



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ORIGINAL

Los fructanos de agave promueven la formación de biopelícula *in vitro* en el consorcio probiótico *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*

Mary Carmen Citlally Condado Huerta^a, Mayra Antunez-Mojica^b,
Haydee Martínez Plascencia^c y América Ivette Barrera Molina^{a,*}

^a Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México

^b CONACYT-Centro de Investigaciones Químicas-Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México

^c Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México

Recibido el 21 de abril de 2023; aceptado el 4 de febrero de 2024

PALABRAS CLAVE

Fructanos;
Biopelícula;
Bacterias ácido
lácticas;
Lactobacillus spp.

Resumen En los últimos años, la relación entre la microbiota intestinal (MI), el hospedero y las enfermedades crónicas no transmisibles ha generado interés por conocer de qué manera es posible mantener esa comunidad en el hospedero. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias gram positivas con actividad probiótica y beneficios demostrados para la salud, como la disminución de la masa de grasa corporal y del riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2. Uno de los principales mecanismos de colonización y supervivencia de las bacterias es la producción de biopelículas (BP) y la utilización de prebióticos como sustrato para lograr un equilibrio de la MI. Sin embargo, no existe evidencia suficiente para demostrar que los fructanos de agave (FA) promueven la formación de BP. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la formación de BP de un consorcio de BAL integrado por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en presencia de FA a distintas concentraciones: 0%, 0,1%, 4%, 8% y 16%. La adición de 0,1% de FA se correlacionó con una mayor capacidad para producir BP, de modo que se podría modular la formación de BP de estas bacterias mediante ese agregado. Las BP pueden tener un efecto positivo en el hospedero favoreciendo la homeostasis intestinal, la resistencia a la colonización, la estabilidad para la digestión de alimentos y las modificaciones químicas de los fármacos, además de tener efectos benéficos para la salud.

© 2024 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: america.barrera@uaem.mx (A.I. Barrera Molina).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.02.002>

0325-7541/© 2024 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: M.C.C. Condado Huerta, M. Antunez-Mojica, H. Martínez Plascencia et al., Los fructanos de agave promueven la formación de biopelícula *in vitro* en el consorcio probiótico. . . , Revista Argentina de Microbiología, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.02.002>

KEYWORDS

Fructans;
Biofilm;
Lactic acid bacteria;
Lactobacillus spp.

Agave fructanos promote *in vitro* biofilm formation with a probiotic consortium *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*

Abstract In recent years the relationship between the intestinal microbiota, the host and chronic non-communicable diseases has brought interest into the study of its formation and maintenance in the host. Lactic acid bacteria (BAL) are Gram-positive bacteria with probiotic activity, which have been associated with many health benefits, such as decreased body fat mass and lower risk of type II diabetes mellitus. One of the main colonization mechanisms and bacteria survival strategies is the production of biofilms and the use of prebiotics as substrates to achieve a balance within intestinal microbiota. However, there is not enough evidence to demonstrate the biofilm formation in the presence of agave fructans (AF). This study aimed to evaluate *in vitro* the biofilm formation in a consortium of lactic acid bacteria: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* in the presence of AF at different concentrations: 0%, 0,1%, 4%, 8% y 16%. The addition of 0,1% of AF correlates with the best capacity for biofilm formation. The findings imply the possibility of modulating the biofilm formation of lactic acid bacteria with AF. These results can contribute positively to the host, by generating intestinal homeostasis, colonization resistance, stability to food digestion and chemical modifications of drugs and carry out beneficial functions to the health.

© 2024 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Las interacciones simbióticas están ampliamente extendidas en la naturaleza y el ser humano no es la excepción. La mucosa intestinal humana es el nicho de aproximadamente 10 trillones de simbioses¹ que, en su conjunto, reciben el nombre de microbiota intestinal (MI)¹⁰. La MI está compuesta por bacterias (filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia y Cyanobacteria), arqueas, protozoos, bacteriófagos, virus que infectan organismos eucarióticos y hongos¹.

La composición y dinámica de la MI y la colonización del hospedero están determinadas por diversos factores, incluidos el estado dietético-nutricional, el ambiente, el estilo de vida, el binomio salud-enfermedad y la ingesta de fármacos, como antibióticos⁹. La MI desempeña una amplia variedad de funciones metabólicas: participa en la digestión y obtención de energía mediante la hidrólisis de los componentes de la dieta (glúcidos, proteínas y lípidos) y en la síntesis de vitaminas (K, B12, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico); además, favorece la absorción de diversos minerales como calcio, fósforo, magnesio y hierro⁸. Cuando la homeostasis de la MI se altera (disbiosis), se inicia un proceso inflamatorio de la mucosa intestinal, lo que conduce al desarrollo de enfermedades crónicas e infecciones oportunistas⁹. De ahí la importancia de mantener la homeostasis de la MI (eubiosis) para preservar la salud del individuo.

Actualmente, está demostrado que el desarrollo y mantenimiento de una MI sana puede lograrse a través de diversos mecanismos, por ejemplo, mediante una dieta rica en fibra y baja en grasa y disminuyendo el uso de antibióticos. Por otro lado, también se ha documentado el uso de compuestos bioactivos, provenientes principalmente de alimentos

vegetales¹², conocidos como prebióticos. Algunos ejemplos de prebióticos son los fructooligosacáridos (FOS), los galactooligosacáridos (GOS), la lactulosa y los oligosacáridos de la leche humana (HMO), a los que actualmente se suman como candidatos a prebióticos algunos minerales, polifenoles y ácidos grasos poliinsaturados¹⁸.

Los FOS son los prebióticos vegetales más frecuentemente utilizados en la terapia nutricional. Químicamente son oligosacáridos lineales de fructosa con enlaces β (2 $\rightarrow$ 1); dentro de este grupo, la inulina es uno de los FOS mejor caracterizados^{5,26}. La inulina otorga varios beneficios a la salud: tiene efectos antioxidantes, disminuye la obesidad, la resistencia a la insulina, la inflamación y la hiperuricemia, y mejora la mucosa intestinal, las enfermedades renales y el metabolismo de los lípidos, entre otros³⁰. Los beneficios de la inulina se relacionan con la mejoría de la MI dado que estimula el crecimiento de bacterias simbióticas benéficas (p. ej., bifidobacterias, lactobacilos, *Aureobasidium pullulans* y *Escherichia coli* no patógena) que pueden fermentar los prebióticos^{24,27}. Estas bacterias benéficas reciben el nombre de probióticos y pueden obtenerse exógenamente a través de la alimentación o de suplementos.

Los beneficios de los probióticos incluyen mejoría en enfermedades relacionadas con el intestino, el hígado y el sistema inmunitario, en enfermedades neurodegenerativas y en la obesidad, así como en la aterosclerosis, la depresión, las enfermedades infecciosas, las alergias, el síndrome metabólico, el cáncer y la diabetes mellitus^{8,20,32}.

Los probióticos más usados son las bacterias ácido lácticas (BAL), como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., y también especies de *Saccharomyces*²⁵. La eficacia de los probióticos depende, principalmente, de las propiedades microbiológicas y fisiológicas de las cepas seleccionadas⁸, así

como de las características bioquímicas de los prebióticos⁵. Existen preparaciones probióticas que se comercializan, como el VSL#3³⁴, que ya ha sido analizado en ensayos con humanos. Este producto está compuesto de cuatro cepas de *Lactobacillus* spp., tres de *Bifidobacterium* spp. y una de *Streptococcus* spp.^{11,19,33} y su uso se asoció con importantes mejorías en el tracto gastrointestinal²⁵. Otra preparación que incluye una mezcla de 11 cepas de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. mostró un alto potencial para el manejo del síndrome de intestino irritable a través de la inmunomodulación en el hospedero⁷.

Un aspecto importante para el mantenimiento de la MI en el intestino es la adhesión de las bacterias sobre las células epiteliales o la mucosa. Este proceso está relacionado con la formación de una biopelícula (BP). Las bacterias son capaces de formar BP una vez que alcanzan una densidad poblacional tal que la comunicación entre ellas es sincrónica (*quorum sensing*). La BP es un agregado de microorganismos dentro de una matriz de biopolímeros compuesta por el hospedero y el microorganismo, que se adhiere a partículas de alimento, a la mucosa o al epitelio²⁸. Los problemas en el desarrollo de la BP y su contacto con la mucosa están asociados a enfermedades intestinales, de tal modo que la formación de la BP contribuye a la homeostasis del intestino y a la organización, comunicación, estabilidad y resiliencia de la MI, así como a la digestión de los alimentos y modificación de algunos fármacos en el hospedero^{17,38}. En este sentido, la BP se está convirtiendo en un nuevo biomarcador para detectar algunas enfermedades como el cáncer colorrectal y la enfermedad de intestino irritable¹⁷.

La formación de la BP es un aspecto que debe ser considerado al momento de establecer consorcios bacterianos como posibles simbióticos para mejorar la MI. Por ello, este trabajo tuvo como objetivo evaluar *in vitro* la formación de BP de un consorcio de BAL, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, en presencia de fructanos comerciales originarios de agave (FCOA), tipo inulina.

Materiales y métodos

Condiciones de cultivo

Las cepas *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* se adquirieron de Danisco France S.A. (Dangé Saint Romain, Francia). Estas se encontraban liofilizadas y se activaron en medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS) (BD Bioxon) a 37°C por 24 horas en atmósfera microaerofílica, en contenedores de anaerobiosis de la marca Merck TM® (KGaA, Darmstadt, Alemania) al 5% de O₂.

Efecto prebiótico de fructanos de agave sobre BAL

Para evaluar la capacidad prebiótica de los fructanos de agave (FA) en las BAL de interés, se inoculó 500 µl de un cultivo fresco del consorcio en Erlenmeyer con 50 ml de caldo MRS previamente suplementado con FA (inulina) a distintas concentraciones: 0,1%, 4%, 8% y 16%. Estos cultivos se incubaron a 37°C durante 69 horas en las condiciones de anaerobiosis antes descritas. Transcurrido ese tiempo, se determinó la densidad óptica (DO) de los cultivos empleando

alícuotas de 200 µl y se la comparó con la DO inicial (que fue 0,1 en todos los casos). La DO se midió a una longitud de onda de 620 nm en un lector de placas microtiter (Labsystems Multiskan Ascent 354). Se incluyeron controles negativos de caldo MRS y caldo MRS adicionado con FA.

El análisis estadístico de los resultados incluyó la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples con la prueba de Tukey; se empleó el *software* GraphPAD Prism 8.0.1. Dotmatics.

Inducción de la formación de biopelícula en presencia de FA

Para evaluar la inducción de BP en presencia de FCOA, se usó el producto comercial Organic agave inulin® (*enature taste feel evolution*), México. Los cultivos de BAL se prepararon inoculando 500 µl de los cultivos frescos previamente activados en medio MRS adicionado con fructanos al 0,1%, 4%, 8% y 16%. La formación de BP se ensayó en microplacas Microtiter™ de 96 pocillos de fondo plano, en cada pocillo se colocó 200 µl de MRS adicionado con el consorcio de cepas y los FA, todos los tratamientos se incubaron bajo las condiciones ya descritas durante 69 horas.

Tinción con cristal violeta

Para visualizar la producción de BP, al término de la incubación se desechó el sobrenadante y se realizaron cuatro lavados con agua destilada mediante agitación vigorosa para eliminar las bacterias no adheridas, luego se dejó secar la microplaca a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las BP adheridas en los pocillos fueron teñidas con 200 µl de violeta de genciana (Golden Bell®, México) al 0,1% durante cinco minutos, después el colorante fue retirado por decantación y los pocillos se lavaron nuevamente cuatro veces con 200 µl de agua destilada. Las microplacas se dejaron secar a temperatura ambiente durante una hora, luego se añadió 200 µl de caldo MRS y se dejó reposar durante cinco minutos. Para cuantificar la BP, las microplacas se llevaron a un lector de ELISA (Labsystems Multiskan Ascent 354) para medir la DO a 540 nm; se incluyó la lectura de un control negativo.

Clasificación de la capacidad de formación de biopelícula

Para clasificar el estímulo para la formación de BP ejercido por los FA sobre las BAL, se usaron placas de microtitulación. En función de la DO leída y de acuerdo con la clasificación propuesta por Manijeh et al.¹⁷, se delimitaron cuatro categorías de capacidad de formación de BP: no formadoras (0), débilmente formadoras (+), moderadamente formadoras (++) y fuertemente formadoras (+++) (tabla 1). El punto de corte del control (densidad óptica del control negativo [DOc]) se definió como tres desviaciones estándar (DE) más la DO media de los controles: DOc = DO media de los controles + (3 x DE de los controles). La DO final de cada una de las muestras se calculó como el valor de la DO medido menos el valor de DOc. Si dicha resta daba un valor negativo, este se anotaba como 0, mientras que cualquier valor positivo indicaba la producción de BP²⁹.

Tabla 1 Clasificación de la formación de BP basada en la DO medida a 540 nm¹⁶

No formadoras (0)	$DO \leq DOc$
Débilmente formadoras (+)	$DOc < DO \leq 2(DOc)$
Moderadamente formadoras (++)	$2(DOc) < DO \leq 3(DOc)$
Fuertemente formadoras (+++)	$3(DOc) < DO$

BP: biopelícula; DO: densidad óptica; DOc: densidad óptica del control negativo.

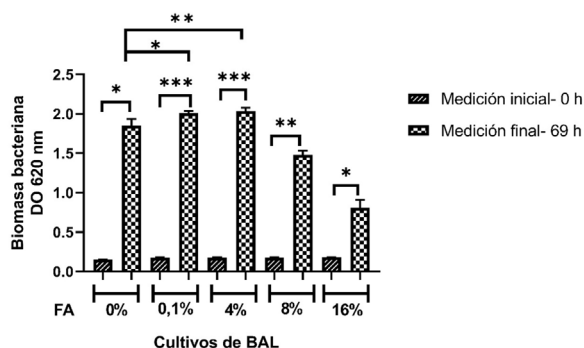


Figura 1 Crecimiento del consorcio de BAL en ausencia o presencia de FA a distintas concentraciones.

Se muestran valores de media $\pm$ DE. Uno (*), dos (**) o tres (***) asteriscos indican diferencias significativas para $p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.

BAL: bacterias ácido lácticas; DE: desviación estándar; FA: fructanos de agave.

Viabilidad bacteriana posformación de biopelícula

La viabilidad bacteriana posterior a la formación de BP se determinó tomando 50 μ l de sobrenadante del ensayo de inducción y sembrándolo en cajas de Petri que contenían agar MRS. Estas placas se incubaron en las condiciones de anaerobiosis descritas por 24 horas; con este ensayo se verificó la viabilidad de las bacterias formadoras de BP.

Resultados

Determinación del crecimiento de BAL en presencia de FA

Los FA indujeron el crecimiento de las BAL de manera significativa, como se observa en la figura 1. En todos los casos, la biomasa bacteriana en el punto final (69 horas) se incrementó con respecto al punto inicial (0 horas). En este sentido, los mayores incrementos se observaron con concentraciones de FA del 0,1% y 4%; sin embargo, se esperaba que a mayor concentración fuera proporcional el incremento de la biomasa.

Formación de biopelícula

Una vez comprobado el uso de los FA como fuente de carbono durante el crecimiento bacteriano, se decidió analizar la capacidad de los FA para promover la formación de BP. A la concentración de 0,1%, los FA mostraron una estimulación

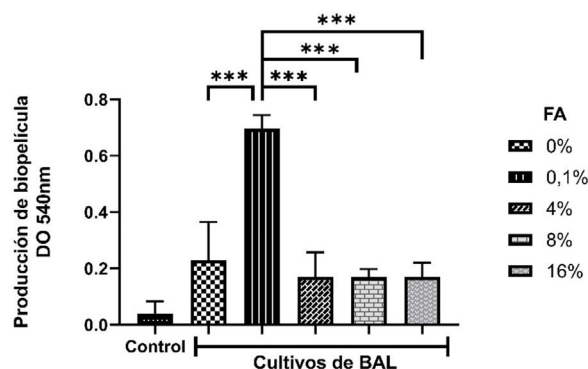


Figura 2 Formación de BP *in vitro* del consorcio de BAL en ausencia o presencia de FA a distintas concentraciones.

Se muestran valores de media $\pm$ DE. Control: muestra no inoculada. Tres (***) asteriscos indican diferencias significativas para $p < 0,001$.

BAL: bacterias ácido lácticas; BP: biopelícula; DE: desviación estándar; FA: fructanos de agave.

en la producción de BP con respecto al control (fig. 2). De acuerdo con los valores de DO obtenidos, el tipo de BP fue débil en los controles en ausencia de FA y fuerte en presencia de 0,1% de FA. A la concentración de 0,1%, la formación de BP fue casi dos veces mayor con respecto al control. Sin embargo, cuando se añadió 4%, 8% y 16% de FA, no se observó incremento en la producción de BP.

Aunque la inducción de la biomasa bacteriana en cultivos con 0,1% y con 4% de FA fue de similar magnitud (fig. 1), no sucedió lo mismo con la producción de BP, ya que no se observó incremento de la formación de BP en los cultivos a los que se les añadió concentraciones de FA de 4%, 8% y 16%.

La figura 3 muestra que hubo crecimiento bacteriano luego de 24 horas de incubación a partir de la siembra de todas las muestras enriquecidas con FA, lo que implica que el consorcio siguió viable tras la formación de la BP después de 69 horas de incubación en presencia FA. Asimismo, se puede notar el mayor efecto positivo de los FA a concentraciones del 0,1% y 4% con respecto a las concentraciones de 8% y 16%.

Clasificación de la formación de biopelícula por BAL en presencia de FA

De acuerdo con los valores obtenidos en una medición de punto final de DO a 540nm, las BAL se clasificaron en las siguientes cuatro categorías de tipo semicuantitativo: no formadoras de BP, débilmente formadoras, moderadamente formadoras y fuertemente formadoras.

Para establecer los límites, a partir de tres muestras consideradas como control negativo, se calculó la media, que fue 0,04. Para llegar al valor del punto de corte estándar (DOce), a ese valor se le sumó tres veces la DE de los controles, que fue 0,043.

$$DOce = 0,04 + (3 \times 0,043)$$

$$DOce = 0,169$$

Así, los valores superiores a 0,169 se consideraron indicadores de muestras formadoras de BP para este consorcio

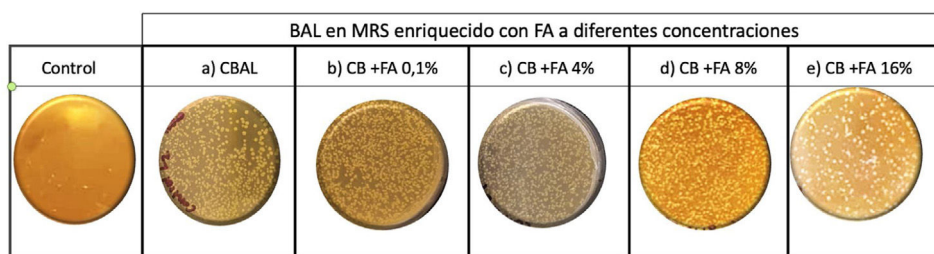


Figura 3 Viabilidad bacteriana posformación de BP.

Se muestra el crecimiento en MRS luego de 24 horas de incubación de alícuotas de cultivos controles no adicionados con FA (a) y de cultivos adicionados con 0,1% (b), 4% (c), 8% (d) y 16% (e) de FA.

BP: biopelícula; FA: fructanos de agave; MRS: Man Rogosa Sharpe.

Tabla 2 Clasificación semicuantitativa de la capacidad de formación de BP de BAL

Clasificación	Fórmula	Rangos
No formadoras (0)	$DO\ 540 \leq DO_{ce}$	$DO \leq 0,169$
Débilmente formadoras (+)	$DO_{oc} < DO\ 540 \leq 2(DO_{ce})$	$(0,169 < DO \leq 0,338)$
Moderadamente formadoras (++)	$2(DO_{ce}) < DO\ 540 \leq 3(DO_{ce})$	$(0,338 < DO \leq 0,507)$
Fuertemente formadoras (+++)	$3(DO_{ce}) < DO\ 540$	$(0,507 < DO)$

BAL: bacterias ácido lácticas; BP: biopelícula; DO: densidad óptica; DO_c: densidad óptica del control negativo; DO_{ce}: punto de corte estándar del control.

de BAL (tabla 2). El consorcio se comportó como débilmente formador de BP en ausencia de FA al 0,1% (la DO se ubicó entre 0,169 y 0,338) y como fuertemente formador de BP en presencia de FA al 0,1% (la DO superó el umbral de 0,507).

Discusión

En los últimos años, se han investigado minuciosamente los efectos perjudiciales para la salud humana de la formación de BP por bacterias patógenas gram negativas. Sin embargo, no se ha investigado extensivamente el beneficio que puede implicar para la salud humana la producción de BP de bacterias gram positivas, particularmente de las BAL, consideradas probióticos. Si bien varios estudios han investigado la capacidad de formación de BP de cepas de *Lactobacillus*^{4,31,37}, la evaluación de la formación de BP de las BAL en presencia de un sustrato específico, como los FA, ha sido poco explorada, aun cuando estos ya han sido considerados prebióticos.

Es importante evaluar la BP producida por bacterias calificadas como probióticos, ya que, de acuerdo con Kubota et al.¹⁴, la presencia de las BP, particularmente en BAL, funciona como un mecanismo de defensa frente a la colonización de otros microorganismos, es decir, las protegería frente a un ambiente hostil y evitaría la colonización por bacterias patógenas. Las BAL consideradas formadoras de BP corresponden a *Lactobacillus rhamnosus*¹³, *Lactobacillus plantarum*¹⁴ y *L. rhamnosus GG*³. En este estudio nos hemos centrado en la BP mixta formada por *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*; los resultados obtenidos son similares a los reportados por Rezaei et al.²⁴, quienes encontraron que los microorganismos que formaron BP más fuertes fueron *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus brevis* y *L. lactis* subsp. *lactis*, e incluso tuvieron efectos

antibacterianos más notorios en comparación con las bacterias que se encontraban en forma planctónica. Ya se ha evidenciado que algunas BAL poseen los genes y las enzimas requeridas para llevar a cabo la fermentación de fructanos, para su posterior utilización¹⁶. Sin embargo, existe un vacío con respecto a las funciones específicas de estos genes. Tampoco se ha determinado qué especies de BAL tienen afinidad por sustratos específicos, como los fructanos, ni qué concentración es la más adecuada para que haya un efecto de estimulación en la producción de exopolisacáridos (EPS) y la formación de BP.

En este estudio se utilizaron FA y se comprobó que el consorcio microbiano de BAL evaluado fue capaz de utilizarlos mediante la fermentación para obtener energía y aumentar la biomasa y la formación de BP. Esto concuerda con los resultados publicados por Probert et al.²³, quienes informaron que los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentan enzimas denominadas fructosil-furanosidasas, las que pueden degradar los enlaces β de los fructanos, por lo que esta característica les permite crecer en los medios que incluyan dichos carbohidratos como fuente energética. Asimismo, Cerning et al.⁶ y Oleksy et al.²¹ mencionan que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden estar implicadas directamente en el rendimiento y la composición de los exopolisacáridos biosintetizados por *Lactobacillus* para la formación de BP, así como también en las interacciones entre distintas fuentes de carbono en un mismo medio de cultivo.

En este estudio se utilizó un tiempo de fermentación de 69 horas, un pH de 4 y una temperatura de 33 °C. Adesulu et al.² y Wang et al.³⁵ informaron que el tiempo de cultivo, la temperatura y el pH influyen en el crecimiento y la producción de EPS por BAL para la formación de BP.

El tiempo de incubación utilizado en nuestros experimentos se considera dentro de los parámetros de un cultivo

de fermentación prolongada; incluso microscópicamente se observó que las BP se encontraban en la etapa de maduración e iniciando la etapa de dispersión. Los valores de la DO 540nm reflejan una disminución en la producción de BP de las muestras de BAL + FA al 4%, 8% y 16%, ya que a esas concentraciones se consideran formadores de BP débil. Esto podría ser el resultado de la producción de enzimas que degradan la BP por parte de estas bacterias. En el 2000, Phan et al.²² informaron por primera vez que se detectan hidrolasas de glucósidos al final de la fase de crecimiento logarítmico y en la fase de declive en los cultivos de *L. rhamnosus* R, lo que puede explicar la degradación de EPS en cultivos prolongados de BAL. Estos resultados fueron confirmados por Tsuda et al.³³ y por Zhang et al.³⁷, quienes comunicaron que la disminución en las cantidades de EPS para la formación de BP después de una incubación prolongada de diferentes cepas de *Lactobacillus* productoras de EPS se debía a la acción de las glucohidrolasas en el cultivo, que catalizan la degradación de los exopolisacáridos. De la misma forma, Lin et al.¹⁵ y Yang et al.³⁶ mencionan que la posible presencia de glucohidrolasas que hidrolizan EPS a monómeros podría causar la disminución en el rendimiento de EPS durante la fermentación prolongada, y, por lo tanto, la disminución en la formación de BP. Sin embargo, Skyberg et al.²⁹ reportaron que la cantidad de BP fue sensiblemente mayor en los medios mínimos, tal como se observó en el presente estudio y en concordancia con lo informado en investigaciones anteriores, Sadekuzzaman et al.²⁶ mostraron que tanto la adherencia bacteriana como la formación de BP son estimuladas en condiciones de escasez de nutrientes en el medio. Nuestros resultados indican que las condiciones experimentales son fundamentales y que es necesario seguir evaluando diferentes concentraciones de FA y distintos tiempos de fermentación para llegar a conclusiones más firmes con respecto de los efectos *in vitro* de los FA sobre las BAL y la formación de BP.

Conclusiones

Los FCOA (compuestos con beneficios para la salud ya reportados en la literatura) en una concentración del 0,1% fueron capaces de estimular el crecimiento bacteriano y la producción de exopolisacáridos para la formación de BP de tipo fuerte en un consorcio de BAL compuesto por *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *S. thermophilus*. Se comprobó que la disponibilidad de fructanos es importante para que estas bacterias puedan tener el sustrato necesario para producir exopolisacáridos y formar la BP como método de supervivencia. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de modular la formación de BP de las BAL a partir del uso de FCOA al 0,1% para aumentar su supervivencia y permitir que ejerzan funciones benéficas para la salud humana, evitando el desequilibrio de la MI y previniendo las enfermedades relacionadas con ese desbalance.

Agradecimientos

MCC Condado-Huerta agradece a CONACYT por la beca de posgrado otorgada número 741677.

Financiación

No se contó con entidad financiera. Solo con apoyo de beca de manutención otorgada a la autora por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número 741677.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Adak A, Khan MR. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76:473–93.
- Adesulu-Dahunsi AT, Jeyaram K, Sanni AI, Banwo K. Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. *PeerJ.* 2018;6:e5326.
- Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, von Wright A. Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:351–4.
- Ambalam P, Kondepudi KK, Nilsson I, Wadtröm T, Ljungh Å. Bile stimulates cell surface hydrophobicity Congo red binding and biofilm formation of *Lactobacillus* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;333:10–9.
- Benjamin JL, Hedin CRH, Koutsoumpa A, Ng SC, McCarthy NE, Hart AL, Kamm MA, Sanderson JD, Knight SC, Forbes A, Stagg AJ, Whelan K, Lindsay JO. Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease. *Gut.* 2011;60:923–9.
- Cerning J, Renard CM, Thibault JF, Bouillanne C, Landon M, Desmazaud M, Topisirovic L. Carbon source requirements for exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:3914–9.
- Chen Y, Zhang L, Hong G, Huang C, Qian W, Bai T, Song J, Song Y, Hou X. Probiotic mixtures with aerobic constituent promoted the recovery of multi-barriers in DSS-induced chronic colitis. *Life Sci.* 2020;240:117089.
- Darb Emamie A, Rajabpour M, Ghanavati R, Asadolahi P, Farzi S, Sobouti B, Darbandi A. The effects of probiotics, prebiotics and synbiotics on the reduction of IBD complications, a periodic review during 2009-2020. *J Appl Microbiol.* 2021;130:1823–38.
- El-Sayed A, Aleya L, Kamel M. Microbiota's role in health and diseases. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2021;28:36967–83.
- Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19:55–71.
- Fedorak RN, Feagan BG, Hotte N, Leddin D, Dieleman LA, Petrunia DM, Enns R, Bitton A, Chiba N, Paré P, Rostom A, Marshall J, Depew W, Bernstein CN, Panaccione R, Aumais G, Steinhart AH, Cockeram A, Bailey RJ, Gionchetti P, Wong C, Madsen K. The probiotic VSL# 3 has antiinflammatory effects and could reduce endoscopic recurrence after surgery for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13:928–35.e2.
- Ishikawa H, Matsumoto S, Ohashi Y, Imaoka A, Setoyama H, Umesaki Y, Tanaka R, Otani T. Beneficial effects of probiotic *Bifidobacterium* and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study. *Digestion.* 2011;84:128–33.
- Jones SE, Versalovic J. Probiótico *Lactobacillus reuteri* biofilms producen factores antimicrobianos y antiinflamatorios. *BMC Microbiol.* 2009;9:35.

14. Kubota H, Senda S, Nomura N, Tokuda H, Uchiyama H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J Biosci Bioeng.* 2008;106:381–6.
15. Lin TY, Chien MFC. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chem.* 2007;100:1419–23.
16. Luca L, Oroian M, Lobiuc A. The prebiotic potential of some carbohydrate substrates on the growth of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Safety.* 2019;18:67–74.
17. Manijeh M, Mohammad J, Roha KK. The assessment of biofilm formation in Iranian meat processing environments. *Res J Microbiol.* 2008;3:181–6.
18. Motta JP, Wallace JL, Buret AG, Deraison C, Vergnolle N. Gastrointestinal biofilms in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18:314–34.
19. Naseer M, Poola S, Ali S, Samiullah S, Tahan V. Prebiotics and probiotics in inflammatory bowel disease: Where are we now and where are we going? *Curr Clin Pharmacol.* 2020;15:216–33.
20. Ng SC, Plamondon S, Kamm MA, Hart AL, Al-Hassi HO, Guenther T, Stagg AJ, Knight SC. Immunosuppressive effects via human intestinal dendritic cells of probiotic bacteria and steroids in the treatment of acute ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1286–98.
21. Oleksy-Sobczak M, Klewicka E, Piekarska-Radzik L. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains – Optimization of synthesis and extraction conditions. *LWT Food Sci Technol.* 2020;122:109055.
22. Phan TN, Reidmiller JS, Marquis RE. Sensitization of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus sanguis* in biofilms and suspensions to acid damage by fluoride and other weak acids. *Arch Microbiol.* 2000;174:248–55.
23. Probert HM, Gibson GR. Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2002;3:23–7.
24. Rezaei Z, Salari A, Khanzadi S. Biofilm formation and antibacterial properties of *Lactobacillus* isolated from indigenous dairy products. *J Food Qual Hazards Control.* 2021;8:162–8.
25. Rogha M, Esfahani MZ, Zargarzadeh AH. The efficacy of a synbiotic containing *Bacillus Coagulans* in treatment of irritable bowel syndrome: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2014;7:156–63.
26. Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan MFR, Ha SD. Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2015;14:491–509.
27. Selvamani S, Dailin DJ, Gupta VK, Wahid M, Keat HC, Natasya KH, Malek RA, Haque S, Sayyed RZ, Abomoelak B, Sukmawati D, Varzakas T, El Enshasy HA. An insight into probiotics bio-route: Translocation from the mother's gut to the mammary gland. *Appl Sci.* 2021;11:7247.
28. Selvamani S, Mehta V, Ali El Enshasy H, Thevarajoo S, El Adawi H, Zeini I, Pham K, Varzakas T, Abomoelak B. Efficacy of probiotics-based interventions as therapy for inflammatory bowel disease: A recent update. *Saudi J Biol Sci.* 2022;29:3546–67.
29. Skyberg JA, Siek KE, Doetkott C, Nolan LK. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *J App Microbiol.* 2007;102:548–54.
30. Spormann AM, Thormann K, Saville R, Shukla S, Entcheva P. Microbial biofilms. En: Greco RS, Prinz FB, Smith RL, editores. *Nanoscale Technology in Biological Systems.* Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 341–57.
31. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000;40:175–9.
32. Tawfik MM, Xie H, Zhao C, Shao P, Farag MA. Inulin fructans in diet: Role in gut homeostasis, immunity, health outcomes and potential therapeutics. *Int J Biol Macromol.* 2022;208:948–61.
33. Tsuda H, Miyamoto T. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Sci Technol Res.* 2010;16:87–92.
34. Tursi A, Brandimarte G, Papa A, Giglio A, Elisei W, Giorgetti GM, Forti G, Morini S, Hassan C, Pistoia MA, Modeo ME, Rodino' S, D'Amico T, Sebkova L, Sacca' N, Di Giulio E, Lizza F, Imeneo M, Larussa T, Di Rosa S, Annese V, Danese S, Gasbarrini A. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:2218–27.
35. Wang Y, Li C, Liu P, Ahmed Z, Xiao P, Bai X. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr Polym.* 2010;82:895–903.
36. Yang Z, Li S, Zhang X, Zeng X, Li D, Zhao Y, Zhang J. Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products. *J Biosci Bioeng.* 2010;110:53–7.
37. Zhang L, Liu C, Li D, Zhao Y, Zhang X, Zeng X, Yang Z, Li S. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *Int J Biol Macromol.* 2013;54:270–5.
38. Zdarta A, Kaczorek E. Nanomechanical changes in probiotic bacteria under antibiotics exposure: Implications on *Lactobacillus* biofilm formation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2023;1870:119533.