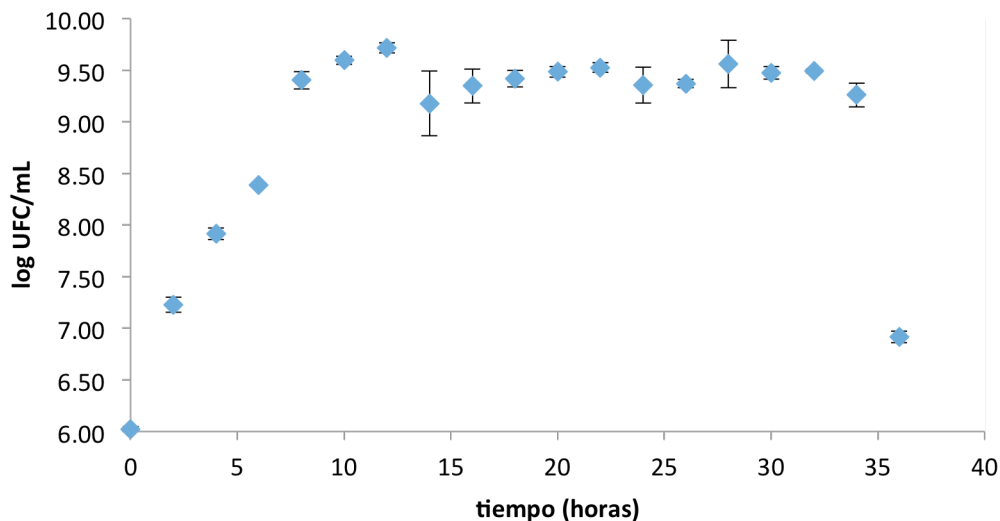
**Figura 3.** Curva de crecimiento de *L. casei* Shirota en caldo MRS enriquecido con  $Na_2SeO_3$

Cuando los nutrientes son gradualmente agotados y los productos metabólicos se acumulan en el medio, el crecimiento celular es reducido, es decir hay una fase de desaceleración. Se sabe que en esta fase las bacterias llegan a ser más resistentes a los efectos adversos a los que están expuestas, induciendo la transición a la fase estacionaria, es entonces cuando muchas funciones son activadas debido a la escases de nutrientes y las células crecen lentamente. En esta fase se puede inducir la síntesis de genes y proteínas con la finalidad de asegurar una resistencia a diversos factores de estrés. Muchas de las proteínas se implican en la protección de

la célula, ya que la resistencia al estrés es una característica de las células aunque nunca hayan sido expuestas a un agente de estrés en particular (Khmel, 2005).

Por otro lado, se sabe que los iones de metales pesados, son altamente tóxicos para los microorganismos debido a su capacidad para reemplazar metales funcionales dentro de las células que pueden provocar una desnaturalización de las proteínas y del DNA. Se ha observado que estos mecanismos dependen de las condiciones limitantes del cultivo (Holmes *et al.*, 1997).

Para *L. johnsonni* (Figura 4) se observa que de una cuenta inicial de  $10^6$  UFC/mL se encontró un ascenso de las 0 hasta las 8 horas donde se presentó una cuenta viable de 9.40 UFC/mL manteniendo un promedio cercano de 9 UFC/mL hasta las 34 horas. A las 36 horas, se tuvo un descenso de la cuenta viable (6.91 UFC/mL). Como se puede observar se presentó la fase de desaceleración entre las 6 y 10 horas. El medio fue enriquecido con 209mg/L de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .



**Figura 4.** Curva de crecimiento de *L. johnsonni* en caldo MRS enriquecido con  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$

## BIBLIOGRAFÍA

- Aggett, P.J., et al. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, s1–s27.
- Andreoni, V., Moro, L., M., Cavalca, L., Erba, D., Ciappellano, S. (2000). Selenite tolerance and accumulation in the *Lactobacillus* species. *Annals of Microbiology*, 50, 77-78
- Borchers, T., A., et al. (2009). Proiotics and immunity. *Journal of gastroenterology*, 44(1), 26-46
- Calomme, M., R., Van den Branden, K., Vanden, Berghe, D., A. (1995). Selenium and *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 79 (3), 331-340

- Chantiratikul, A., Pakmaruek, P., Chinrasri, O., Aengwanich, W., Chookhampaenh, O., Maneetong, S., Chantiratikul, P., (2015). Efficacy of Selenium from Hydroponically Produced Selenium-Enriched Kale Sprout (*Brassica oleracea* var. *alboglabra* L.) in Broilers. *Biol trace Elem Res*.
- Combs Jr, G., F., Combs, S., B. (1984). The nutritional biochemistry of selenium. *Annual Review of Nutrition*. 4, 257-280
- Holmes, J., D., Richardson A., J., Saed., S., Evans-Gowing R., Russel, D., A., Sodeau, J., R. (1997). Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, 143, 2521-2530
- Ibrahim, A., M., Hala et. al., (2012). Selenium-Enriched Probiotics Improves Murine Male Fertility Compromised by High Fat Diet. *Biological Trace Element Research*, 147(1-3), 251-260
- Khmel, I., A. (2005). Regulation of Expression of bacterial Genes in the Absence of active cell growth. *Russian Journal of Genetics*, 41(9), 968-984
- Kittaphol, W., Wescombe, P., A., Thomson, C., D., McDowell, A., Tagg, J., R., Fawcett, J., P. (2011). Metabolism of L-selenomethionine and Selenite by probiotic Bacteria: In Vitro and In Vivo Studies. *Biological trace Element Research*, 144(1-3), 1358-1369
- Krittaphol, W., McDowell, A., Thomson, C., D., Mikov, M., Fawcett, J., P. (2011). Biotransformation of L-Selenomethionine and Selenite in rat Gut Contents. *Biol Trace Elem Res*, 139, 188-196
- Leroy, F., Falony, G., Vuyst, L., (2008). Latest developments in probiotics. Toldrá F. Meat biotechnology (capítulo 10). Valencia, España: Springer.
- Peña, R., Circo, S. (2007). Solución automática del método de Talmage y Fitch. *Tecnología Química 1 (2007)*, 10-15
- Pieniz, S., Andrezza, R., Queiroz, P., J., Oliveira, C., F., A., Brandelli, A. (2013). Production of Selenium-Enriched Biomass by *Enterococcus durans*. *Biol trace Elem Res*, 155, 447-454
- Pusztahelyi, T., Kovács, S., Pócsi, I., Prokisch, J. (2015). Selenite-stress selected mutant strains of probiotic bacteria for Se source production. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 30, 96-101
- Rayman, P., Margaret, y DPhil (2000). The importance of selenium to human health. *El Sevier* 356(9225), 233-241
- Schollz-Ahrens, K., E., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Asil, Y., Glüer C., C., Schrezenmeir J. (2007). Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *The Journal of Nutrition*, 137(3), 838S-846S
- Swanson, C., A., Patterson, B., H., Levander, O., A., Veillon, C., Taylor, P., R., Helzouer, K., McAdam, P., A., Sech, L., A. (1991). Human [75Se] seleniomethionine metabolism: a kinetic model. *The American journal of clinical nutrition* 54: 917-926
- Yang, J., Huang, K., Qin, S., Wu, X., Zhao, Z., Chen, F. (2009). Antibacterial Action of Selenium-Enriched Probiotics Against Pathogenic *Escherichia coli*. *Dig Dis Sci*, 54, 246-254