

“Evaluación *in vitro* de formación de biopelículas por bacterias ácido-lácticas en presencia de fructanos comerciales originarios de agave”

M.C.C. Condado-Huerta*¹, H. Martínez-Plascencia¹, M. Antúnez-Mojica³, A.I Barrera-Molina¹.
1 Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 2 Centro de Investigaciones Químicas,
Universidad Autónoma del Estado de Morelos. *citlallycondado@gmail.com

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias Gram positivas, fermentadoras de carbohidratos y productoras de ácido láctico. Se consideran microorganismos “seguros” y son usadas como probióticos ya que, al ser administradas vivas en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud. Las BAL sintetizan componentes importantes entre ellos los exopolisacáridos (EPS) utilizados principalmente para formar biopelículas como método de supervivencia y con ello desarrollar tolerancia a los antimicrobianos, las cuales son comunidades de microorganismos que crecen agregados y rodeados por esta matriz extracelular. Estudios recientes proponen que la producción de EPS por BAL para formar biopelículas se encuentra directamente relacionada con los nutrientes disponibles en el medio. Se sabe que los fructanos, un grupo de oligosacáridos y fructooligosacáridos con distinto origen y estructura, son componentes importantes para favorecer la reproducción y estabilidad bacteriana principalmente de BAL. El objetivo del presente estudio fue evaluar la formación de biopelículas *in vitro* de BAL en presencia de fructanos comerciales originarios de agave mediante tinción simple con cristal violeta. Los resultados proponen que la presencia de los fructanos promueve la formación de biopelículas, esto datos contribuyen a conocer la relación adecuada entre probióticos y fructanos para futuras terapias que contribuyan al bienestar del consumidor.

Palabras clave: BAL, Biopelícula, Fructanos.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are Gram-positive, carbohydrate-fermenting, lactic acid-producing bacteria. They are considered "safe" microorganisms and are used as probiotics since, when administered live in adequate amounts, they confer health benefits. LAB synthesize important components including exopolysaccharides (EPS) used mainly to form biofilms as a survival method and thereby develop tolerance to antimicrobials, which are communities of microorganisms that grow in aggregates and surrounded by this extracellular matrix. Recent studies propose that the production of EPS by LAB to form biofilms is directly related to the nutrients available in the medium. Fructans, a group of oligosaccharides and fructooligosaccharides with different origin and structure, are known to be important components to favor bacterial reproduction and stability mainly of LAB. The objective of the present study was to evaluate the formation of *in vitro* biofilms of LAB in the presence of commercial fructans originating from agave by simple staining with crystal violet. The results suggest that the presence of fructans promotes the formation of biofilms, this data contributes to know the appropriate relationship between probiotics and fructans for future therapies that contribute to the consumer's wellbeing.

Key words: LAB, biofilm, fructans.

Área: Funcionalidad alimentaria

INTRODUCCIÓN

Las Bacterias ácido lácticas (BAL), son un grupo de microorganismos en forma de cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito (Carr et al., 2002; Vázquez et al., 2009). Se consideran “Seguros” o GRAS (generally recognized as safe), lo que implica que pueden utilizarse para la elaboración de productos alimentarios; también son consideradas como bacterias probióticas (Salminen et al., 1998), según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se refiere a microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (Oliveira & González-molero, 2016). Las BAL forman parte de la microbiota intestinal y tienen la capacidad de producir ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos, a partir de la hidrólisis de hidratos de carbono considerados como prebióticos (Zamorano & Herrera, 2015) los cuales se definen como ingredientes fermentados selectivamente que dan lugar a cambios específicos en la composición y/o la actividad de la microbiota gastrointestinal, confiriendo así beneficios a la salud del huésped (Guarner et al., 2017) y son utilizados preferentemente por BAL (Bustamante et al., 2006) lo que favorece la reproducción y estabilidad bacteriana. Se ha propuesto que la disponibilidad de nutrientes en el medio permite a las bacterias sintetizar polisacáridos extracelulares (homopolisacáridos y heteropolisacáridos) los cuales están constituidos por numerosas unidades de monosacáridos, unidas entre sí por enlaces glicosídicos; son sustratos resistentes a la digestión gástrica y fermentables por la microbiota intestinal, por lo que podrían ser buenos candidatos prebióticos sin embargo, no es viable actualmente debido a la limitación que supone su escasa producción (Corzo et al., 2015); estos son utilizados para la formación de biopelículas por las BAL, la cual es una estrategia de vida para la mayoría de las bacterias, ya que esta les brinda estabilidad, desempeña funciones catalíticas, aumenta las posibilidades de transferencia de material genético y la resistencia a los antibióticos, participa en los procesos de comunicación celular y ofrece protección para sobrevivir a las condiciones adversas y variables del medio ambiente (Ramírez-Mata et al., 2014); aspectos que contribuyen a una colonización exitosa del hospedador. Los probióticos y prebióticos juegan un rol decisivo en la modulación de la microbiota intestinal y han demostrado sus beneficios para el tratamiento de distintas enfermedades intestinales y extra- intestinales (Castañeda Guillot, 2017). El objetivo del siguiente estudio fue evaluar la formación de biopelículas *in vitro* de BAL en presencia de fructanos comerciales originarios de agave mediante la técnica de tinción simple con cristal violeta. Los resultados obtenidos mostraron que los fructanos de agave comerciales (prebiótico) al .1% en presencia de BAL podrían promover la formación de biopelícula. Estos resultados sugieren que el uso de fructanos como sustrato para *Lactobacillus* promoverá una mayor síntesis de exopolisacáridos suficientes para formar una biopelícula que les permitan a los microorganismos llegar intactos al intestino y contribuyan a la salud del hospedero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un consorcio microbiano comercial de BAL liofilizadas (*Lactobacillus lactis delbruecki*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) de la marca Alcatraz® y como sustratos prebióticos deshidratados en polvo se utilizaron fructanos de inulina de la marca Organic agave inulin® (enature taste feel evolution) y nopal de la marca Natura Biofoods.

Los microorganismos utilizados fueron incluidos para su activación y crecimiento en caldo MRS (SIGMA-ALDRICH) y se incubaron de manera estática a 37 ° C por 24 horas en atmósfera microaerofílica (5% de O₂), utilizando contenedores de anaerobiosis (Merck) y sobres generadores de condiciones anaerobias (GasPak-Merck) durante 24 hrs.

De inmediato se inocularon 500 µL del cultivo *overnight* de la cepa a evaluar en 50 mL de caldo MRS como dilución madre. Los cultivos se realizaron por triplicado en tubos de cultivo de cristal con tapa rosca que contenían medio MRS adicionado previamente con los prebióticos mencionados. Este paso fue realizado con la finalidad de obtener una biopelícula *in vitro* con las cepas seleccionadas. Los tubos se incubaron como se describió anteriormente durante 69 horas.

Una vez completado el tiempo de incubación, se apartó el medio de cultivo y se realizaron lavados de los tubos en cuatro ocasiones con agua destilada estéril y se dejaron secar a 60°C durante 30 minutos, con el objetivo de eliminar físicamente aquellas bacterias que no presentaran adherencia en la pared del tubo, inmediatamente se hizo una tinción simple con cristal violeta a una concentración de 0,2% durante 5 minutos y posterior a ello se extrajo el colorante para realizar nuevamente cuatro lavados con agua destilada, dejando secar al aire libre. Como control negativo se utilizaron tubos con medio MRS; se observó macroscópicamente la tinción simple de la biopelícula con cristal violeta formada y adherida por las BAL en la pared de los tubos de cristal.

Paralelamente a la realización del ensayo de formación de biopelículas, se realizó con el medio de cultivo apartado mediciones de densidad óptica (OD) a una longitud de onda 620 nm, se realizó por triplicado para evaluar el crecimiento de las bacterias en presencia de los prebióticos en una placa comercial de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano, inoculando en cada pocillo 200µl de los cultivos individualmente; también se inocularon 50 µL de cada muestra en medio agar MRS (DIFCO™) por vertido en placa y se utilizó el método de extensión con perla vidrio, se realizó nuevamente el proceso de incubación siguiendo la metodología anterior, esto con la finalidad de evaluar la viabilidad del cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que los fructanos presentes en la inulina comercial originaria de agave utilizados al .1% podrían modular la producción de exopolisacáridos para la formación de biopelícula por las BAL, ya que fue posible observarla y compararla macroscópicamente por su adhesión a la pared del tubo y la tinción con cristal violeta con las muestras que solo contenían *Lactobacillus* y las tratadas con diferentes prebióticos; se ha reportado que esto puede ser influenciado por los genes contenidos en las BAL que permiten llevar a cabo el proceso de fermentación y utilización de los fructanos para la producción de exopolisacáridos y con ello la formación de biopelícula. Por otro lado, se comprueba que la disponibilidad de monosacáridos es importante para que las bacterias puedan tener el sustrato necesario para producir exopolisacáridos y formar la biopelícula como método de supervivencia en virtud de que se determinó su formación.

En la figura 1 A), B) y C) se observan los tubos con muestras negativas ya que no presentaban ningún inóculo bacteriano, se observa una ligera tinción de cristal violeta al fondo del tubo, esto se asocia posiblemente al lavado del tubo o adherencia de algún compuesto del medio de cultivo utilizado, se concluye lo anterior debido a que se realizó una evaluación de presencia de microorganismos en medio agar MRS y se obtuvieron resultados negativos (figura 2). En la figura 1 D), E) y F) se puede observar la formación de la biopelícula por parte de las BAL en presencia y ausencia de fructanos y nopal, en donde se observa mayor tinción en la muestra tratada con *Lactobacillus* más inulina al .1% en comparación con la muestra que contenía únicamente *Lactobacillus* y *Lactobacillus* más nopal al .1%, también se observa una disminución de tinción de biopelícula en las muestras tratadas con *Lactobacillus* + nopal al .1%, por lo que la presencia de nopal en polvo podría limitar el desarrollo de la biopelícula, por lo que se propone que podría no ser un sustrato que las BAL utilicen para la fermentación y obtención de nutrientes para la producción de EPS y formación de biopelícula. Con estos resultados se sugiere que una adecuada combinación de probióticos y prebióticos, contribuirá a la supervivencia de estos microorganismos lo que conlleva a aumentar los beneficios que otorga a la salud del hospedero.

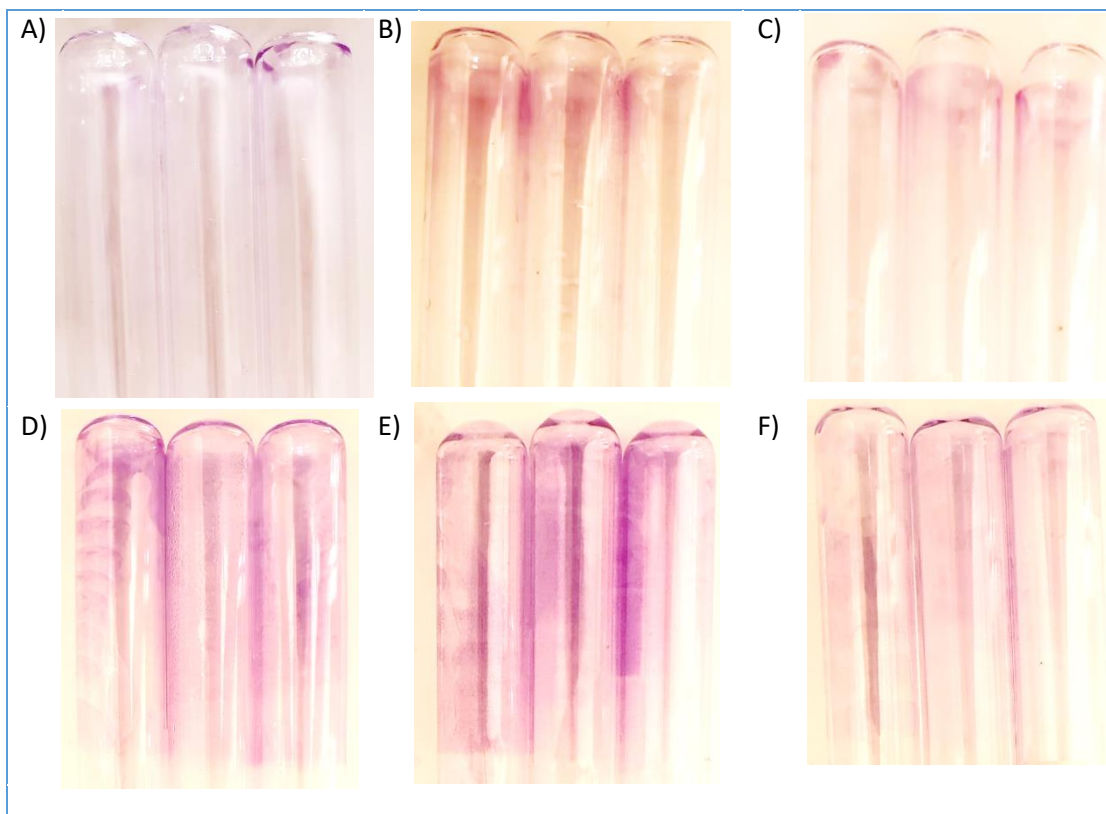


Figura 1. Resultados obtenidos a partir de la tinción simple con cristal violeta de cada muestra por triplicado. Control negativo: A) Caldo MRS, B) control inulina .1%, C) Control nopal .1%. Muestras inoculadas: D) control *Lactobacillus*, E) *Lactobacillus* + inulina .1% F) *Lactobacillus* + nopal .1%

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos a partir de lecturas de longitud de onda a 620 nm de cada muestra posterior a 69 hrs de incubación, en donde se obtiene como resultado que los fructanos comerciales originarios de agave (inulina) inducen el crecimiento de las BAL en comparación con la muestra ausente del prebiótico (control *Lactobacillus*), esto con base a la correlación Ordinal de Spearman con un nivel de confianza del 95.0% con valores-P por debajo de 0.05.

Tabla I. Lecturas de longitud de onda a 620 nm de cada muestra posterior a 69 hrs de incubación.

Muestras	Caldo MRS	Caldo MRS + .1% inulina	Caldo MRS + .1% nopal	Caldo MRS + <i>Lactobacillus</i>	Caldo MRS + <i>Lactobacillus</i> + .1% inulina	Caldo MRS + <i>Lactobacillus</i> + .1% nopal
Lecturas de longitud de onda a 620 nm	0.128	0.141	0.408	0.148	0.655*	0.480
	0.128	0.15	0.370	0.386	0.749*	0.449
	0.129	0.147	0.403	0.154	0.684*	0.439

*Valores estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95.0% con valores-P por debajo de 0.05.

En la figura 2 se puede observar el crecimiento de BAL en medio agar MRS, determinando que los microorganismos siguen siendo viables después de 69 hrs de incubación con y sin tratamiento de prebióticos.

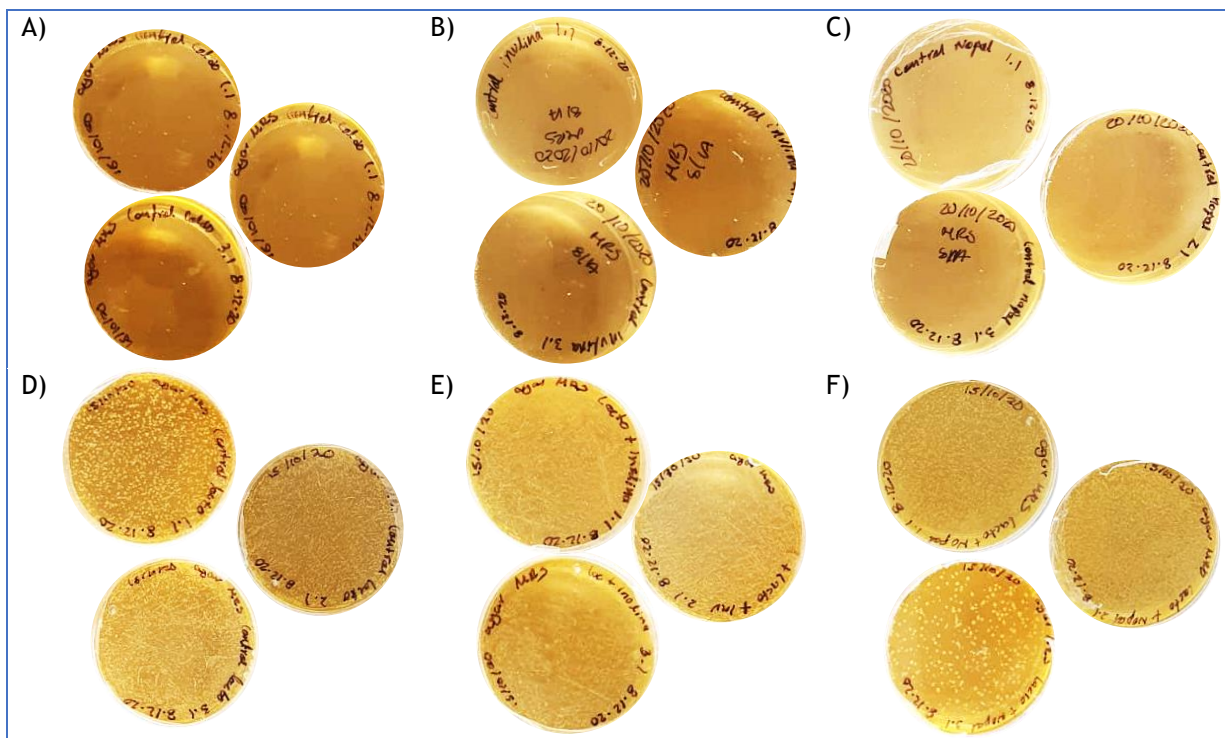


Figura 2. Resultados obtenidos por triplicado de la viabilidad de las cepas posterior a 69 hrs de incubación en las muestras inoculadas y verificación de la ausencia de bacterias en los controles negativos. Control negativo: A) Caldo MRS, B) control inulina .1%, C) Control nopal .1%. Muestras inoculadas: D) control *Lactobacillus*, E) *Lactobacillus* + inulina .1% F) *Lactobacillus* + nopal .1%

La producción de exopolisacáridos por BAL para la formación de biopelículas varía mucho de acuerdo con las condiciones de fermentación, existe información limitada sobre el uso de prebióticos como inductores de formación de biopelículas.

Se sugiere que se realicen lecturas espectrofotométricas de la biopelícula para determinar valores cuantitativos y demostrar significativamente la diferencia de la formación de la biopelícula en los diferentes tratamientos, también se sugiere realizar más experimentos probando diferentes concentraciones de inulina de agave para determinar el porcentaje ideal que permita aumentar suficiente producción de exopolisacáridos para la formación de la biopelícula y por último se necesita incluir una cepa bacteriana que se identifique como no formadora de biopelícula para ser utilizada como control negativo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bustamante, P., Mayorga, L., Ramírez, H., Martínez, P., Barranco, E., Azaola, A., Bustamante C., P., Mayorga R., L., Ramírez S., H., Martínez C., P., Barranco F., E., Azaola E. (2006). Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 37(2), 5–9.
- Castañeda, C. (2017). Microbiota intestinal, probióticos y prebióticos. *Enfermería Investiga: Investigación, Vinculación, Docencia y Gestión*, 2, 156–160.
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos-Aparicio, I., Plou, F. J., Ruas-Madiedo, P., Rúperez, P., Redondo-Cuenca, A., Sanz, M. L., & Clemente, A. (2015). Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutricion Hospitalaria*, 31, 99–118.
- Guarner, F., Sanders, M. E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A., Kim, N., De Paula, J. A., Ramakrishna, B., Shanahan, F., Szajewska, H., Thomson, A., & Le Mair, A. (2017). Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. *World Gastroenterology Organisation*, 35.
- Olveira, G., & González-molero, I. (2016). *Endocrinología y Nutrición Actualización de probióticos , prebióticos y simbióticos*. 63(9), 482–494.
- Ramírez, A., Fernández, I. J., Nuñez, K. J., Xiqui, M. L., Baca, B. E. (2014). Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: Quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), 242–255.
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., & Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1–2), 93–106.
- Zamorano, M. M., Herrera, C. Q. (2015). *Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos*. 5, 337–354.