

29. Ciencia, tecnología e Innovación

**POTENCIAL PROBIOTICO DE CEPAS DE *BACILLUS* AISLADAS DE MIEL Y
POLEN DE TUCUMAN**

Arroyo, Florencia Alejandra¹; Gómez, Johana Stefani²

Director: Salomón, Virginia³

florchys2588@gmail.com, j.stefanigomez@gmail.com, salomon.virginia@inta.gob.ar,

¹Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia (UNT); ²Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI); ³Estación Experimental Agropecuaria INTA-Famaillá

Resumen

Actualmente, hay un interés por el aumento de la cantidad y actividad de la microflora del colon, con el fin de promover la salud en humanos y en animales, se han determinado diferentes estrategias para modificar el contenido microbiano, como la inclusión en alimentos de probióticos. Para calificar como un candidato probiótico potencial, las cepas de *Bacillus* deben poseer tolerancia al estrés generado por el tracto gastrointestinal (TGI). El objetivo fue evaluar las características probióticas de cepas seleccionadas y su capacidad inhibitoria contra patógenos alimentarios.

Se trabajó con 3 cepas de *Bacillus* sp. 4A, 230P y 86B aislados de mieles y polen proveniente de abejas nativas sin aguijón de la provincia de Tucumán. Se evaluó la capacidad de las cepas para inhibir a *Listeria innocua* 6a, *L. innocua* 7, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aureuginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 por la técnica "spot on the lawn". Se evaluó su crecimiento en MRS agar adicionado con 3 g/L de bilis a 37°C. Para evaluar la resistencia al TGI *in-vitro*, se empleó una solución de NaCl (0,5% p/v) conteniendo pepsina (3g/L), con pH 1,5; 2; 2,5 y 3 (jugo gástrico) y solución de NaCl (0,5% p/v) conteniendo bilis (10 g/L), con pH 8 (jugo entérico). Los cultivos fueron expuestos al jugo gástrico por 120 min, y posteriormente al jugo entérico por 24 h.

Se seleccionó a *Bacillus* sp. 4A para realizar TGI *in-vitro*, por presentar actividad antimicrobiana contra *L. innocua* 6A, *L. innocua* 7, *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *P. aureuginosa* ATCC 27853. En pH 1,5, hubo una reducción de 5 unidades log después de 120 min, mientras que en la condición menos extrema (pH 3), no hubo modificación significativa en el número de viables. La transferencia para el jugo entérico resultó en la reversión parcial del efecto causado por el jugo gástrico.

Palabras claves: *Bacillus*, probióticos, mieles nativas.

Introducción

Hoy en día los probióticos poseen gran relevancia a nivel mundial, debido a que mediante numerosos estudios se ha logrado demostrar diversos efectos benéficos para el ser humano, tales como el favorecimiento del equilibrio de la microflora intestinal, estimulación del sistema inmune, competencia contra patógenos, entre otros (Saavedra, 2001).

Los probióticos pueden ser considerados como “ingredientes funcionales” que son utilizados para “funcionalizar” alimentos, es decir agregar una propiedad definida que le otorga un valor agregado al producto, ya que entregan beneficios para la salud del consumidor, más allá de los beneficios nutricionales del alimento que los contiene (Caceres y Gotteland, 2010). Además que su utilización como estimuladores del crecimiento animal constituye una alternativa satisfactoria para la sustitución de antibióticos. Finalmente según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2001) los define como “Organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped”.

Cabe mencionar que uno de los requisitos principales es que los microorganismos probióticos permanezcan viables y activos en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal para garantizar así su

potencial efecto benéfico en el huésped (Saarela et al., 2001). Como así también proliferar en el intestino (Ortega et al., 2002).

Según la FAO/OMS (2002) es deseable que los microorganismos probióticos posean características que intervengan en el control de patógenos intestinales tales como:

- Producción de sustancias antimicrobianas.
- Exclusión competitiva.
- Competencia por los nutrientes.
- Modulación del sistema inmunitario.
- Resistencia a la acidez gástrica y biliar
- Capacidad de permanecer viables en el producto, desde el envasado, almacenamiento, hasta el consumo, conservando las características descritas en las etiquetas.
- Ser habitante normal del intestino humano (Lee, 2009; Stomatova, 2010).
- Proporcionar seguridad a nivel clínico y alimentario (no ser patógeno ni toxigénico) (Stomatova, 2010; Rauch y Lynch, 2012).
- Poder de adaptación a la microbiota intestinal sin desplazar la microbiota nativa ya existente (Lee, 2009; Stomatova, 2010).
- Proporcione deseables propiedades organolépticas (Stomatova, 2010; Rauch y Lynch, 2012).

Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las más utilizadas como probióticos, pero también se utiliza la levadura *Saccharomyces boulardii* y

algunas de las especies *Escherichia coli* y *Bacillus*.

Los *Bacillus* son bacterias Gram-positivas, con forma de barra, formadoras de esporas, aeróbica o anaeróbica facultativa (Alou et al., 2015). El género *Bacillus* está estrechamente relacionado a *Lactobacillus spp.*, el candidato distinguido probiótico. Ambos comparten la misma clase, Bacilli bajo el filo Firmicutes (Elshagabee, Rokana, Gulhane, Sharma, Panwar, 2017).

Los *Bacillus* pueden sobrevivir en extrema acidez del estómago, y tolerar las sales biliares y otras condiciones hostiles del tracto gastro intestinal (TGI). Para calificar como un candidato probiótico potencial, las cepas de *Bacillus* deben poseer el requisito principal de la tolerancia al estrés del TGI además de tener buena adherencia y propiedades bio-terapéuticas (Thakur, Rokana y Panwar, 2016). La supervivencia bajo el estrés del TGI representa otro desafío para el tránsito seguro y localización en el intestino.

Otros de los elementos que caracteriza a los *Bacillus sp.* es la producción de enzimas hidrolíticas que ayudan a mejorar la utilización de los alimentos. Dentro de estas, se encuentran las proteasas, amilasas y las glicosidasas, que descomponen las complejas moléculas de los alimentos y las transforman en nutrientes más simples. Estos compuestos se absorben más rápidamente por el huésped o pueden ser

empleados por otras bacterias beneficiosas para el establecimiento de una microbiota intestinal balanceada (Milián et al., 2008).

De manera bastante empírica, las esporas de varias especies de *Bacillus* se han utilizado ampliamente como probióticos humanos y animales durante décadas.

Objetivos

Evaluar las características probióticas de cepas seleccionadas y su capacidad inhibitoria contra patógenos alimentarios.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas

Las cepas evaluadas fueron: *Bacillus sp.* 4A, 86B, y 230P aislados de mieles y polen proveniente de abejas nativas sin aguijón (Tucumán, Argentina). Cepas indicadoras: *Listeria innocua 6a*, *L.innocua 7*, *L. monocytogenes ATCC 7644*, *Pseudomonas aureuginosa ATCC 27853*, *Escherichia coli ATCC 25922* y *Enterococcus faecalis ATCC 29212*.

Selección de la cepa

Para la selección de la cepa con características probióticas, los 3 *Bacillus sp.* fueron evaluados en medio MRS agar adicionado con 3 g/L de bilis mediante la técnica de estriado e incubadas a 37°C. Como control se utilizó MRS agar.

Evaluación de la resistencia al tracto gastrointestinal (TGI) *in-vitro*

Se selecciona a la cepa capaz de crecer en presencia de bilis para evaluar su resistencia a un TGI simulado. Para eso se hicieron repiques de la cepa seleccionada en medio MRS líquido durante 2 días a 37°C.

La cepa seleccionada se centrifugo a 8500 rpm durante 10 min, y se lavó (3 veces) el pellet con solución estéril de NaCl (5 g/L) y luego se resuspendió en la misma solución.

Composición jugo gástrico: solución estéril de NaCl (5 g/L) con pH ajustado para 1,5; 2; 2,5 y 3 con HCl, y adicionado con 3 g/L de pepsina.

Composición del jugo entérico: solución estéril de NaCl (5g/L) con pH ajustado para 8 con NaOH 0,1M, adicionado con 10 g/L de bilis.

Los cultivos se adicionaran con jugo gástrico, incubados a 37°C por 120 min en agitador rotatorio (150 rpm). Se retiraron muestras en 0, 15, 30, 60 y 120 min. Se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina (8,5 g/L) y el recuento de UFC/mL se realizó después de 48 h de incubación a 37°C.

Los cultivos tratados con jugo gástrico fueron centrifugados a 8500 rpm durante 10 min, las células se resuspendieron en solución estéril de NaCl (5 g/L) y transferidos a tubos conteniendo jugo entérico. Se incubaron a 37°C, 24 h en agitador rotatorio (150 rpm). Se retiraron muestras en 0, 1, 2, 4 y 24 h.

Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas para recuento de UFC/mL a 37°C y 48 h de incubación.

Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los compuestos producidos por las cepas seleccionadas, se evaluó sobre las cepas indicadoras, mencionadas anteriormente. La actividad antimicrobiana de las sustancias tipo bacteriocinas contra las cepas indicadoras se realizó de acuerdo con la metodología "spot on the lawn" descrita por Farías, Totola, Miranda, Carvalho y Damasceno (1994). Para ello, placas de Petri con medio agar-agua (1,5% p/v) se le adicionó una sobrecapa (7 mL) de medio BHI agar blando (0,75% p/v), en el que se desarrolla la cepa indicadora, con 30 µL de un cultivo overnight de la misma (aprox. 1.10^6 UFC/mL). Una vez solidificado se sembraron 10 µL del sobrenadante libre de células (SLC) de *Bacillus* sp. 4A, 230P y 86B. Las placas se incubaron a la temperatura y tiempo óptimo de desarrollo del microorganismo indicador (37°C, 24 h). Por último, se detectó la actividad antimicrobiana por la presencia de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de la zona de siembra.

Resultados y Discusión

Para calificar como un candidato probiótico potencial, las cepas de *Bacillus*

deben poseer el requisito principal de la tolerancia al estrés del TGI, además de tener buena adherencia y propiedades bio-terapéuticas (Thakur et al., 2016). La supervivencia bajo el estrés del TGI representa otro desafío para tránsito seguro y localización en el intestino.

Entre los microorganismos probióticos utilizados son comunes cepas del género *Lactobacillus*. Sin embargo, en los últimos años se han reportado cepas del género *Bacillus* con potenciales propiedades para su aplicación como probiótico (Elshagabee et al., 2017).

Entre los microorganismos evaluados en este trabajo se seleccionaron *Bacillus* sp. 4A y 86B para evaluar propiedades probióticas debido a que presentaron resistencia a bilis en medio MRS agar suplementado con bilis, pero *Bacillus* sp. 4A mostró mayor crecimiento siendo la cepa seleccionada para la simulación del TGI *in-vitro*. En este sentido, Hong et al. (2009) refuerzan una opinión creciente de que *B. subtilis* y probablemente otras especies se han adaptado a la vida dentro del TGI humano, incluida la capacidad de formar biofilm, esporular anaeróticamente y producir antimicrobianos, y deben considerarse como comensales intestinales, en lugar de microorganismos únicamente del suelo.

La tolerancia del microorganismo en presencia de bilis puede ser debida a la presencia de la forma esporulada del mismo la cual le permite sobrevivir a la

acidez extrema del estómago, y toleran las sales biliares y otras condiciones hostiles del TGI (Elshagabee et al., 2017).

El control de calidad de los cultivos de probióticos en los alimentos tradicionalmente se ha basado únicamente en pruebas para garantizar que haya una cantidad adecuada de bacterias viables en los productos durante toda su vida útil. La viabilidad es un factor importante, pero no el único criterio para garantizar la calidad. Para que sean efectivas, las cepas probióticas deben conservar las características de salud funcional para las cuales fueron seleccionadas originalmente. Tales características incluyen la capacidad de sobrevivir el tránsito a través del estómago y el intestino delgado y colonizar el TGI humano. Los protocolos de prueba *in vitro* se pueden adoptar fácilmente para examinar el mantenimiento de la capacidad de una cepa para tolerar condiciones ácidas, sobrevivir y crecer en presencia de bilis, y metabolizar sustratos selectivos (Tuomola et al. 2001).

Los resultados muestran que la sobrevivencia de *Bacillus* sp. 4A en el jugo gástrico es independiente del pH (Fig. 1). En pH=1,5, hubo una reducción de 5 unidades log después de 120 min, mientras que en la condición menos extrema (pH=3), no hubo modificación significativa en el número de viables.

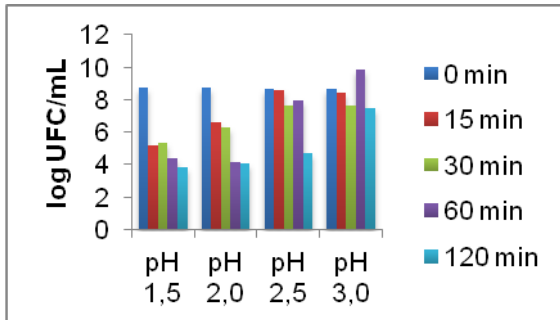


Figura 1: Recuento de *Bacillus* sp. 4A (log UFC/mL) después de contacto con jugo gástrico simulado con diferentes valores de pH por hasta 120 min.

Se observó que el jugo entérico simulado empleado fue capaz de revertir el efecto causado por el jugo gástrico. Las células provenientes del pH más bajo lograron recuperarse, aumentando 2 unidades logarítmicas después de 2 h, observando que luego de la exposición al jugo entérico por 24 h continúa con la misma cantidad de células viables (Fig. 2). Lo mismo se observó para la condición que provenía de pH=2,0. En el caso de las que provenían de pH=2,5 se observó un aumento de 4 unidades logarítmicas a las 4 h pero disminuye 2 unidades a las 24 h. Mientras que en la condición menos extrema, no se observó cambios significativos en el recuento de viables.

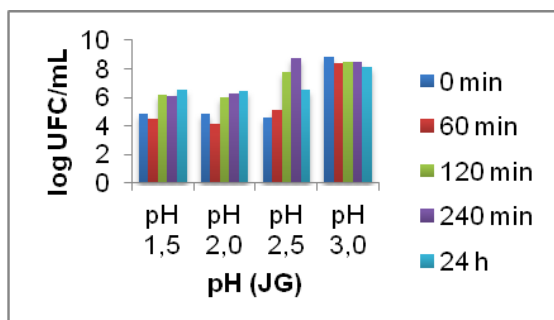


Figura 2: Recuento de *Bacillus* sp.4A (log UFC/mL) después de contacto con jugo gástrico simulado con diferentes valores de pH por 120min, seguido de contacto con jugo entérico simulado con pH=8,0 por hasta 24 h.

Por otro lado, la influencia positiva de las cepas probióticas de *Bacillus* sobre el crecimiento y la composición de las especies comensales y beneficiosas en el intestino podría estar mediada por la producción de enzimas, vitaminas y péptidos extracelulares (Elshaghabee et al., 2017).

Bacillus sp. 4A luego del paso por el jugo gástrico y entérico presentó un alto número de UFC, esto podría ser debido a la formación de biofilm por parte de esta cepa (datos no mostrados). Esto, coincide con lo publicado por Barbosa et al. (2005) quienes indican que si bien la formación de biofilm por microorganismos intestinales está bien reconocida, su relevancia específica para las cepas de *Bacillus* en el intestino aún no se ha determinado. Sin embargo, es concebible que los biofilms en la superficie del tracto gastrointestinal o de las partículas de alimentos proporcionen protección contra algunas de las tensiones físicas y químicas más duras que se encuentran en el intestino y por lo tanto promuevan su supervivencia y persistencia. Alternativamente, pero no exclusivamente, los biofilms podrían desempeñar un papel en la protección del epitelio intestinal de la adherencia de agentes patógenos. Aislamientos naturales de *B. subtilis* son capaces de formar biofilms complejos, que

producen estructuras aéreas o cuerpos fructíferos, donde la formación de esporas ocurre preferentemente (Branda et al., 2001). De acuerdo con la sugerencia de que la esporulación puede ocurrir en el intestino (Rhee, Sethupathi, Driks, Lanning y Knight, 2004; Hoa et al., 2001), sigue siendo posible que los biofilms sirvan como el sitio preferido de esporulación en este entorno.

La técnica de difusión en agar, metodología empleada en este trabajo, fue apropiada para evaluar de manera cualitativa y rápida la posible acción antimicrobiana ejercida por los aislados (Fig. a y b). Los *Bacillus* sp. 86B y 230P no presentaron ningún tipo de acción antibacteriana frente a *L. innocua* 6a; *Bacillus* sp. 4A ejerció actividad antimicrobiana frente a *L. innocua* 6a, *L. innocua* 7, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *P. aureuginosa* ATCC 27853, y no presentó actividad frente a *E. coli* ATCC 25922 y *E. faecalis* ATCC 29212 (Tabla 1).

Se ha informado que diferentes cepas de *Bacillus* muestran actividad antimicrobiana, anti-oxidativa e inmunomoduladora en el huésped. Los probióticos se exploran en diversos estudios, donde estas actividades se encontraron conectadas a su capacidad
Tabla 1
Actividad antimicrobiana de quien de la cepa de *Bacillus* sp. 4^a

Cepas indicadoras	Diámetro de halos
<i>L. innocua</i> 6 ^a	+++
<i>L. innocua</i> 7	+++
<i>L. monocytogenes</i>	++
ATCC 7644	
<i>P. aureuginosa</i>	++
ATCC 27853	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-

Referencia: -: ausencia; +: halos de entre 0-0,5 cm.; ++: halos de entre 0,5-1,0 cm.; +++: halos mayores a 1,0 cm

de producir péptidos antimicrobianos, pequeñas moléculas de efecto extracelular y su capacidad de interactuar con el huésped con la ayuda de las características de adhesión y fijación (Khochamit, Siripornadulsil, Sukon, y Siripornadulsil, 2015).

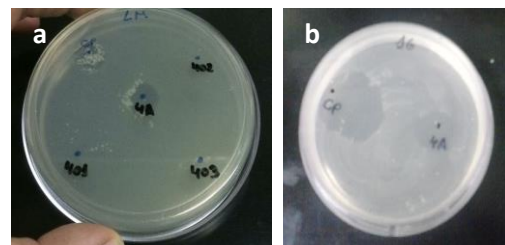


Figura 3: Actividad antimicrobiana de *Bacillus* sp 4A frente a *L. innocua* 6 a (a). y *L. innocua* 7 (b)

Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que *Bacillus* sp. 4A es un potencial probiótico, y su aplicación, así como la de sus metabolitos, para inhibir el crecimiento de *L. innocua* y otros patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) beneficiarían al consumidor, a lo largo de

la vida útil esperada de un alimento procesado.

Bibliografía

Alou, M. T., Rathored, J., Khelaifia, S., Michelle, C., Brah, S., Diallo, B. A., ..., Lagier, JC (2015). *Bacillus rubiinfantis* sp. nov. strain mt2(T), a new bacterial species isolated from human gut. *New Microbes New Infect.*, 8, 51–60. doi: 10.1016/j.nmni.2015.09.008.

Barbosa, T. M., Serra, C. R., La Ragione, R. M., Woodward, M. J., & Henriques, A. O. (2005). Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 968–978. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.2.968-978.2005>

Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., & Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11621–11626

Caceres, P. y Gotteland, M. (2010). Probiotics in Chile: ¿Which are the strains and what are their effects on human health? *Revista chilena de Nutrición*, 37(1), 97-109

Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C. y Panwar, H. (2017). *Bacillus* As

Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1490. doi: 10.3389/fmicb.2017.01490

FAO/WHO (2001). Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization expert consultation report. Rome, Italy. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf

FAO/OMS (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf

Farías, L. M., Totola, A. H., Miranda, C. M. S., Carvalho, M. A. R. y Damasceno, C. A. V. (1994). Extration, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of *Bacteroides fragilis* isolated from *Callithrix penicillata*. *Res. Microbiol.*, 145, 9-16.

Hoa, T. T., Duc, L. H., Isticato, R., Baccigalupi, L., Ricca, E., Van, P. H., & Cutting, S. M. (2001). Fate and Dissemination of *Bacillus subtilis* Spores in a Murine Model. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3819–3823.

- Hong, H. A., Khaneja, R., Tam, N. M. K., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M.,... y Cutting, S. M. (2009). *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. Res. Microbiol., 160(2), 134–143. doi: 10.1016/j.resmic.2008.11.002
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A. H. y Deschamps, A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol., 61, 193–197. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00366-4
- Khochamit, N., Siripornadulsil, S., Sukon, P. y Siripornadulsil, W. (2015). Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin producing *Bacillus subtilis* KKU213: potential as a probiotic strain. Microbiol. Res., 170, 36–50. doi: 10.1016/j.micres.2014.09.004
- Lee, Y. (2009). Selection and maintenance of probiotic microorganisms. In: Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons, USA. P 178-185.
- Ortega, R., Marcos, A., Aranceta, J., Mateos, J., Requejo, A. y Serra Majem, L. (2002). Alimentos Funcionales. Probióticos. 1ª Edición. Madrid. Médica Panamericana.
- Rauch, M y Lynch, S. (2012). The potential for probiotic manipulation of the gastrointestinal microbiome. Current Opinion in Biotechnology, 23(2), 192-201. doi: 10.1016/j.copbio.2011.11.004
- Rhee, K. J., Sethupathi, P., Driks, A., Lanning, D. K. y Knight, K. L. (2004). Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. J. Immunol., 172(2), 1118 -1124.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technology properties. J. Biotechnology, 84(3), 197-215.
- Saavedra, J. M. (2001). Clinical applications of probiotic agents. Am J Clin Nut, 73(6), 1147-1151.
- Stomatova, I. (2010). Probiotic activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* in the oral cavity. Helsinki University print. 260p.
- Thakur, N., Rokana, N. y Panwar, H. (2016). Probiotics: selection criteria, safety and role in health and disease. J. Innov. Biol., 3(1), 259–270.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. and Salminen, S. (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. Am J Clin Nutr 73, 393–398.

Financiamiento

El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Proyecto PIP 0677/2015