Revista Veterinaria
ISSN (*paper*): 1668-4834
ISSN (*on line*) 1669-6840

Rev vet 33 (1): 48-52, 2022
www.vet.unne.edu.ar
Cabral 2139, Corrientes 3400, Argentina

Capacidad de *Lactiplantibacillus plantarum* de reducir *biofilms* de bacterias patógenas transmitidas por alimentos

Ruiz, M.J.; García, M.D.; Padola, N.L.; Etcheverría, A.I.

Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Centro de Investigación Veterinaria (CIVETAN), Tandil, Argentina.
E-mail: jruiz@vet.unicen.edu.ar

Resumen

Ruiz, M.J.; García, M.D.; Padola, N.L.; Etcheverría, A.I.: *Capacidad de Lactiplantibacillus plantarum de reducir biofilms de bacterias patógenas transmitidas por alimentos.* *Rev. Vet. 33: 1, 48-52, 2022.* El uso de *L. plantarum* LP5 con potencial probiótico puede ser un enfoque alternativo para reducir la formación de *biofilms* de patógenos involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en las industrias alimentarias. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad reductora de *biofilms* de *L. plantarum* sobre el biofilms de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, *Salmonella tiphymurium* y *Staphylococcus aureus*. Fueron realizados tres ensayos: competencia, exclusión y desplazamiento. En las pruebas de competencia y exclusión, la producción de *biofilms* de STEC, *S. tiphymurium* y *S. aureus* fueron reducidas por efecto antibacteriano de *L. plantarum* LP5 ($p<0,01$). En la prueba de desplazamiento, si bien el *biofilm* producido por *S. aureus*, ejerció resistencia frente a *L. plantarum* LP5 ($p<0,01$), los *biofilms* de STEC y *S. tiphymurium* fueron reducidos al incorporar el cultivo de *L. plantarum* LP5 ($p<0,01$). Por lo tanto, el efecto antagónico de *L. plantarum* LP5 demostrado por la capacidad reductora de *biofilms* de bacterias patógenas involucradas en ETA lo convierte en una cepa con potencial aplicación antibacteriana en la industria alimentaria.

Palabras clave: *Lactiplantibacillus plantarum*, biofilms, patógenos, enfermedades transmitidas por alimentos.

Abstract

Ruiz, M.J.; García, M.D.; Padola, N.L.; Etcheverría, A.I.: *Ability of Lactiplantibacillus plantarum to reduce biofilms of pathogens involved in foodborne diseases.* *Rev. Vet. 33: 1, 52, 2022.* The use of *L. plantarum* LP5 with probiotic potential may be an alternative approach to reduce the formation of biofilms of pathogens involved in foodborne diseases in food industries. The objective of this study was to evaluate the reducing capacity of *L. plantarum* biofilms on the biofilms of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella tiphymurium* and *Staphylococcus aureus*. Three tests were carried out: competition, exclusion and displacement. In the competition and exclusion tests, the production of biofilms of STEC, *S. tiphymurium* and *S. aureus* were reduced by the antibacterial effect of *L. plantarum* LP5 ($p<0.01$). In the displacement test, although the biofilms produced by *S. aureus*, exerted resistance against *L. plantarum* LP5 ($p<0.01$), the biofilms of STEC and *S. tiphymurium* were reduced when incorporating the culture of *L. plantarum* LP5 ($p<0.01$). Therefore, the antagonistic effect of *L. plantarum* LP5 demonstrated by the reducing capacity of biofilms of pathogenic bacteria involved in foodborne diseases makes it a strain with potential antibacterial application in the food industry.

Key words: *Lactiplantibacillus plantarum*, biofilms, pathogen, foodborne diseases.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados: bacterias planctónicas -de libre flotación- y bacterias que forman *biofilms* o comunidades, que son aquéllas que cuando se enfrentan a una superficie, se adhieren a ella y a continuación, elaboran señales químicas para coordinar dichas comunidades [6].

Los *biofilms* están estructurados principalmente por grandes colonias de bacterias incrustadas en una matriz polimérica extracelular [5, 16]. La capacidad de crear *biofilms* no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos son capaces de formarlos [9].

Recibido: Noviembre 2021. Aceptado: Enero 2022.

Las bacterias patógenas tienen la capacidad de adherirse y formar *biofilms* en diversos sistemas, incluyendo superficies, equipos y/o utensilios de la industria alimenticia, donde crean una fuente permanente de contaminación del alimento. La matriz orgánica de un *biofilm* proporciona a los microorganismos una barrera protectora extraordinaria frente a agresiones externas.

Se estima que los microorganismos presentes en un *biofilm* pueden ser mil veces más resistentes a los desinfectantes convencionales que las bacterias en estado planctónico. Esto puede conducir a la contaminación de los alimentos y al desarrollo de enfermedades, como así también a pérdidas económicas debido al rechazo del producto [1].

Además del riesgo de contaminación, el desarrollo de *biofilms* puede interferir en diferentes procesos y causar daños en equipos. En sistemas de agua potable, estas comunidades pueden obstruir las cañerías disminuyendo su velocidad y capacidad de transporte, originando un incremento en el consumo energético. En las superficies metálicas pueden causar corrosión debido a la producción de ácido por las bacterias [4].

Dichas contaminaciones pueden ser provocadas por numerosas especies de microorganismos de deterioro, como así también patógenos, entre los que se destacan: STEC, *Salmonella sp* y *S. aureus.* Las bacterias, sobre todo patógenas, pueden adherirse a casi cualquier tipo de superficie, como plástico, metal, vidrio, madera, partículas del suelo y productos alimenticios [10].

Por lo tanto, en la industria alimentaria resulta fundamental su tratamiento ya que podrían derivar en la producción de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). La Organización Mundial de la Salud (OMS) determina que las ETA vinculan a *biofilms* y trastornos digestivos debido a una posible contaminación cruzada durante el proceso de producción de alimentos. De esta manera, se puede establecer una relación entre los microorganismos que habitan en una planta de producción y el alimento que se produce en la misma. Esto pone en riesgo la salud de los consumidores y el renombre de la empresa que ha expedido los alimentos en cuestión [7].

Por otro lado, se ha demostrado que las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden formar *biofilms* sobre material biótico y abiótico para fines industriales o funcionan como efectores antagonistas contra varios patógenos transmitidos por los alimentos en el modo de crecimiento planctónico o *biofilms* [17].

Lactobacillus sp es un género bacteriano ampliamente utilizado como probiótico. En los últimos años, el interés por los probióticos como complementos nutricionales ha aumentado significativamente y el concepto se está aplicando en diferentes y variadas matrices. *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum* LP5) tiene una gran capacidad para adaptarse a nichos ambientales y la particularidad de presentar capacidad antibacteriana frente a diferentes bacterias patógenas [14].

El objetivo de este estudio fue evaluar el uso de *L. plantarum* LP5 como método de control *in vitro* de la formación de *biofilms* por patógenos involucrados en ETA como *Escherichia coli* productor de toxina *Shiga* (STEC), *Salmonella tiphymurium* (*S. tiphymurium*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección y condiciones de crecimiento de las cepas

Las cepas patógenas involucradas en la producción de ETA seleccionadas para los distintos tratamientos fueron: STEC O157:H7 (*EDL933*) aislada de un caso clínico de síndrome urémico hemolítico (SUH) y *S. Tiphymurium* y *S. aureus* aisladas previamente de criaderos de cerdos y boca de expendio de carne de cerdo respectivamente, en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de Buenos Aires [2]. Las tres cepas patógenas fueron activadas en caldo *Luria Bertani* (*LB*, Britania, Argentina) durante 24 h a 37°C en aerobiosis.

La BAL utilizada fue *L. plantarum* LP5 de origen porcino identificada previamente por secuenciación de *Sanger* del 16S ribosomal y probada actividad antibacteriana *in vitro* contra patógenos involucrados en brotes alimentarios: STEC, *S. Typhimurium*, *S. aureus* y *C. coli* [13, 14]. *L. plantarum* LP5 fue activado en caldo *Man Rogosa Sharpe* (MRS, Britania, Argentina) durante 24 h a 37°C en aerobiosis.

Las cepas patógenas y *L. plantarum* LP5 fueron conservadas en caldo LB (Britania, Argentina), y MRS (Britania, Arg.) respectivamente, con 20% de glicerol a -0°C.

Evaluación de reducción de biofilms de bacterias patógenas

La capacidad de las BAL de reducir *biofilms* de las bacterias patógenas se realizó con base en una técnica descripta anteriormente [18], con modificaciones. Fueron utilizadas placas de 24 pocillos de fondo plano conteniendo vidrios circulares de 1 mm de espesor, removibles. Se realizaron tres ensayos:

Competencia: *L. plantarum* LP5 y las bacterias patógenas fueron co-cultivadas en los pocillos. Una concentración de 10^5 UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml) de ambos cultivos (*L. plantarum* LP5 y STEC, *L. plantarum* y *S. Tiphymurium* y *L. plantarum* y *S. aureus)* fue colocada en diferentes pocillos. Las placas se incubaron a 37°C durante 72 h en aerobiosis. Los vidrios fueron lavados con *phosphate buffered saline* (PBS, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM) pH 7,1 colocados en tubos con 5 ml de solución fisiológica (ClNa 0,85%) y agitados durante 2 h.

De cada tubo, fueron sembrados 100 µl en placas de MRS (Britania, Argentina) para recuento de *L. plantarum* LP5 y MacConkey (Britania, Argentina) para STEC, *Salmonella-Shigella* (S-S, Britania, Argentina) para *S. Tiphymurium* y Agar Manitol Salado (AMS, Britania, Argentina) para *S. aureus.* Los cultivos patógenos fueron incubados a 37°C durante 24 h en aerobiosis y *L. plantarum* LP5 a 37°C durante 24 h en anaerobiosis.

Exclusión: en cada pocillo fue colocado *L. plantarum* LP5 en una concentración de 10^5 UFC/ml e incubado a 37°C durante 72 h. Los vidrios fueron lavados con PBS pH 7,1 (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM) y colocados en nuevos pocillos. Las bacterias patógenas en una concentración de 10^5 UFC/ml fueron inoculadas sobre los pocillos con *biofilms* de *L. plantarum* LP5.

Incubación. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 h en aerobiosis. Los vidrios fueron lavados con PBS pH 7,1 (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM), colocados en tubos con 5 ml de solución fisiológica (ClNa 0,85%) y agitados durante 2 h. De cada tubo, fueron sembrados 100 µl en los medios y en las condiciones previamente mencionadas para cada una de las bacterias buscadas.

Desplazamiento

En cada pocillo fueron colocadas las bacterias patógenas en una concentración de 10^5 UFC/ml e incubadas a 37°C durante 72 h. Los vidrios fueron lavados con PBS pH 7,1 (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM) y colocados en nuevos pocillos. *L. plantarum* LP5 en una concentración de 10^5 UFC/ml fue inoculado sobre los pocillos con *biofilms* de los patógenos.

Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 h en aerobiosis. Los vidrios fueron lavados con PBS pH 7,1 (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 140 mM, KCl 3 mM), colocados en tubos con 5 ml de solución fisiológica (ClNa 0,85%) y agitados durante 2 h. De cada tubo, fueron sembrados 100 µl en los medios y en las condiciones previamente mencionadas para cada una de las bacterias buscadas.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo tres veces, con muestras triplicadas por ensayo, y los resultados se expresaron como promedio. Las desviaciones estándar fueron determinadas con el programa *Excel* (Microsoft Corp., EEUU). Una prueba "t" en el intervalo de confianza del 95% con *PASW Statistics SPSS* 17 (IBM Co.) fue realizada para determinar la significación estadística de los datos.

RESULTADOS

Reducción de biofilms de patógenos por competencia

El ensayo de competencia mostró una cuantificación promedio de STEC y de *L. plantarum* LP5 más STEC de 4,99 log_{10} UFC/ml y 1,83 log_{10} UFC/ml, respectivamente; de *S. Tiphymurium* y de *L. plantarum* LP5 más *S. Tiphymurium* de 5,25 log_{10} UFC/ml y 1,74 log_{10} UFC/ml, respectivamente; y de *S. aureus* y de *L. plantarum* LP5 más *S. aureus* de 5,29 log_{10} UFC/ml y 1,34 log_{10} UFC/ml, respectivamente.

Reducción de biofilms de patógenos por exclusión

El ensayo de exclusión mostró una cuantificación promedio de STEC y de *L. plantarum* LP5 más STEC de 4,96 log_{10} UFC/ml y 1,42 log_{10} UFC/ml, respectivamente; de *S. Tiphymurium* y de *L. plantarum* LP5 más *S. Tiphymurium* de 5,27 log_{10} UFC/ml y 1,24 log_{10} UFC/ml, respectivamente; y de *S. aureus* y de *L. plantarum* LP5 más *S. aureus* de 5,01 log_{10} UFC/ml y 1,19 log_{10} UFC/ml, respectivamente. La producción de *biofilms* de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* fue menor que la producción de *biofilms* de cada patógeno co-cultivado con *L. plantarum* LP5 ($p<0,01$; Figura 1).

Reducción de biofilms de patógenos por desplazamiento

El ensayo de desplazamiento mostró una cuantificación promedio de STEC y de *L. plantarum* LP5 más STEC de 4,52 log_{10} UFC/ml y 3,32 log_{10} UFC/ml, respectivamente; de *S. Tiphymurium* y de *S. Tiphymurium*

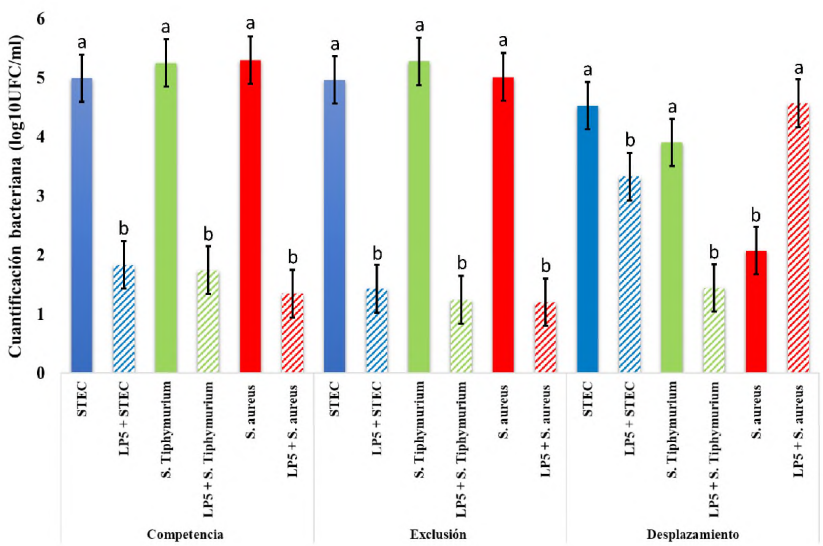

Figura 1. Cuantificación de bacterias patógenas y *L. plantarum* LP5 en los ensayos de competencia, exclusión y desplazamiento.

y de *L. plantarum* LP5 más *S. Tiphymurium* de 3,90 $\log_{10}$ UFC/ml y 1,44 $\log_{10}$ UFC/ml, respectivamente; y de *S. aureus* y de *L. plantarum* LP5 más *S. aureus* de 2,07 $\log_{10}$ UFC/ml y 4,56 $\log_{10}$ UFC/ml, respectivamente (Figura 1).

La producción de *biofilms* de STEC y de *S. Tiphymurium* fue menor que la producción de *biofilms* de los dos patógenos cuando fue incorporado el cultivo de *L. plantarum* LP5 ($p<0,01$; Figura 1). Por el contrario, la producción de *biofilms* de *S. aureus* fue mayor que la producción de *biofilms* de *S. aureus* cuando fue incorporado el cultivo de *L. plantarum* LP5 ($p<0,01$, Figura 1).

Las medias identificadas con letras diferentes indican diferencias significativas ($p\leq0,05$) entre *L. plantarum* LP5 y STEC, *L. plantarum* LP5 y *S. Tiphymurium* y *L. plantarum* LP5 y *S. aureus* para cada ensayo (competencia, exclusión y desplazamiento). Las barras indican la desviación estándar.

DISCUSIÓN

La presencia de *biofilms* representa una preocupación en la industria alimentaria porque las bacterias pueden adherirse a casi cualquier tipo de superficie, como plástico, metal, vidrio, partículas de suelo y productos alimenticios de madera [7].

En el presente estudio *in vitro* fue demostrada la característica antagónica de *L. plantarum* LP5 frente a bacterias patógenas sobre una superficie abiótica como el vidrio. Estos resultados concuerdan con quienes evidenciaron que bacterias del género *Lactobacillus* sp presentan acción antibacteriana natural sobre *biofilms* de bacterias patógenas adheridas a superficies como poliestireno y acero inoxidable [12].

En otro estudio, la actividad de formación de *biofilms* se realizó *in vitro* en dos materiales: vidrio y poliestireno y la mayor actividad antagónica se mostró contra *S. aureus* y STEC [19]. Otros investigadores [7], también obtuvieron resultados similares ante *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella Tiphymurium* en placas de poliestireno utilizando especies de BAL.

En el ensayo de competencia, mediante co-cultivo de *L. plantarum* LP5 y cada uno de los patógenos, fue observada una notable reducción de los *biofilms* de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*. Estos resultados son consistentes con los estudios reportados previamente por investigadores que por competencia y/o producción de metabolitos [13, 14] confirmaron la capacidad antibacteriana de *Lactobacillus* sp y *L. plantarum* LP5, respectivamente.

En el ensayo de exclusión, en el que sobre un *biofilm* formado por *L. plantarum* LP5 se adiciona cada cultivo patógeno, fue observada una inhibición de la formación de *biofilms* de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*. Estos resultados coinciden con quienes evaluaron la capacidad de un aislado de *Lactobacillus* sp. para formar un *biofilm* fuerte, que proporcionaría el efecto inhibidor contra varias bacterias patógenas [8, 11].

La capacidad de BAL para inhibir la formación de *biofilms* de *Bacillus cereus, Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *S. Tiphymurium* podría estar mediada por la presencia de metabolitos antimicrobianos [17]. Un estudio de secuenciación de genoma completo demostró que *L. plantarum* LP5 presenta genes codificantes de planta ricinas (datos no publicados). Así, la producción de compuestos proteínicos activos antimicrobianos, explicaría la capacidad protectora del medio, que impide la formación de *biofilms* por bacterias patógenas.

En el ensayo de desplazamiento, en el que sobre un *biofilm* formado por cada patógeno, se adiciona la cepa potencialmente probiótica, los resultados variaron. Sobre el *biofilm* formado por STEC y por *S. Tiphymurium*, *L. plantarum* LP5 produjo un efecto reductor.

La matriz establecida por los patógenos no fue lo suficientemente consistente para resistir la capacidad antimicrobiana de *L. plantarum* LP5. De esta forma, la capacidad antimicrobiana de *L. plantarum* LP5 ha superado la matriz establecida por los patógenos que generalmente protege la región periférica del *biofilm* patógeno [15].

Por otro lado, el *biofilm* formado por *S. aureus*, logró resistir el efecto antibacteriano de *L. plantarum* LP5. Esta particularidad de *S. aureus* podría ser explicada por el mecanismo de supervivencia por formación de *biofilms* que le otorga resistencia a los antimicrobianos. No obstante, la OMS lo ha incluido en la categoría de "alta" prioridad de patógenos resistentes a los antibióticos que representan una amenaza para la salud pública [15].

Woo y Ahn [18] demostraron la actividad inhibitoria de diferentes *Lactobacillus* sp sobre *biofilms* a través de mecanismos de competición, exclusión y desplazamiento, similares a los del presente estudio. Otros [3] han evaluado probióticos comerciales para inhibir, competir y desplazar la adhesión de patógenos potenciales, siendo necesario evaluar cada BAL con el patógeno específico.

Recientemente se informó que las BAL presentaban características potenciales como alternativas para el control de la formación de *biofilms* de bacterias patógenas en la industria alimentaria, sin conferir un riesgo a los consumidores [7].

En conclusión, este estudio demuestra que *L. plantarum* LP5, disminuye en gran medida la formación de *biofilms* de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* principalmente por competencia y exclusión. Por lo tanto, el uso de *biofilms* potencialmente probióticos, puede ser un enfoque alternativo para reducir la formación de *biofilms* de bacterias patógenas involucradas en ETA en las industrias alimentarias.

REFERENCIAS

1. **Castellano P** *et al.* 2017. Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: a focus

on meat ecosystems and industrial environments. *Microorganisms* 5: 38.

2. **Colello R** *et al.* 2018. Detection and characterization of *Salmonella* serotypes in the production chain of two pig farms in Buenos Aires Province, Argentina. *Front Microbiol* 9: 1370.
3. **Collado MC, Meriluoto J, Salminen S.** 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *J Appl Microb* 45: 454-460.
4. **Chmielewski RA, Frank JF.** 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2: 22-32.
5. **Chole RA, Faddis BT.** 2003. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129: 634-636.
6. **Flemming HC, Wuertz S.** 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 17: 247-260.
7. **Gómez NC, Ramiro JM, Quecan BX, Melo BD.** 2016. Use of potential probiotic lactic acid bacteria biofilms for the control of *Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: H7 biofilms formation. *Front Microbiol* 7: 863.
8. **Jalilsood T** *et al.* 2015. Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming *Lactobacillus* isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins. *Microb Cell Fact* 14: 1-14.
9. **Jones SE, Versalovic J.** 2009. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce anti-microbial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol* 9: 1-9.
10. **Khelissa SO, Abdallah M, Jama C, Faille C, Chihib NE.** 2017. Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic surfaces and strategies to overcome their persistence. *J Mater Environ Sci* 8: 3326-3346.
11. **Ndahetuye JB, Koo OK, O'Bryan CA, Ricke RC, Crandall PG.** 2012. Role of lactic acid bacteria as a bio-sanitizer to prevent attachment of *Listeria monocytogenes* F6900. *Nat Rev Microbiol* 17: 247-260.
12. **Ouali FA** *et al.* 2014. Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *Int J Food Microbiol* 191: 116-124.
13. **Ruiz MJ, Colello R, Padola NL, Etcheverría AI.** 2017. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* sp sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Rev Argent Microbiol* 49: 174-177.
14. **Ruiz MJ** *et al.* 2021. *In vitro* screening and *in vivo* colonization pilot model of *Lactobacillus plantarum* LP5 and *Campylobacter coli* DSPV 458 in mice. *Arch Microbiol* 1-11.
15. **Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R.** 2017. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J* 11: 53.
16. **Suresh MK, Biswas R, Biswas L.** 2019. An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int J Med Microbiol* 309: 1-12.
17. **Tatsaporn T, Kornkanok K.** 2020. Using potential lactic acid bacteria biofilms and their compounds to control biofilms of foodborne pathogens. *Biotechnol Rep (Amst)* 26: e00477.
18. **Woo J, Ahn J.** 2013. Probiotic mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by foodborne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 56: 307-313.
19. **Zinigul S, Gulmira B, Zakarya K, Raikhan D, Akhan A.** 2016. Screening of lactic acid bacteria for antagonism toward pathogens and biofilm-forming activity. *Earth Science Reviews* 11: 12.