



HAL
open science

ANALISIS FISICOQUIMICO DE LA ADHESION DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS SOBRE ESPORAS DE *A. carbonarius* COMO MECANISMO DE BIOCONTROL

Josué Uriel Amador Hernández, Roberto Lazzarini Lechuga, Angélica Roman Guerrero, Isabelle Gaimé Perraud, Gabriela M Rodríguez Serrano, Gerardo Saucedo Castañeda

► **To cite this version:**

Josué Uriel Amador Hernández, Roberto Lazzarini Lechuga, Angélica Roman Guerrero, Isabelle Gaimé Perraud, Gabriela M Rodríguez Serrano, et al.. ANALISIS FISICOQUIMICO DE LA ADHESION DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS SOBRE ESPORAS DE *A. carbonarius* COMO MECANISMO DE BIOCONTROL. Retos de la Ingeniería química para el desarrollo nacional, Memorias del XL Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, pp.553-558, 2019. hal-03218493

HAL Id: hal-03218493

<https://hal.science/hal-03218493>

Submitted on 7 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ID 930 ANALISIS FISICOQUIMICO DE LA ADHESION DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS SOBRE ESPORAS DE *A. carbonarius* COMO MECANISMO DE BIOCONTROL

Josué Uriel Amador Hernández^a, Roberto Lazzarini Lechuga^b, Angélica Román Guerrero^a, Isabelle Gaimé-Perraud^c, Gabriela M. Rodríguez Serrano^a, Gerardo Saucedo Castañeda^a

^aDepto. de Biotecnología, ^bDepto. Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, ^cInstitut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia
ibqi.uriel@live.com.mx, saucedo@xanum.uam.mx

Resumen

El café es un cultivo que genera una cantidad importante de divisas, sin embargo esta actividad, presenta riesgos en caso de que el café no sea procesado adecuadamente y sufra contaminaciones por hongos filamentosos. En este trabajo se estudiaron, los mecanismos de interacción entre las bacterias ácido lácticas (BAL) del género *Lactobacillus*, para limitar el desarrollo de hongos como *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A en cerezas de café. Se estudió la interacción entre ambos microorganismos mediante microscopía electrónica de barrido y se encontró que las bacterias se adhieren sobre la superficie de las esporas con la consecuente inhibición de su germinación. Por lo que es necesario determinar los mecanismos responsables en este fenómeno adhesivo, para lo cual haciendo uso de microscopia de fuerzas atómicas (MFA) se determinó la rugosidad superficial ($Ra = 0.097 \pm 0.031 \mu m$) de esporas de *Aspergillus carbonarius*, como propiedad fisicoquímica que podría estar relacionada en la adhesión. Sin embargo, este fenómeno de adhesión también puede ser explicado mediante la interacción con moléculas específicas (adhesinas), por lo que se realizó un estudio de caracterización química superficial mediante espectroscopia infrarroja, al estar en contacto ambos microorganismos para determinar las biomoléculas que participan en la adhesión. Entre las cuales encontramos proteínas, polisacáridos y lípidos principalmente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan información para explicar en parte lo que sucede entre la interacción bacteria-espora, sin perder de vista que la adhesión está en función de distintos factores.

Introducción

El café es una importante fuente de divisas, aporta un aproximado de 25 000 millones de dólares a nivel mundial. Más del 90% de la producción de café tiene lugar en países en vías de desarrollo, en su mayoría de América del Sur [1], por lo que el café es considerado un producto de gran importancia económica. En los últimos 50 años se han detectado la presencia de micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, que contaminan diversos alimentos, no solo el café. La presencia de ocratoxina A (OTA) en el café se agrava en el procesamiento por vía seca o natural [2]. Las micotoxinas, como la OTA, están, asociadas a diversos trastornos de tipo neurotóxico, genotóxico, teratogénico, nefrotóxico, entre otras [3], por lo que, es considerado un problema con varias aristas de carácter económico, social y de salud pública. Con este antecedente, se propuso el uso de bacterias del género *Lactobacillus* como microorganismos antagonicos ya que tiene la capacidad de producir biomoléculas como ácidos orgánicos, péptidos, exopolisacáridos, entre otros mecanismos, capaces de limitar el desarrollo del hongo micotoxigénico y la producción de la OTA [4]. Recientemente ha crecido la atención sobre el uso de BAL como microorganismos de control de patógenos, debido a que han sido incluidas en la lista QPS (Presunción de seguridad calificada) para uso en la cadena de alimentos y piensos dentro de la Unión Europea (EFSA). Además, en los E.U. se les reconoce como microorganismos GRAS (Generally Recognized As Safe). Lo cual ha llevado a que las BAL sean una alternativa para el control de patógenos en sistemas alimenticios.

Cualquiera que sea el entorno en el que se encuentren las bacterias y los hongos, estos presentan interacciones muy diversas que pueden ir desde el antagonismo hasta el mutualismo. Estas interacciones comienzan a tomar relevancia para diseñar estrategias de control biológico [5,6]. En la actualidad se han descrito varios mecanismos para controlar el desarrollo de patógenos, los principales y más comunes son antibiosis (antagonismo mixto), competencia por nutrientes o espacio, interacciones directas (antagonismo directo) con el patógeno (parasitismo y acción de enzimas líticas).

Las bacterias lácticas han demostrado la capacidad de llevar a cabo mecanismos antagónicos de tipo directo y mixto. Sin embargo, es de interés particular estudiar los mecanismos antagónicos directos en contra del hongo micotoxigénico *A. carbonarius*. Se ha reportado que el contacto célula-célula entre hongos y bacterias puede resultar en cambios importantes en su fisiología e interacciones, incluso en la patogenicidad de los hongos [7]. Comprender el modo de acción de *L. plantarum* y la influencia de los factores fisicoquímicos en la adhesión bacteria-espora generará alternativas biotecnológicas que permitan hacer recomendaciones para prevenir, controlar o eliminar la ocratoxina A de las plantaciones de café.

El objetivo de este trabajo fue estudiar factores fisicoquímicos como las características superficiales, rugosidad, topografía, composición química de la espora del hongo, implicados en la adhesión entre ambos microorganismos y su asociación con el biocontrol de *A. carbonarius*.

Metodología

Preparación de cultivos microbianos.

Las BAL se cultivaron en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) BD Difco™ durante 24h a 30°C, se realizó una activación y 3 resiembras en las condiciones indicadas utilizando 10% v/v de inóculo en cada cultivo. Los hongos se cultivaron en medio PDA (Potato Dextrose Agar) BD Bioxon™ durante 7 días a 30°C. Posteriormente resuspendieron las esporas en Tween 80 al 0.1% y se resembraron en las condiciones mencionadas, al cabo de la incubación, las esporas fueron utilizadas para cada ensayo. Para el co-cultivo BAL-Hongo se colocó 90% v/v de suspensión de esporas [1×10^6 esp/mL] y 10% v/v de BAL, en tubos Ependorfs de 2mL y se dejaron en contacto ambos microorganismos durante 8h, para su posterior análisis.

Tratamiento de muestras.

Para el estudio en microscopía electrónica de barrido (SEM) y el estudio de rugosidad en microscopía de fuerzas atómicas (AFM) se utilizó una suspensión del co-cultivo BAL-Hongo descrito anteriormente y esporas de *A. carbonarius* (1×10^6 esp/mL) respectivamente para cada técnica.

Las suspensiones microbianas fueron fijadas con glutaraldehído durante 24 h y se lavaron con amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4. Posteriormente se adicionó tetraóxido de osmio como último fijador y se realizó una deshidratación con concentraciones crecientes de etanol (30-100%). Las células deshidratadas se colocaron en cápsulas de celulosa, para ser secadas con CO₂ al punto crítico (Tousimis modelo Samdri780B). Una vez secas las muestras fueron adheridas con ayuda de cinta doble carbón a un porta muestras de 25 mm tipo PIN y se recubrió con oro 60s x 4 tiempos (Dentron Vacuum Desk III).

Métodos analíticos

Para el estudio en microscopía electrónica de barrido (MEB), se utilizó un microscopio JEOL JSM-5900LV a 15 kV. Utilizando un cañón electrónico tipo termoiónico a alto vacío. Las imágenes se obtuvieron bajo detectores para imágenes de electrones secundarios (SE) y electrones retrodispersados (BSE). Para el estudio de MFA se utilizó un equipo Alpha300 RA combinación Raman-AFM. Modo tapping; las muestras se analizaron con el software Witec proyect FOUR 4.0.

Para el análisis de las muestras por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR). Se preparó un co-cultivo de BAL (1×10^7 cel/ml) y esporas de *A. carbonarius* (1×10^7 esp/ml) como ya se mencionó, se lavó con solución isotónica estéril. Se agregó 0.5-1ml del co-cultivo en portaobjetos de 25.4

x 76.2mm, se dejó secar el líquido a temperatura ambiente durante 24h, posteriormente se realizó el análisis en infrarrojo a longitud de onda media (1500-4000 cm^{-1}).

Resultados y discusión

En la Figura 1, se muestra la adhesión de las BAL a las esporas fúngicas determinado por MEB.

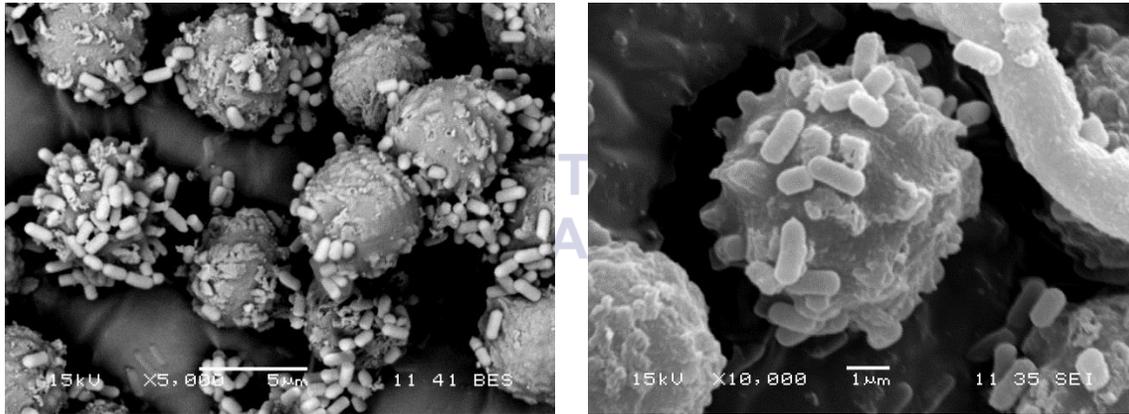


Figura 1. Adhesión de bacterias lácticas sobre la superficie de esporas fúngicas, como mecanismo de biocontrol.

Se determinó mediante MEB que la principal interacción bacteria-espora se fundamenta en el fenómeno de adhesión, el cual es considerado como "antagonismo directo" cuyo término es utilizado para describir casos en los cuales el contacto célula-célula del antagonista con el organismo inhibido es esencial para lograr biocontrol [8]. Cabe mencionar que estudios previos realizados en este grupo de trabajo han demostrado que la adhesión de la bacteria láctica estudiada sobre el hongo *A. carbonarius*, están asociados a altos grados de biocontrol del hongo micotoxigénico. Las micrografías A, B, mostradas en la Figura 2 representan la reconstrucción tridimensional topográfica de la superficie de las esporas fúngicas obtenido en MFA.

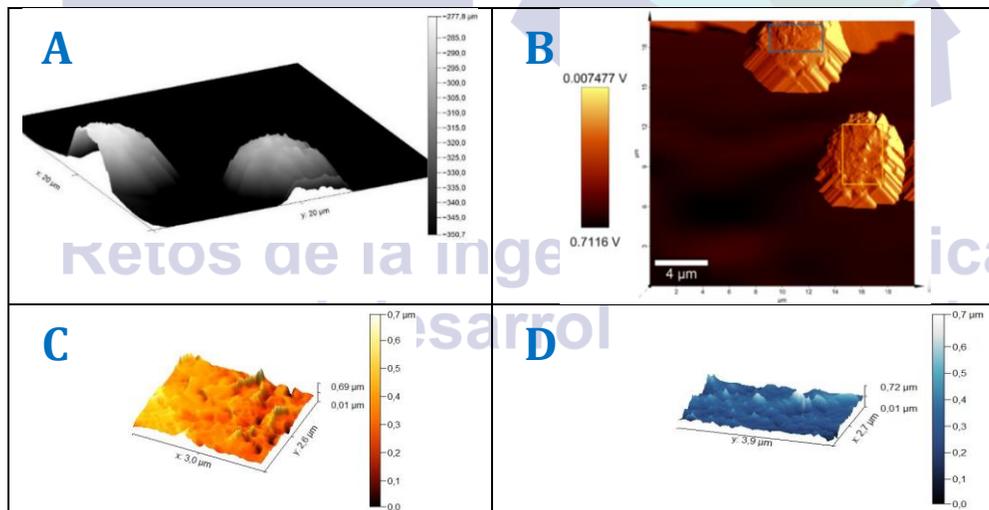


Figura 2. Micrografía A, reconstrucción tridimensional topográfica de la superficie de esporas fúngicas. Micrografía B, selección de área rectangular a escanear en modo tapping AFM; Micrografías C,D, resultado de escaneo modo tapping AFM y su reconstrucción topográfica respectiva a profundidad y altura de valles en μm .

Las micrográficas C y D representan el área topográfica estudiada mediante MFA modo tapping, de las cuales se realizó la cuantificación de rugosidad utilizando el método basado en el registro de perfiles de alturas.

La Tabla 1, muestra los parámetros de rugosidad estimados sobre la superficie de las esporas fúngicas. Ra= promedio aritmético de los valores absolutos de las alturas y Rrms = promedio de las desviaciones cuadráticas respecto a la altura media

Tabla 1. Rugosidad superficial de esporas de *Aspergillus carbonarius*

Rugosidad	<i>A. carbonarius</i>	$f(x) = 4\mu\text{m}^2$
Rrms μm	0.136 \pm 0.041	
Ra μm	0.097 \pm 0.031	

x=distancia de escaneo superficial

Respecto a la rugosidad superficial de las esporas se estimó el parámetro Ra= 0.097 \pm 0.031 μm . De acuerdo a la norma DIN 4769 la rugosidad encontrada en esporas fúngicas se puede clasificar como grado N3/N12, estos grados de rugosidad se crearon en la norma para una mayor facilidad de especificación y control en los materiales, y está en función del valor de Ra en μm por ser el parámetro utilizado mayoritariamente en el mundo. Este valor de rugosidad de la superficie de esporas se considera bajo-medio (Ra=0.1-0.2 μm), es decir 25-33% rugoso comparado con el material que es considerado en la norma como valor máximo, por lo que se plantea que la rugosidad presentada sobre la superficie de las esporas puede llegar a influir la adhesión bacteriana ya que las superficies que presentan algún grado de rugosidad exhiben condiciones como depresiones o valles superficiales, que pueden proporcionar sitios favorables para la colonización bacteriana. Sin embargo, por considerarse una rugosidad baja, podría no ser un factor que afecte en gran medida la capacidad bacteriana para adherirse sobre la superficie de las esporas fúngicas. Sin embargo, las propiedades de la célula bacteriana también juegan un papel fundamental en la adhesión y de ellas depende que el anclaje sea reversible o irreversible y esto es de suma importancia ya que de esto depende el biocontrol. La Figura 3 muestra el espectrograma característico de la composición química superficial de bacterias, lácticas, esporas fúngicas y la interacción bacteria-espora, analizadas en la región media del espectro infrarrojo.

Retos de la ingeniería química para el desarrollo nacional

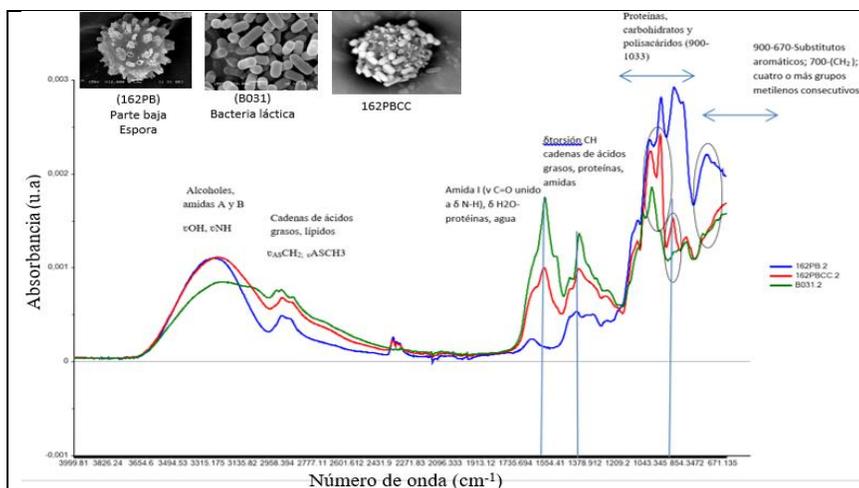


Figura 3. Espectrograma IR de esporas espículadas, bacterias lácticas, y bacterias adheridas sobre esporas espículadas

El análisis de los espectros infrarrojo (Figura 3) demuestran cambios en los enlaces químicos respectivos a la interacción bacteria-espora, presentes en el número de onda entre 2960 a 2850 (cm^{-1}), cuyos estados vibracionales corresponden a los enlaces $\nu_a \text{CH}_3$, $\nu_a \text{CH}_2$, νCH terciario, $\nu_s \text{CH}_3$, $\nu_s \text{CH}_2$, que podrían ser aportados por lípidos y ácidos grasos [9,10]. De igual manera la región en la cual se aprecia mayores cambios se encuentran en la región de 1600-1555 cm^{-1} (enlaces amida II, $\delta \text{N-H}$ unido a $\nu \text{C-N}$, amida I, $\nu \text{C=O}$ unido a $\delta \text{N-H}$), 1400-1300 cm^{-1} ($\delta \text{C-O-H}$, $\delta_s \text{CH}_3$, δCH , $\delta_{\text{torsión}} \text{CH}_2$, $\delta_{\text{torsión}} \text{CH}_2$, Amida III ($\nu \text{C-N}$ unido a $\delta \text{N-H}$) y 1100-800 cm^{-1} ($\nu \text{C-O}$, $\nu \text{C-C}$, $\delta \text{C-O-H}$, $\delta \text{CO-C}$, $\nu_s \text{C-OH}$) que pueden ser aportados por carbohidratos (polisacáridos), y proteínas [9,10]

La Figura 4, presenta el análisis de componentes principales de los espectros infrarrojos estudiados.

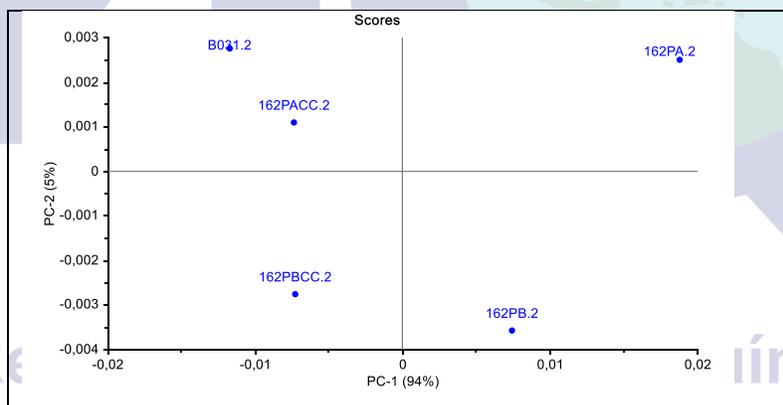


Figura 4. Análisis de componentes principales (PCA) de espectrogramas IR

Se logró demostrar mediante PCA (Figura 4) que los enlaces químicos presentes en la interacción bacteria-espora difieren de la composición química de los microorganismos por separado, esto implica que durante la interacción o adhesión bacteriana se generan nuevos enlaces químicos o incluso la composición química normal de los microorganismos de manera separada se ve modificada o alterada por la adhesión entre superficies, demostrándose como se describió anteriormente, que los principales grupos funcionales que presentaron cambios en el espectro infrarrojo, corresponden a carbohidratos (polisacáridos) y proteínas, por lo que es probable que estas moléculas estén implicadas en la adhesión bacteriana.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en MEB, permitieron determinar el contacto físico entre ambos microorganismos, por lo que se determinó que las BAL pueden presentar antagonismo tipo directo en contra del desarrollo de *A. carbonarius*. Por otra parte los factores superficiales como topografía y rugosidad superficial de esporas de *A. carbonarius* pueden influir en la adhesión bacteriana, sin embargo con ayuda de espectroscopia infrarroja se pudo detectar cambios en enlaces químicos relativos a proteínas superficiales, polisacáridos y ácidos grasos cuando las bacterias están adheridas sobre la superficie de la espora fúngica, por lo que se concluye que de manera concomitante los factores superficiales y las biomoléculas membranales están involucradas en los mecanismos de adhesión célula-célula.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT- México) y a la Agencia nacional de investigación (ANR-Francia) en el marco del proyecto “Use of lactic acid bacteria for the control of level of ochratoxin in coffee beans Proyecto FONCICYT 273656”, por los múltiples apoyos para estancias, congresos y financiamiento durante el trabajo de investigación.

Así mismo agradezco a Comité técnico organizador del XL Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ) 2019, por su trabajo y constancia para que este evento sea realizado.

Referencias

1. -Ponte, Stefano, "La revolución de Latte. Regulación, mercados y consumo en la cadena global del café", *Desarrollo mundial*, 30: 1099-1122, 2017.
2. -Hongyin Zhang, Maurice Tibiru Apaliya, Gustav K. Mahunu, Liangliang Chen, Wanhai Li, "Control of ochratoxin A-producing fungi in grape berry by microbial antagonists: A review", *Trends in Food Science & Technology*, 20163.
3. - Irène Ahou Kouadio, Louis Ban Koffi, Jean Gnopo Nemlin, Mireille Bretin Dosso, "Effect of Robusta (*Coffea canephora* P.) coffee cherries quantity put out for sun drying on contamination by fungi and Ochratoxin A (OTA) under tropical humid zone (Côte d'Ivoire)", *Food and Chemical Toxicology*, 6: 1969-1979. 2012.
4. - Nora Laref, Bettache Guessas and Mebrouk Kihal, "Antifungal Compounds Production in Different Temperatures, pH and on Modified MRS Agar by Lactobacillus Strains" *Journal of Biological Sciences*, 13: 94-99. 2013.
5. - Panke-Buisse K, Poole AC, Goodrich JK, "Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function" *ISME J.* 9: 980–989. 2015.
6. - Poudel R, Jumpponen A, Schlatter DC, "Microbiome networks: a systems framework for identifying candidate microbial assemblages for disease management", *Phytopathology*, 106: 1083–96. 2016.
7. - Nikawa H, Egusa H, Makihira S, Yamashiro H, Fukushima H, Jin C, Nishimura M, Pudji RR, Hamada T, "Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars", *Oral Microbiol. Immunol.* 16: 279–283. 2001.
8. - Neufeld, F. and Kuhn, H. "Untersuchungen ueber direkteri Bakterienantagonismus". *Ztschr. f. Hyg. u. Infektionsk.* 116: 95-110. 1934
9. - Socrates, G. "Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts". London England. John wiley & sons, ltd. Third Edition., ISBN 0-471-85298-8. (2001).
10. - Delille, A. "Etude in situ, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de *Pseudomonas fluorescens* et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous : application à la détection précoce du changement de la qualité microbiologique d'une eau de distribution" (tesis de doctorado) Université Henri Poincaré Nancy I. Francia. (2007).

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA

Vol.1, No. 1



**Retos de la ingeniería química
para el desarrollo nacional**

7 al 10 de mayo de 2019, Bahías de Huatulco, Oaxaca, México.

MEMORIAS DEL XL ENCUENTRO NACIONAL DE LA AMIDIQ

AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA

Vol. 1, No. 1

XL ENCUENTRO NACIONAL
DE LA AMIDIQ



**“RETOS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA PARA
EL DESARROLLO NACIONAL”**

Retos de la ingeniería química
para el desarrollo nacional

Memorias del XL Encuentro Nacional de la AMIDIQ

Bahías de Huatulco, Oaxaca, México

07 al 10 de Mayo de 2019

AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA, Vol. 1. No. 1, octubre 2020, es una publicación anual de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Canarias 704, Col. Portales, Delegación Benito Juárez, C.P. 03300, Ciudad de México, México. Tel. 3338464060. Página electrónica de la publicación: <https://amidiq.com/avances-en-ingenieria-quimica/> y dirección electrónica: avancesiq@amidiq.com. Editor responsable: Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz. Certificado de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo de Título *En Proceso*, ISSN *En Proceso*, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsables de la última actualización de este número: Dr. Miguel Ángel Morales Cabrera, Dra. María del Rosario Enríquez Rosado, Dr. Jorge Ramón Robledo Ortiz, Dra. Nelly Ramírez Corona, Dr. Adrián Bonilla Petriciolet, Dr. Fernando Israel Gómez Castro, Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. Canarias 704, Col. Portales, Delegación Benito Juárez, C.P. 03300, Ciudad de México, México. Fecha de última actualización: 31 de octubre de 2020. Tamaño del archivo: 138 MB.