



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

CÁTEDRA DE BACTERIOLOGÍA

“DETERMINACIÓN DE CIM Y CBM DE
LAS SUSTANCIAS TIPO BACTERIOCINAS
DE *Lactobacillus fermentum* L23 Y
L. rhamnosus L60 SOBRE *Escherichia coli*
O157:H7 Y NO O157:H7”

CHRISTIAN EMMANUEL ZAVALA

Trabajo Final de Grado para optar por el título
de Microbiólogo

Directora: Dra. PASCUAL, Liliana

2018

El presente trabajo se llevó a cabo siguiendo el reglamento de la asignatura Trabajo Final (código 2149), para la Carrera de Microbiología, avalado por el Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Se realizó durante el año 2017 en el laboratorio de Bacteriología, ubicado en el Departamento de Microbiología e Inmunología, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Alumno: Christian Emmanuel Zavala _____

Directora: Dra. Liliana Pascual _____

Jurados:
Dra. Carla Barberis _____

Dra. María de las Mercedes Oliva _____

*"Lo bueno de la ciencia es que es verdadera,
creas en ella o no"*

Neil deGrasse Tyson

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis padres, por darme la libertad y el apoyo para estudiar lo que elegí, por pasarse tardes ayudándome a repasar (o intentando, Pa, lo que vale es la intención jaja) antes de cada final, por aguantarme mis locuras (hereditarias de parte de los dos) y siempre inculcarme el respeto y la responsabilidad. A mi hermana Anto, que aun siendo chiquita siempre me tuvo fe en todo... y muchas veces más de lo que debería.

A mi familia:

- A mis primos, que por muchos años fueron lo más parecido a hermanos que tuve y que siempre los voy a considerar como tales, aunque nos peleemos, discutamos y saquemos de las casillas.
- A mis tios, en especial a mi tía Lili, que una vez me contó que existía esta carrera y desde ese momento supe que era lo que quería estudiar. Y a mi tía Gladys, que desde siempre estuvo en todo para mí, un millón de gracias petisa!
- A mis abuelos. Por la fe que siempre me tuvieron desde mucho antes de que eligiera esta carrera. En especial a mi abuela Neli, donde sea que estés, que de chiquito me acuerdo que decías: “este nene tiene buena cabeza”. Espero haber estado a la altura.

A Julia, mi amiga, compañera de salidas, lab-partner, psicóloga y celestina frustrada. Por el aguante, los mates (entre otras bebidas), las caminatas, las risas, las discusiones multitemáticas y los consejos mechados entre medio (aunque después no los siga, los escucho todos). Thanks to you, I'm here in my right mind and not (completely) insane. Un millón de gracias wachin!

A Vero, por su buena onda desde que la conocí allá hace como mil años! A Chor, dealer de fotocopias y compañera de tantos grupos, mil gracias por todo Chorchi! A Cindy, a quien conozco desde el primer día del ingreso y ha visto y colaborado en la formación de este intento de ser humano jaja. A Dari, por esas charlar súper nerd a las 3 de la mañana en alguna juntada. A Maru, por alegrarme los días con su buena onda y esa sonrisa permanente en la cara. A Cacho y Ro, por las risas, las patadas voladoras a las nueve de la mañana y esos comentarios en un tono de voz no tan silencioso (Ro...).

A los Copéodos! a los que estuvieron desde el primer día y a quienes se fueron sumando a lo largo de la carrera, fue un placer conocerlos a todos y aprender algo nuevo de cada uno. Aunque los vea seguido o no tanto, de cada uno me llevo recuerdos que no se me olvidan más: de las juntadas, los mediodías estudiando antes de los laboratorios, las noches sacándonos dudas por whatsapp, los festejos del día del estudiante en el bajo.. Mil gracias!

Al grupo de Bacteriología. A Liliana y Lucila, por la predisposición para compartir sus conocimientos y los consejos tanto académicos como personales. A Francesca, por su predisposición y apoyo para ayudarme a avanzar en mi formación como profesional. A Pauli, Anita y en especial a Jose, por la paciencia, la voluntad la buena onda y los consejos que me dieron mientras realizaba el trabajo final.

A Verónica Boscatto y la gente de K-dial. Por la buena voluntad para permitirme hacer mis prácticas profesionales y compartir sus conocimientos. Mil gracias Vero por tener la predisposición de enseñarme tanto, por la buena onda, las charlas y los consejos.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitirme formarme como persona y como profesional. Todas y cada una de las personas que conocí en estos años aquí me dejaron algo, bueno o a algunas veces no tanto, que contribuyó a formar la persona que soy ahora. Los años que pasé en la UNRC son de los mejores que viví y no la cambiaría por nada, muchas gracias!

INDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Bacterias ácido lácticas	2
1.1.2. Género <i>Lactobacillus</i>	2
1.1.2.1. Metabolitos antimicrobianos producidos por <i>Lactobacillus</i> spp.	4
1.1.2.1.1. Ácidos orgánicos	5
1.1.2.1.2. Peróxido de hidrógeno	5
1.1.2.1.3. Biosurfactantes	5
1.1.2.1.4. Bacteriocinas	6
1.1.3. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas	6
1.2. <i>Escherichia coli</i> : características generales	9
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> productoras de diarreas	9
1.2.2. Factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	11
1.2.3. Manifestaciones clínicas de las infecciones por <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	11
1.2.4. Síndrome urémico hemolítico	12
1.2.4.1. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico	14
1.3. Aplicación de lactobacilos o sus metabolitos como método de biopreservación de alimentos	16
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo general	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. Cepas de lactobacilos utilizadas: <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	20
4.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágicas	21
4.3. Conservación de los microorganismos utilizados	23
4.4. Estudio de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las cepas de lactobacilos sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágicas	24

4.4.1. Estudio de la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células y sobrenadante libre de células neutralizado de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 mediante la técnica de difusión en pozos	24
4.4.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre cepas de <i>E. coli</i> O157:H7 y no O157:H7 mediante la técnica de difusión en pozos	24
4.4.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica mediante la técnica de microdilución en caldo	26
4.4.4 Evaluación de la interacción entre las bacteriocinas L23 y L60 por la técnica de checkerboard	27
4.5. Análisis estadístico	29
4.6. Medios de cultivo utilizados	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1. Aislamiento e identificación de cepas de <i>Lactobacillus fermentum</i> y <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	32
5.2. Aislamiento e identificación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágicas	33
5.3. Estudio de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las cepas de lactobacilos sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> patógenas	35
5.3.1. Estudio de la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células y el sobrenadante libre de células neutralizado de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>L. rhamnosus</i> L60 mediante la técnica de difusión en pozos	35
5.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre cepas de <i>E. coli</i> O157:H7 y no O157:H7 mediante la técnica de pozos en el agar	39
5.3.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica mediante la técnica de microdilución en caldo	44

5.3.5. Evaluación de la interacción entre las bacteriocinas L23 y L60 por la técnica de checkerboard	46
6. CONCLUSIONES	48
7. BIBLIOGRAFÍA	50
8. ANEXO	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas propuesta por Heng y col. (2007)	7
Figura 2	<i>Escherichia coli</i> productoras de diarreas	10
Figura 3	Desarrollo de la enfermedad causada por <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	12
Figura 4	Patogenia de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	13
Figura 5	Casos y tasas (cada 100.000 habitantes) notificados de SUH en Argentina entre 2010 y 2017	15
Figura 6	Casos y tasas (cada 100.000 niños menores de 5 años) notificados de SUH en Argentina entre 2010 y 2017	15
Figura 7	Esquema de la determinación de la concentración inhibitoria mínima de los sobrenadantes neutralizados conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 por la técnica de difusión en pozos	25
Figura 8	Esquema de la determinación de la concentración inhibitoria mínima de los sobrenadantes neutralizados conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 mediante la técnica de microdilución en caldo	26
Figura 9	Esquema de las diferentes combinaciones de diluciones del sobrenadante neutralizado conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 utilizadas para la determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria mediante la técnica de checkerboard	28
Figura 10	Morfología de una cepa de <i>Lactobacillus</i> (1000x)	32
Figura 11	Observación microscópica de una cepa de <i>Escherichia coli</i> (1000x)	33
Figura 12	Fotografía de algunas pruebas bioquímicas para <i>Escherichia coli</i>	33
Figura 13	Halos de inhibición del crecimiento microbiano de una cepa de <i>Escherichia coli</i> producidos por los sobrenadantes libres de células sin neutralizar y neutralizados de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	37
Figura 14	Porcentaje de la actividad inhibitoria causada por las diferentes sustancias anticribianas producidas por <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	38

Figura 15	Porcentaje de la actividad inhibitoria causada por las diferentes sustancias anticobianas producidas por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60 sobre <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	38
Figura 16	Concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre una cepa de <i>E. coli</i>	43
Figura 17	Concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre una cepa de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	45
Figura 18	Concentración inhibitoria fraccionaria de las bacteriocinas L23 y L60 sobre <i>E. coli</i> enterohemorrágica	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cepas de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica utilizadas	22
Tabla 2	Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación del género <i>Lactobacillus</i>	32
Tabla 3	Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Escherichia coli</i>	34
Tabla 4	Halos promedio de inhibición de crecimiento de cepas de <i>Escherichia coli</i> producidos por los sobrenadantes libres de células y los sobrenadantes neutralizados de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	36
Tabla 5	Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina L23 sobre cepas de <i>Escherichia coli</i>	41
Tabla 6	Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina L60 sobre cepas de <i>Escherichia coli</i>	42
Tabla 7	Porcentaje de cepas de <i>Escherichia coli</i> sensibles a diferentes concentraciones inhibitorias mínimas de las bacteriocinas L23 y L60	43
Tabla 8	Concentración inhibitoria mínima y concentración inhibitoria fraccionaria de las bacteriocinas L23 y L60	46

1. RESUMEN

Las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) componen un subgrupo de bacterias patógenas capaces de causar síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. El SUH es un desorden multisistémico que afecta especialmente a niños y es la principal causa de insuficiencia renal aguda en esta población. La mayoría de los pacientes afectados por esta patología logran recuperarse con terapia de apoyo, aunque entre un 2 y 5% de los pacientes mueren y entre un 12 y 30% sufren secuelas graves. *E. coli* O157:H7 es el serotipo más frecuentemente aislado en casos de SUH, sin embargo son varios los serotipos capaces de causar la enfermedad. La aplicación de microorganismos probióticos, específicamente miembros del género *Lactobacillus*, o de las sustancias antimicrobianas producidas por estos microorganismos, se presenta como una valiosa herramienta para el biocontrol de ECEH. El objetivo de este trabajo fue determinar la mínima concentración de las sustancias tipo bacteriocinas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 necesaria para inhibir y eliminar a *E. coli* O157:H7 y no O157:H7, así como valorar el tipo de interacción entre dichas sustancias antimicrobianas. Se evaluó y cuantificó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células puros (SLC) y los sobrenadantes neutralizados (SLCN) conteniendo las bacteriocinas de ambos lactobacilos mediante la técnica de difusión en pozos. Luego, para evaluar las interacciones entre ambas sustancias se llevó a cabo la técnica de checkerboard. Como paso preliminar, se evaluó la CIM de ambas bacteriocinas sobre una cepa de *E. coli* mediante la técnica de microdilución en caldo y se determinó además su modo de acción. Mediante la técnica de difusión en pozos se observó que los sobrenadantes mantenían la mayor parte de la actividad antimicrobiana luego de ser neutralizados, la cual se atribuyó a las bacteriocinas contenidas en ellos. Incluso a bajas concentraciones ambas sustancias fueron capaces de inhibir el crecimiento de ECEH, observándose que la CIM de la bacteriocina L23 se encontró en un rango comprendido entre 40 y 80 UA ml⁻¹, mientras que la CIM de L60 presentó valores de entre 40 y 160 UA ml⁻¹ para todas las cepas ensayadas. Posteriormente, mediante la técnica de microdilución en caldo se determinó que ambas bacteriocinas presentaban una CIM de 160 UA ml⁻¹ sobre ECEH y un modo de acción bacteriostático. Finalmente, utilizando la técnica de checkerboard, se observó que estas sustancias antimicrobianas presentaban una interacción sinérgica sobre ECEH. En conclusión, ambas bacteriocinas podrían representar una estrategia alternativa promisoría para el biocontrol de este microorganismo patógeno.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivas con metabolismo fermentativo productoras de ácidos orgánicos, siendo el ácido láctico su principal producto. Son cocos o bacilos Gram positivos, inmóviles, que carecen de porfirinas y citocromos, no llevan a cabo fosforilación oxidativa y por lo tanto obtienen su energía exclusivamente mediante fosforilación a nivel de sustrato. Poseen además necesidades nutricionales complejas que incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas. Este grupo de bacterias se divide en base a los productos que generan como consecuencia de la fermentación de azúcares en homofermentadores, heterofermentadores obligados y heterofermentadores facultativos. Las diferencias observadas entre estos subgrupos se deben a la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, clave en la glucólisis (Madigan y col. 2009, Salvetti y col., 2013).

Las BAL comprenden varios géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, entre otros, y se han utilizado por siglos en la producción de alimentos fermentados. Se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza y han sido aisladas de tierra, materia vegetal en descomposición, alimentos (frutas, productos lácteos, carnes y pescados fermentados, jugos y vegetales encurtidos), aguas residuales y ensilados. Son además importantes componentes de la microbiota de los epitelios de la mucosa vaginal y del tracto gastrointestinal de humanos y animales (Madigan y col. 2009; Behnsen y col., 2013; Álvarez-Sieiro y col., 2016; Mokoena, 2017).

1.1.2. Género *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* comprende más de 200 especies caracterizadas de bacilos Gram positivos, no esporulados, inmóviles, catalasa negativos. Son microorganismos anaerobios facultativos o microaerófilos, cuyo crecimiento se ve favorecido en atmósferas con baja presión de oxígeno (5-10% de CO₂). Los lactobacilos pueden presentar un rango de temperaturas de crecimiento entre 2 y 53°C, siendo óptimo su desarrollo a temperaturas entre 30 y 40°C. Son microorganismos acidúricos, con un pH óptimo de crecimiento entre 5,5 y 6,2 (Vos y col., 2009; Duar y col., 2017).

Los microorganismos de este género presentan diversos requerimientos nutricionales, que pueden variar de acuerdo a las diferentes especies. Requieren para su crecimiento una fuente de carbohidratos fermentables, ácidos grasos o ésteres de ácidos

grasos, aminoácidos, péptidos, vitaminas, derivados de ácidos nucleicos y sales minerales. El medio más utilizado para su desarrollo es el medio MRS, diseñado por de Man, Rogosa y Sharpe, ya que provee todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de estos microorganismos (Vos y col., 2009).

Los lactobacilos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los ha aislado de fuentes muy diversas como suelo, agua, productos lácteos, carnes, pescados, bebidas fermentadas, frutas, entre otros. Además forman parte de la microbiota de la cavidad bucal, el tracto gastrointestinal y vaginal humano y de muchos animales (Vos y col., 2009; Duar y col., 2017).

Las especies del género *Lactobacillus* presentan un metabolismo fermentativo. En base a esto es posible clasificarlos en tres grupos metabólicos (Vos y col., 2009; Salvetti y col., 2012; Duar y col., 2017):

- Grupo A: lactobacilos homofermentativos obligados, fermentan las hexosas liberando ácido láctico por medio de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas o glucólisis. No fermentan pentosas ni gluconato.
- Grupo B: lactobacilos heterofermentativos facultativos, fermentan las hexosas a ácido láctico por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas. En condiciones limitantes de glucosa, pueden fermentar pentosas y gluconato debido a la acción de una fosfoacetolasa inducible produciendo ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico.
- Grupo C: lactobacilos heterofermentativos obligados, carecen de la enzima aldolasa por lo que metabolizan hexosas y pentosas por medio de la vía del fosfogluconato, produciendo ácido láctico, etanol y CO₂.

Muchos miembros del género *Lactobacillus* son considerados como microorganismos probióticos. Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador” (FDA, 2006). Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe cumplir con una serie de requisitos, entre los que se destacan (Huys y col., 2013):

- Identificación taxonómica a niveles de género, especie y cepa
- Carácter GRAS (“Generally Regarded As Safe”: generalmente reconocido como seguro para la salud)
- Ser microbiota normal y provenir de individuos sanos
- No presentar resistencia a antibióticos
- Ensayos *in vitro* e *in vivo* que demuestren el/los efecto/s probiótico/s adjudicado/s

- Resistencia a la acidez gástrica, bilis y a la lisozima
- Capacidad de adherirse y colonizar la mucosa epitelial

Entre los beneficios más importantes otorgados por los microorganismos probióticos se encuentran:

- Antagonismo sobre microorganismos patógenos

Las cepas probióticas pueden disminuir la invasión de microorganismos patógenos a las células de los epitelios en los que se encuentren al liberar productos antimicrobianos como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos, y la adhesión al liberar biosurfactantes (Ceresa y col., 2015; Patel y DuPont, 2015).

- Exclusión competitiva de microorganismos patógenos

Estas cepas compiten por nutrientes y sitios receptores con otros microorganismos. La capacidad de un probiótico para adherirse o interactuar con el epitelio genera un impedimento para la colonización por parte de microorganismos patógenos (Borges y col., 2013, Patel y DuPont, 2015; Gómez y col., 2016).

Los probióticos también estimulan, modulan y regulan el sistema inmune mediante la activación de genes específicos en las células del huésped. Tienen también un rol significativo en la angiogénesis intestinal, lo cual reduce la inflamación aguda y crónica causada por enfermedades inflamatorias intestinales. Además son capaces de reducir la intolerancia a la lactosa mediante la producción de la enzima β -galactosidasa, necesaria para su metabolismo. Otros de sus beneficios son la reducción de los niveles de colesterol en sangre, la prevención del desarrollo de tumores y la normalización del tránsito intestinal en pacientes que padecen cuadros de diarrea o constipación (Dicks y Botes, 2010; Cano-Garrido y col., 2015; George Kerry y col., 2018).

1.1.2.1 Metabolitos antimicrobianos producidos por *Lactobacillus* spp.

Los metabolitos antimicrobianos producidos por cepas de lactobacilos son sustancias que se liberan al medio e inhiben el crecimiento de otros microorganismos potencialmente patógenos. En general las especies del género *Lactobacillus* tienen la capacidad de producir diversas sustancias antimicrobianas, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, biosurfactantes y bacteriocinas.

1.1.2.1.1 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos disminuyen el pH del medio en el cual se encuentran, por lo que producen un efecto inhibitorio sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. La acumulación de ácidos orgánicos en el medio disminuye el pH, en estas condiciones dichas moléculas se encuentran en forma no disociada por lo que tienen afinidad por la membrana lipídica de las células bacterianas y pueden difundir libremente a través de la misma hacia el citoplasma. Una vez en el interior de las células, las moléculas de ácidos se disocian en protones cargados y aniones. Estos no pueden volver a difundir a través de la membrana hacia el exterior, por lo cual la acumulación de protones produce una disminución del pH intracelular llevando a una desnaturalización de las proteínas celulares, daño oxidativo, disminución de la fuerza protón-motriz y del transporte de nutrientes, e inhibición de la vía glucolítica con la consiguiente disminución de la producción de ATP. Por otra parte, la acumulación de aniones dentro de la célula interrumpe muchas funciones metabólicas y genera un aumento de la presión osmótica. Todos estos factores llevan a una inhibición del crecimiento bacteriano y finalmente la muerte del microorganismo. Los lactobacilos son capaces de sobrevivir y desarrollar a valores relativamente bajos de pH debido a que poseen una ATPasa translocadora de protones que cataliza el movimiento de iones hidrógeno a través de la membrana, resultando en el mantenimiento del pH intracelular (Theron y Lues, 2010; Wang y col., 2013).

1.1.2.1.2. Peróxido de hidrógeno

Algunos lactobacilos son capaces de producir y liberar al medio peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La actividad antimicrobiana de este metabolito se atribuye a su efecto oxidante en la célula bacteriana, causando daños en el ADN, desnaturalizando proteínas y alterando los lípidos de la membrana celular. Su principal efecto antimicrobiano es debido a la desnaturalización de las enzimas de la vía de la glucólisis. El transporte de glucosa, la actividad de la hexoquinasa y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa son inhibidos debido a la oxidación de sus grupos sulfhidrilo (Dicks y Botes, 2010).

1.1.2.1.3. Biosurfactantes

Los biosurfactantes son metabolitos anfipáticos producidos por una amplia variedad de microorganismos, que poseen tanto grupos hidrofílicos como hidrofóbicos dentro de la misma molécula, como glucolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos y compuestos poliméricos. La adsorción de estas moléculas a una superficie es capaz de reducir su hidrofobicidad,

interfiriendo con la adhesión microbiana. Su acción antimicrobiana se debe a la producción de alteraciones en la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las células sensibles (Sharma y col., 2014; Ceresa y col., 2015).

1.1.2.1.4. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana producidos por bacterias, que presentan un núcleo proteico al cual se pueden unir otras moléculas como glúcidos, lípidos, ADN y otros. Presentan un espectro de acción tanto sobre especies relacionadas como no relacionadas filogenéticamente (Yang y col., 2014; Ruíz y col., 2015; Álvarez-Sieiro y col., 2016).

La capacidad de producir bacteriocinas representa una ventaja adaptativa para la bacteria productora, ya que constituye una estrategia para el mantenimiento de la población y la reducción del número de microorganismos potencialmente patógenos (Yang y col., 2014). Muchas de estas sustancias naturales tienen un importante potencial biotecnológico tanto en la industria farmacéutica, alimentaria, medicina humana y veterinaria. Esto se debe principalmente a su amplio rango de actividad antimicrobiana y a la ausencia de resistencia cruzada con antibióticos (Ruíz y col., 2015). Los lactobacilos productores de bacteriocinas son de especial interés debido a la amplia utilización que estos microorganismos han tenido en la producción de alimentos a lo largo de la historia y debido a que son reconocidos como GRAS (Álvarez-Sieiro y col., 2016).

1.1.3. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas

Generalmente las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas son metabolitos antimicrobianos de bajo peso molecular. Dentro de las bacterias Gram positivas, las BAL son las principales productoras de bacteriocinas, las cuales presentan una variedad de tamaños, estructuras, propiedades fisicoquímicas y espectros de inhibición (Yang y col., 2014). Su modo de acción puede ser bacteriostático o bactericida. El primero implica un efecto inhibitorio del crecimiento microbiano sin afectar la viabilidad celular. Un efecto bactericida, en cambio, produce muerte celular, que puede causar lisis bacteriana o no. El modo de acción depende de varios factores tales como concentración y grado de purificación de la bacteriocina, estado fisiológico de los microorganismos sensibles y de las condiciones experimentales, como temperatura, pH o presencia de otros compuestos antimicrobianos (Bali y col., 2016).

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas son clasificadas de acuerdo a diferentes características como su estructura química, peso molecular, susceptibilidad a la acción de enzimas, termoestabilidad, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y modificaciones post-traduccionales. En base a dichas características, Heng y col. (2007) las agrupan en cuatro clases. La figura 1 muestra la clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas según dicha clasificación y se destacan los ejemplos más representativos de cada clase.

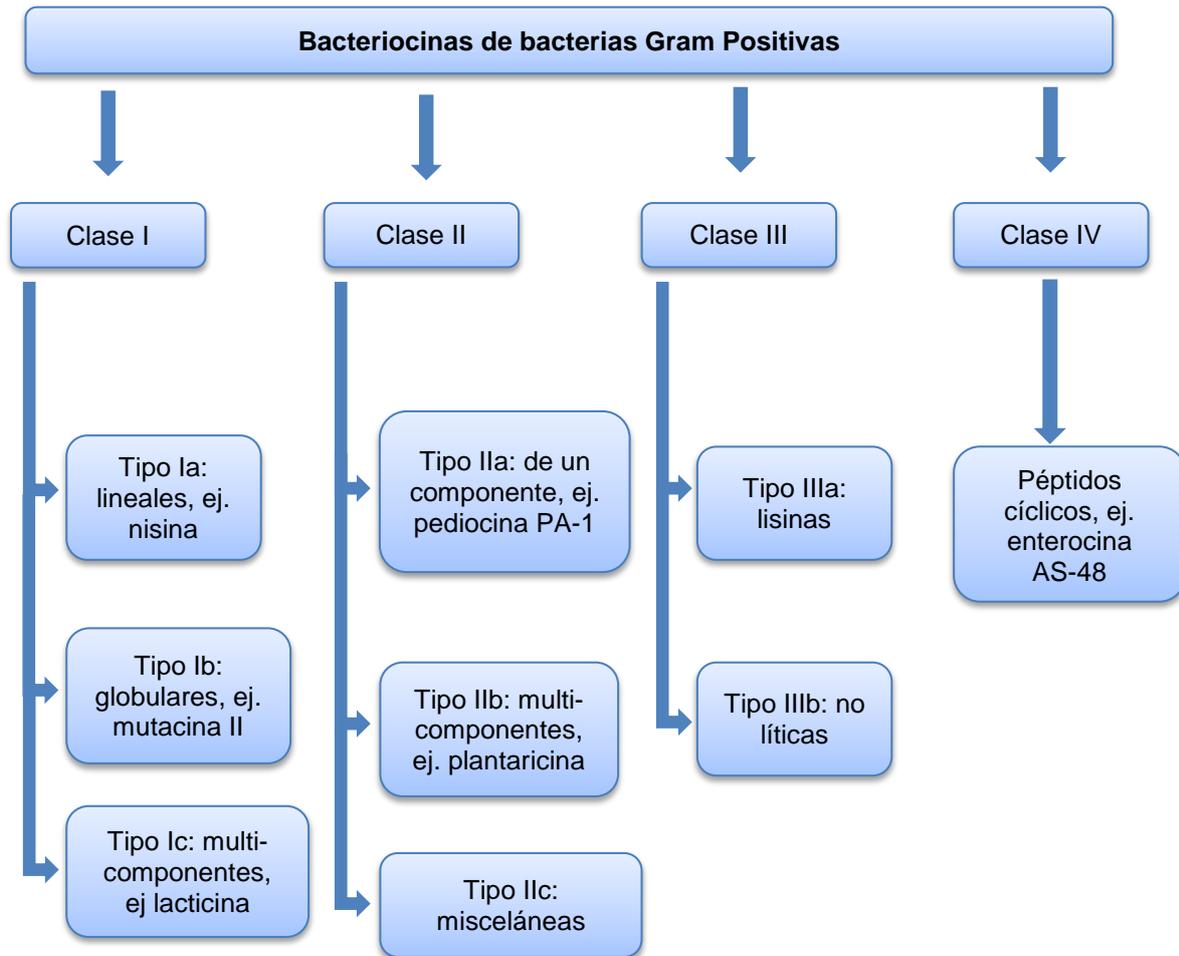


Figura 1: Clasificación de bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas propuesta por Heng y col. (2007)

Clase I: lantibióticos, pequeños péptidos de menos de 5 kDa compuestos por 19 a 34 aminoácidos, termoestables. Contienen residuos de aminoácidos inusuales como lantionina, β -metil lantionina y aminoácidos deshidratados. Las bacteriocinas de clase I a su vez se subdividen en:

Clase IA: moléculas de estructura lineal que producen poros en la membrana de células sensibles.

Clase IB: péptidos globulares aniónicos o neutros que reaccionan con las enzimas celulares.

Clase IC: incluye a los antibióticos cuya estructura está compuesta por más de una molécula.

Clase II: péptidos no antibióticos de menos de 10 kDa, contienen de 37 a 58 aminoácidos, con alto contenido de glicina. Son termoestables y no están modificados. Se insertan en la membrana de la célula bacteriana causando permeabilización, despolarización debido a la pérdida de iones y disminución de la concentración intracelular de ATP. Se subdividen en:

Clase IIa: bacteriocinas tipo pediocina, pequeñas de un componente.

Clase IIb: bacteriocinas que dependen de la actividad complementaria de dos péptidos para formar un complejo de formación de poro.

Clase IIc: abarca aquellas bacteriocinas de la clase II cuya peculiaridad impide clasificarlas en ninguno de los tipos anteriores.

Clase III: proteínas termolábiles de alto peso molecular (>10 kDa), se subdividen en dos tipos:

Tipo IIIa: es el grupo de las bacteriolisinas, como la enterolisina A y la zocina A. Son endopeptidasas que escinden las uniones interpeptídicas de la pared de bacterias Gram positivas, causando la lisis de las bacterias sensibles.

Tipo IIIb: estas bacteriocinas matan a las células blanco por medio de métodos no líticos, como la disipación de la fuerza protón motriz, que lleva a la disminución de los niveles de ATP y a la muerte celular.

Clase IV: agrupa a las bacteriocinas cíclicas, las cuales luego de ser sintetizadas ribosomalmente sufren una modificación post-traducciona de manera que el primer y último aminoácido del péptido son unidos covalentemente. Su estructura circular les confiere resistencia a la degradación proteolítica y les brinda mayor resistencia a altas temperaturas y diferentes valores de pH. La enterocina AS-48 fue la primer bacteriocina descrita de este grupo y es la más estudiada.

1.2. *Escherichia coli*: características generales

E. coli es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gram negativo recto y de extremos redondeados que presenta movilidad por flagelos peritricos. Es un microorganismo anaerobio facultativo, oxidasa negativo y capaz de producir ácido y gas a partir de la fermentación de azúcares (Lim y col., 2010).

Forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, incluido el ser humano. La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas y residen en el colon sin causar ningún daño. Sin embargo, algunos serotipos juegan un papel importante tanto en enfermedades intestinales como extraintestinales. La capacidad de estas cepas de causar enfermedades se atribuye a la adquisición de genes de virulencia que pueden estar localizados en islas de patogenicidad, bacteriófagos integrados y/o plásmidos (Fernández y Padola, 2012; Eichhorn y col., 2015; Lim y col., 2010).

1.2.1. *Escherichia coli* productoras de diarreas

Las cepas de *E. coli* aisladas de procesos infecciosos intestinales han sido agrupadas en cinco categorías basadas en evidencia epidemiológica, características fenotípicas, manifestaciones clínicas y factores de virulencia específicos. Estas categorías de *E. coli* productoras de diarreas incluyen a *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEAg) y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) (Gomes y col., 2016). Algunos autores consideran además una sexta categoría de *E. coli* patógenas, llamada *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (Winn y col., 2008; Castro-Rosas y col., 2012). En la figura 2 se muestra la clasificación de las cepas de *E. coli* productoras de diarrea según su mecanismo de acción propuesta por Gomes y col. (2016) y ejemplos de serotipos pertenecientes a cada categoría.

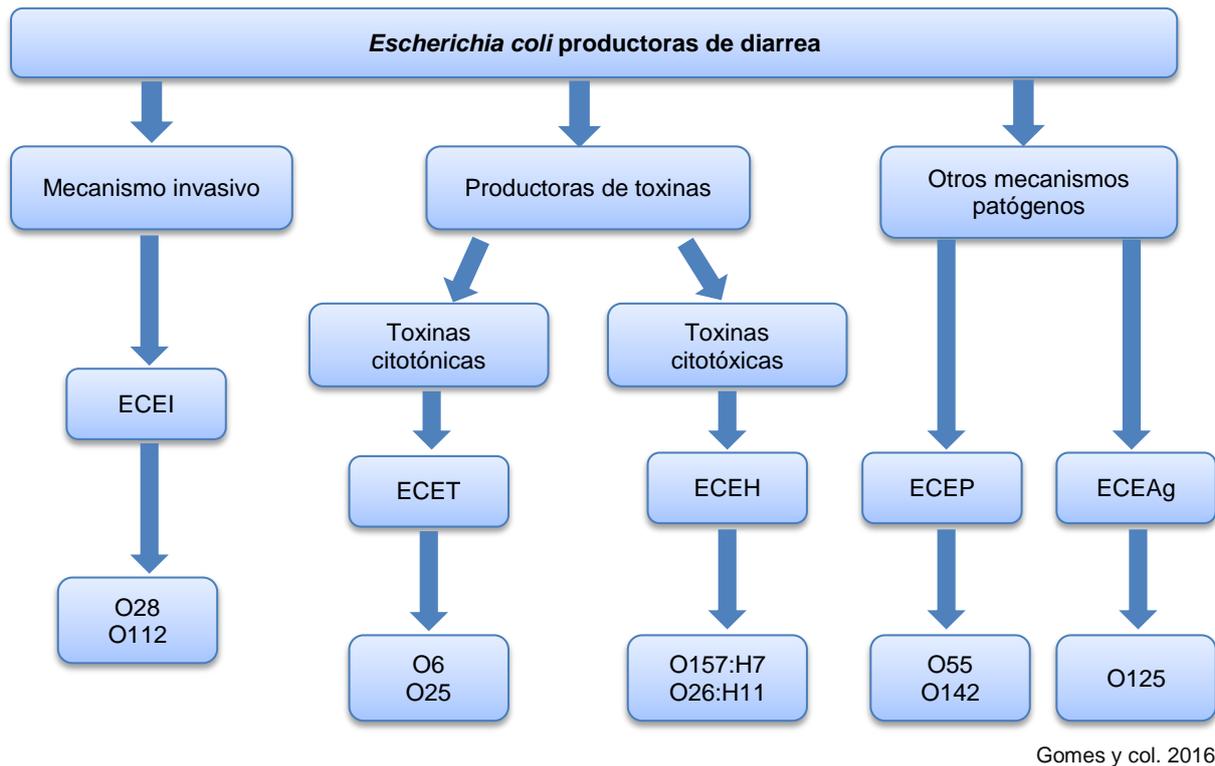


Figura 2: *Escherichia coli* productoras de diarreas

Dentro de estas categorías, las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) componen un subgrupo de bacterias patógenas productoras de toxinas Shiga (Stx) capaces de causar colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos (Lim y col., 2010; Fernández y Padola, 2012).

En animales, el principal reservorio de ECEH está constituido por el ganado bovino. Aproximadamente la mitad de los casos de infección por ECEH están relacionados al consumo de alimentos de origen bovino, a la contaminación de fuentes de agua con las heces de estos animales, o al contacto directo entre humanos y rumiantes. Debido a esto, la carne y sus productos derivados constituyen el principal vehículo de ECEH al ser humano. Particularmente, la carne fresca presenta elevado riesgo de contaminación cuando se efectúan prácticas inadecuadas durante la faena del animal, sumado a una abundante cantidad de agua, nutrientes y un pH favorable para el desarrollo microbiano. Por otra parte, ECEH puede presentarse como contaminante de diferentes tipos de alimentos, siendo aislada también de vegetales, lácteos, agua, entre otros (Fernández y Padola, 2012; Brusa y col., 2012; Rigobelo y col., 2015; Woraprayote y col., 2016).

Si bien el serotipo más estudiado del grupo de ECEH es el O157:H7, otros serotipos son capaces de generar SUH, como los serotipos O130:H11, O178:H19, O145:NM y O104:H4 (Rumi y col., 2012; Fernández y col., 2013; Mele y col., 2014, Miko y col., 2014). En nuestro país, estudios realizados acerca de la presencia de cepas de ECEH serotipos

O157:H7 y no-O157:H7 en muestras de carne vacuna revelaron que en un 25,5% de las muestras de carne había presencia de ECEH O157:H7, mientras que un 52,2% de los casos se observó la presencia de serotipos de ECEH no-O157:H7 (Brusa y col., 2013).

1.2.2. Factores de virulencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica

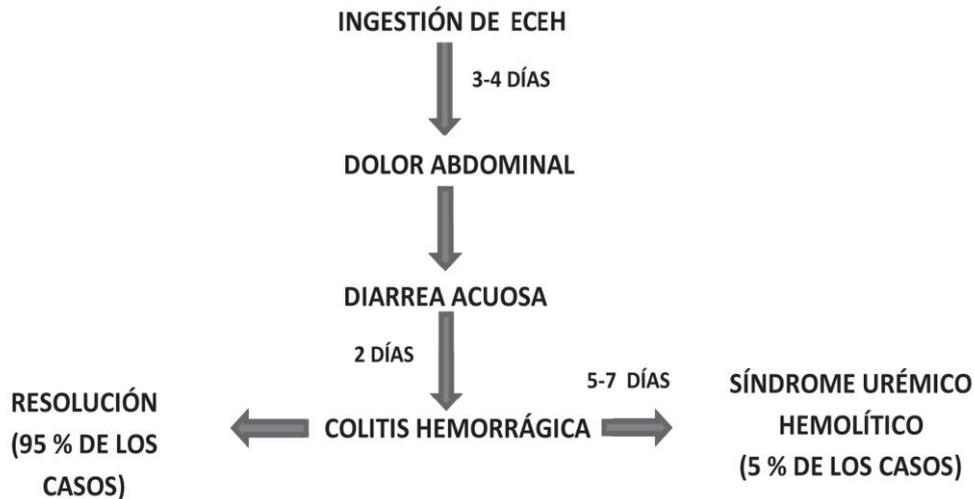
Los principales factores de virulencia de ECEH son sus citotoxinas denominadas verotoxinas o toxinas Shiga, las cuales se encuentran codificadas en el genoma de profagos integrados en el cromosoma bacteriano. Existen dos tipos de Stx: Stx1 y Stx2, estando la segunda asociada a los casos clínicos más severos. Estas toxinas pertenecen al grupo de las toxinas AB. La subunidad B se une a los receptores que se expresan en la superficie de la célula hospedera y la subunidad A presenta acción RNA N-glicosidasa sobre la subunidad ribosomal 28S, lo que causa una inhibición de la síntesis de proteínas. Los receptores son glucoesfingolípidos presentes en las células endoteliales microvasculares de los riñones, intestino y cerebro. Además, posee una resistencia intrínseca a la acidez, lo que le permite sobrevivir al pasaje por el estómago. La resistencia a la acidez está asociada con la disminución de la dosis infectiva de los microorganismos enteropatógenicos, en el caso de ECEH la dosis infectiva es de entre 10 y 100 unidades formadoras de colonias. Su capacidad para adherirse al epitelio está mediada por la expresión de la adhesina "intimina", codificada por el gen cromosomal *eae*, y por un sistema de secreción bacteriano tipo III codificado en una isla de patogenicidad. Estos factores generan lesiones que causan la pérdida de las microvellosidades de los enterocitos y permiten la colonización bacteriana. Otros factores de virulencia observados son una enterohemolisina plasmídica y, en cepas que carecen del gen *eae*, una adhesina autoaglutinante (Saa) que está involucrada en la adhesión de estas cepas (Etcheverría y Padola, 2013; Cordonnier y col., 2016).

1.2.3. Manifestaciones clínicas de las infecciones por *Escherichia coli* enterohemorrágica

En el ser humano, los síntomas clínicos asociados a la infección por ECEH aparecen luego de 3 a 5 días de ingerir la bacteria. El curso de la infección por este microorganismo se muestra en la figura 3.

Las manifestaciones gastrointestinales comienzan con una diarrea acuosa, dolor abdominal y, en ocasiones, náuseas y vómitos. En uno o dos días la diarrea puede progresar a una colitis hemorrágica, caracterizada por dolores abdominales, sangre en materia fecal y, ocasionalmente, fiebre. En la mayoría de los casos, los síntomas

desaparecen luego de una semana sin dejar secuelas evidentes. Sin embargo, pueden ocurrir complicaciones como el síndrome urémico hemolítico, púrpura trombocitopénica en adultos mayores, insuficiencia renal aguda y muerte (Fernández y Padola, 2012, Cordonnier y col., 2016).

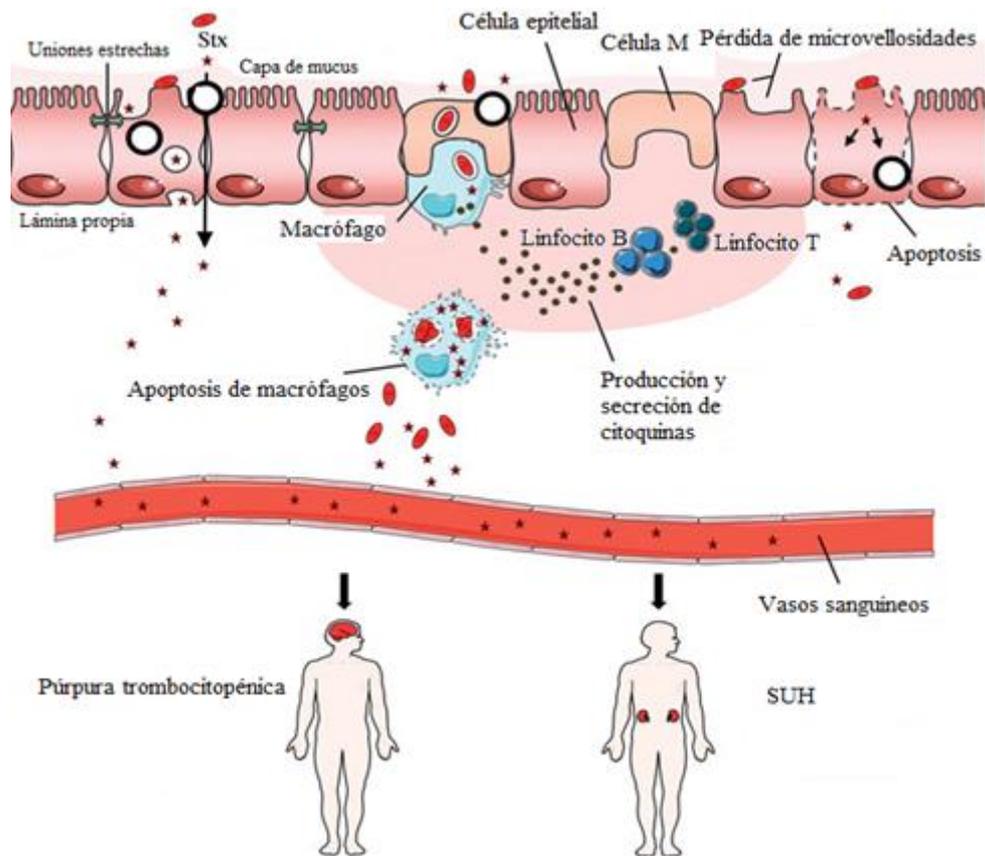


Fernández y Padola, 2012

Figura 3: Desarrollo de la enfermedad causada por *Escherichia coli* enterohemorrágica

1.2.4. Síndrome urémico hemolítico

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es un desorden multisistémico que afecta principalmente a niños de entre 6 meses y 5 años. Está caracterizado por la presentación de una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia, con microangiopatía (daño en endotelio de vasos sanguíneos de pequeño calibre) de localización renal y manifestaciones de lesión isquémica en sistema nervioso central, retina, miocardio, páncreas e intestino (Fernández y Padola, 2012). La acción patogénica de ECEH en el intestino delgado se muestra en la figura 4. La adhesión de ECEH al epitelio de las porciones más distales del intestino delgado provoca la pérdida de las microvellosidades. Una vez establecida la colonización bacteriana, se desencadena una reacción inflamatoria caracterizada por la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimiotácticas. Además, en esta etapa comienza la liberación de la Stx, la cual cruza la barrera epitelial y viaja por vía sanguínea hacia los riñones y el sistema nervioso central (Cordonnier y col., 2016).



Cordonnier y col., 2016

Figura 4: Patogenicidad de *Escherichia coli* enterohemorrágica

Actualmente, no existe tratamiento para las infecciones por ECEH. La terapia antibiótica no es generalmente recomendada debido a que no aporta beneficios o incluso resulta contraproducente, incrementando particularmente el riesgo de SUH en pacientes tratados con antibióticos durante el período inicial de diarrea. Un posible mecanismo por el cual los antibióticos aumentan el riesgo de desarrollo de SUH es el incremento de la producción y/o liberación de Stx. Esto ocurre por medio de la inducción de profagos que contienen genes que codifican para la toxina. Dicha inducción promueve la transcripción, producción de Stx y liberación de la misma mediante lisis bacteriana mediada por fagos. Sin embargo, los efectos de diferentes clases de antibióticos en la producción *in vitro* de Stx difieren y son dependientes de la concentración de antibiótico y la naturaleza de la cepa de ECEH (por ejemplo, del serotipo o el tipo de Stx). En estudios realizados con ECEH O157:H7, fluoroquinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol y ampicilina incrementaron significativamente la producción de Stx2, mientras que macrólidos, carbapenemes, aminoglucósidos, rifampicina, rifaximina y fosfomicina no tuvieron efecto en la producción de

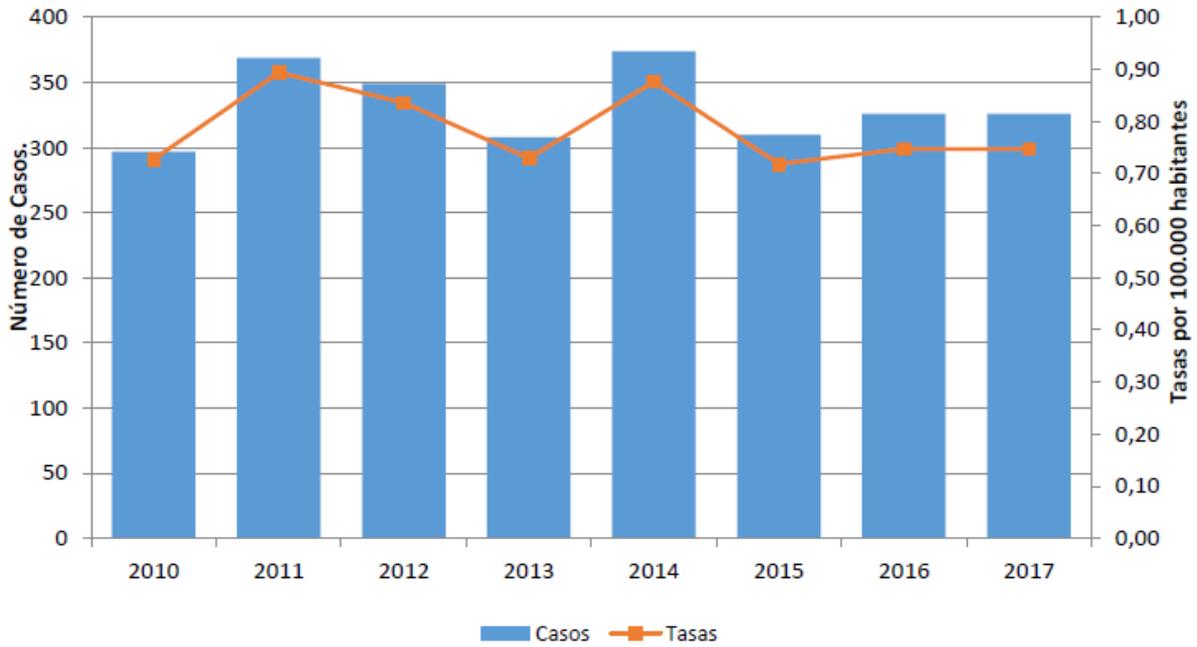
Stx2 o fueron capaces de suprimirla. Estos resultados *in vitro* concuerdan con experimentos realizados en modelos animales (Bielaszewska y col., 2012; Etcheverría y Padola, 2013).

La mayoría de los pacientes afectados por el SUH logran recuperarse con terapia de apoyo, que generalmente incluye control de fluidos y electrolitos, control de la hipertensión, uso de diálisis y transfusiones de sangre. Sin embargo, entre un 2 y 5% de los pacientes mueren y entre un 12 y 30% sufren secuelas graves y, a veces, permanentes, incluyendo insuficiencia renal, hipertensión, o manifestaciones a nivel de sistema nervioso central como hemorragias y convulsiones (Ibarra y col., 2008; Fernandez-Brando y col., 2011; López y col., 2012).

1.2.4.1. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico

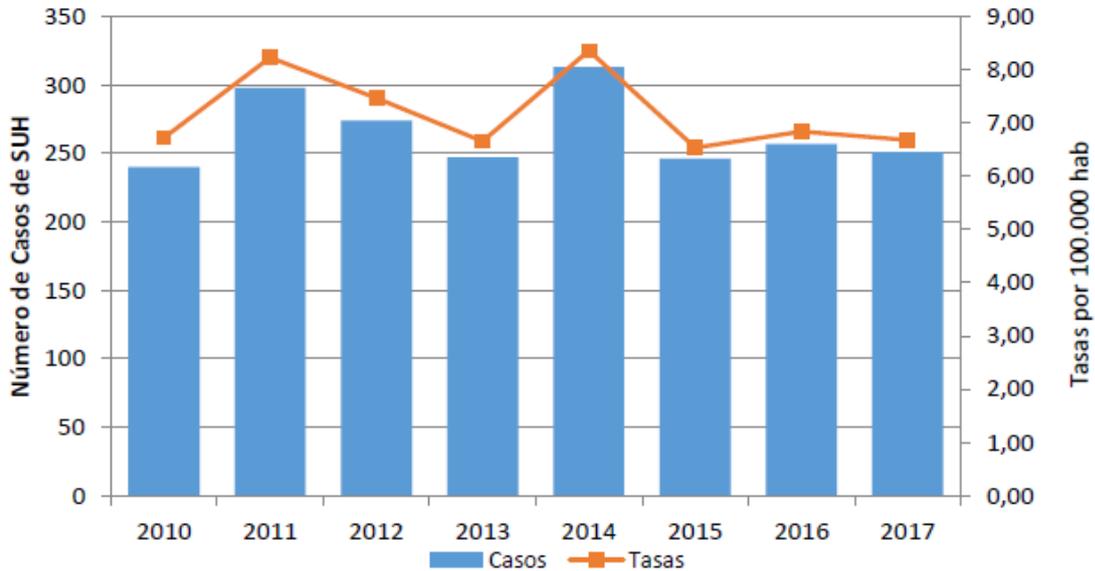
El SUH fue descrito por primera vez en Suiza, en 1955. Posteriormente, se reportaron casos en Europa, Norteamérica, Sudamérica, Sudáfrica, Australia, India y Japón. Gran cantidad de los casos reportados de SUH a nivel mundial provienen de Sudamérica, especialmente de Argentina, donde esta enfermedad es endémica y presenta una incidencia mayor respecto a la incidencia a nivel mundial (Mele y col., 2014).

En nuestro país, según el Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica N° 392 del mes de enero de 2018, a la semana 48 del 2017 se notificaron 326 casos de SUH, con una tasa acumulada de 0,75 casos cada 100.000 habitantes. Con respecto a los menores de 5 años, se notificaron 251 casos, siendo la tasa acumulada de 6,68 casos cada 100.000 menores de 5 años. Respecto del estudio etiológico de los casos, en el 43,3% se identificó a *E. coli* productora de toxina Shiga como agente causal. De éstos, el 51,1% correspondieron al serotipo O157, el 29,1% presentaron serotipo No-O157, y el 19,9% restante presentaron aislamientos negativos. En las figuras 5 y 6 se muestran el número de casos y tasas notificados de SUH cada 100.000 habitantes y cada 100.000 niños menores de 5 años, respectivamente, en nuestro país entre los años 2010 y 2017 (Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica N° 392, enero 2018).



Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica N° 392, enero 2018

Figura 5: Casos y tasas (cada 100.000 habitantes) notificados de SUH en Argentina entre 2010 y 2017



Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica N° 392, enero 2018

Figura 6: Casos y tasas (cada 100.000 niños menores de 5 años) notificados de SUH en Argentina entre 2010 y 2017

La prevalencia de diferentes serotipos de ECEH además del O157:H7 en productos cárnicos, sumada a la gravedad de las patologías que pueden ocasionar y a la ausencia de tratamientos específicos, hacen imprescindible encontrar alternativas naturales para el control de estos microorganismos patógenos. La aplicación de microorganismos como

estrategias de biopreservación, específicamente miembros del género *Lactobacillus*, o de sus metabolitos antimicrobianos, se presenta como una valiosa herramienta para el biocontrol de ECEH en cortes de carne bovina.

1.3. Aplicación de lactobacilos o sus metabolitos como método de biopreservación de alimentos

El uso de métodos tradicionales de conservación de alimentos tales como el congelado, la refrigeración, los procesos térmicos o los conservantes químicos no garantiza la inocuidad de los alimentos. Debido a ello, en los últimos tiempos se incorporó la utilización de agentes antimicrobianos, principalmente químicos, como método de inactivación de microorganismos alteradores y patógenos. Sin embargo, hoy en día los consumidores demandan alimentos mínimamente procesados y sin conservantes químicos. Esto ha llevado a la búsqueda de métodos naturales para la conservación de los alimentos (Woraprayote y col., 2016).

La biopreservación surgió como una estrategia para reducir el uso de conservantes y la intensidad de los tratamientos térmicos. Se entiende por biopreservación a la extensión de la vida útil de los productos alimenticios usando microorganismos o compuestos antimicrobianos naturales (Singh, 2018). La aplicación de bacteriocinas o de microorganismos productores de bacteriocinas, tales como los lactobacilos, como método de biopreservación de alimentos constituye entonces una alternativa valiosa para este fin. Muchos de estos microorganismos producen bacteriocinas capaces de tolerar procesos térmicos, mantener actividad a diferentes rangos de pH y actuar en bajas concentraciones sin alterar las características organolépticas del alimento (Favaro y Todorov, 2017).

Actualmente, la nisina es la única bacteriocina aprobada internacionalmente para la biopreservación de alimentos. Ésta es normalmente aplicada sola o en combinación con otros compuestos tales como nitritos, especialmente en productos cárnicos. Sin embargo, la nisina tiene un espectro de acción que abarca sólo a bacterias Gram positivas y es activa solamente a valores de pH ácidos, lo que reduce la gama de alimentos en los cuales se puede aplicar (Pattanayaiying y col., 2014; Rai y col., 2016). Por lo cual la búsqueda de nuevas bacteriocinas para el control de microorganismos patógenos presentes en alimentos resulta relevante en la industria alimentaria.

Es de destacar que uno de los requerimientos más importantes para evaluar la capacidad antagónica de una sustancia antimicrobiana es ser efectiva a bajas concentraciones. Por ello, la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de

una bacteriocina sobre un microorganismo de interés permite cuantificar su actividad biológica.

En la actualidad, existe un gran interés en la aplicación de combinaciones de bacteriocinas que actúen de forma sinérgica sobre bacterias patógenas en los alimentos a fin de obtener un mayor efecto inhibitorio aplicando dosis inferiores de cada bacteriocina.

2. HIPÓTESIS

- Las sustancias tipo bacteriocinas producidas por lactobacilos presentan actividad inhibitoria y bactericida a diferentes concentraciones sobre *Escherichia coli* O157:H7 y no O157:H7.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Investigar la mínima concentración de las sustancias tipo bacteriocinas de lactobacilos necesaria para inhibir y eliminar a *E. coli* O157:H7 y no O157:H7.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar la mínima concentración de las sustancias tipo bacteriocinas producidas por cada lactobacilo que produzca inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7 y no O157:H7.
- Estudiar la concentración bactericida mínima de cada sustancia tipo bacteriocinas sobre las cepas de *E. coli* patógenas.
- Valorar las interacciones entre bacteriocinas producidas por distintas especies de lactobacilos
- Calcular las concentraciones inhibitorias fraccionarias (CIF) de las bacteriocinas sobre *E. coli* patógenas.
- Evaluar y analizar los resultados estadísticamente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas de lactobacilos utilizadas: *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60

Se trabajó con dos cepas de lactobacilos aislados e identificados previamente por el grupo de investigación del área de Bacteriología de la Universidad Nacional de Río Cuarto (Pascual y col., 2008,a,b). Ambas cepas fueron identificadas como *Lactobacillus fermentum* y *L. rhamnosus* mediante las pruebas bioquímicas sugeridas por el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Vos y col., 2009), el sistema API 50 CHL (BioMèrieux, Inc, Francia) y análisis de ADNr 16S (Pascual y col., 2008b; Pascual y col., 2010). Las secuencias de ADNr de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 fueron depositadas en la base Gen Bank de secuencias génicas, bajo los números GQ 455406 y EF 495247, respectivamente. Ambos lactobacilos son productores de ácidos orgánicos y bacteriocinas, siendo *L. rhamnosus* L60 también productor de peróxido de hidrógeno. Estas cepas de lactobacilos han sido extensivamente estudiadas en sus características probióticas y bacteriocinogénicas. La producción de bacteriocinas por estos microorganismos les permite inhibir el crecimiento de gran variedad de géneros bacterianos como *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Neisseria*, *Listeria*, entre otros (Pascual y col. 2006; Pascual y col., 2008 a,b; Ruiz y col., 2012; Ruiz y col., 2015; García y col.; 2015).

Las cepas de lactobacilos fueron sembradas en caldo y agar Man Rogosa Sharpe (MRS) e incubadas a 37°C durante 18 - 24 h en microaerofilia con un 5% de CO₂. Para comprobar la identidad de estas cepas se realizó tinción de Gram y las pruebas bioquímicas de género sugeridas por el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (Vos y col., 2009), que se detallan a continuación:

- Prueba de la catalasa: Se colocó una ansada del microorganismo a ensayar sobre una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos. La reacción positiva es evidenciada por el desprendimiento de burbujas debido a la liberación de oxígeno por acción de la enzima catalasa.
- Prueba de la enzima gelatinasa: Se inoculó el microorganismo en estudio en un caldo MRS con gelatina al 15% previamente disuelto en baño María. Se incubó a 37°C durante 24 h. Posteriormente se refrigeró durante 2 h. El resultado positivo se evidencia por la licuación de la gelatina por acción de la enzima gelatinasa.
- Producción de SH₂: El microorganismo en estudio fue sembrado en un tubo con medio semisólido SIM (Britania), luego se incubó a 37°C por 24 h. La producción de SH₂ se evidencia por la formación de un precipitado negro (sulfuro de hierro).

- Producción de indol: Se inoculó el microorganismo en estudio en un tubo con medio semisólido SIM, luego se incubó a 37°C por 24 h. Posteriormente, se agregaron 2 gotas del reactivo de Kovacs, la producción de un halo rosa en la parte superior del medio es indicativo de una reacción positiva.
- Movilidad: Se sembró por punción con ansa en punta el microorganismo en estudio en un tubo con medio semisólido SIM, luego se incubó a 37°C por 24 h. Una reacción positiva se evidencia por una turbidez general de todo el medio, mientras que una reacción negativa se caracteriza por el crecimiento en la línea de punción.
- Reducción de NO₃: Se inoculó el microorganismo en un tubo con caldo nitrato y se incubó a 37°C por 24 h. Posteriormente, se agregó el reactivo revelador compuesto por α -naftilamina al 1%, ácido sulfanílico al 10% y ácido tartárico al 89%. La reacción positiva se evidencia por la aparición de un color rojo luego de 1 a 2 minutos.
- Citocromo oxidasa: Se preparó una suspensión densa del microorganismo en estudio en 0,2 ml de agua destilada y se colocó un disco comercial del reactivo N-N-tetrametil p-fenilendiamina. La producción rápida de un color rosado evidencia un resultado positivo debido a la oxidación del reactivo por la enzima citocromo C oxidasa.

4.2. Cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas

Se trabajó con 10 cepas de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), de las cuales seis presentaron el serotipo O157:H7 y las cuatro restantes fueron ECEH no O157:H7 (Tabla 1). Estas cepas pertenecen al cepario del área de Bacteriología de la Universidad Nacional de Río Cuarto, habiendo sido aisladas de procesos infecciosos humanos y animales, y a partir de alimentos. Las mismas fueron previamente identificadas y caracterizadas serológicamente. Para este trabajo, las cepas de ECEH fueron sembradas en caldo Tripticasa-Soya (CTS) y luego de 18 h de incubación a 37°C se aislaron en agar Tripticasa-Soya (ATS) utilizando las mismas condiciones de incubación.

Tabla 1: Cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica utilizadas

Cepa de ECEH	Serotipo	Toxina Shiga producida
LAMA 627	O157:H7	Stx2
LAMA 649	O157:H7	Stx2
LAMA 682	O157:H7	Stx2
LAMA 684	O157:H7	Stx2
LAMA 686	O157:H7	Stx2
LAMA 798	O157:H7	Stx2
LAMA 637	O174:H8	Stx1
LAMA 641	O174:H21	Stx1/Stx2
LAMA 651	O8/O60:H19	Stx1/Stx2
LAMA 772	O178:H19	Stx2

Se confirmó la identificación de las cepas de ECEH mediante las pruebas bioquímicas que se detallan a continuación:

- Prueba de la catalasa: Se realizó mediante la metodología detallada en el punto 4.1.
- Reacción de rojo de metilo: Se inoculó una colonia aislada del microorganismo a ensayar en el medio de Clark y Lubs y se incubó durante 24 h a 37°C. Luego se agregaron unas gotas de rojo de metilo. La reacción positiva causa viraje del medio al color rojo debido a la disminución del pH producida por bacterias que realizan fermentación ácido-mixta.
- Reacción de Voges-Proskauer: Se inoculó una colonia aislada del microorganismo a ensayar en 2 ml del medio de Clark y Lubs y se incubó a 37°C por 24 h. Se agregaron 2 gotas de α -naftol y 2 gotas de hidróxido de potasio, luego se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción positiva se evidencia por el cambio de color del medio a rosado por bacterias que realizan fermentación butilenglicólica.
- Reducción de nitratos: Se realizó mediante la metodología detallada en el punto 4.1.
- Prueba de TSI: el microorganismo a ensayar se sembró por punción y en superficie en agar TSI, luego se incubó a 37°C por 18 h. El viraje del color del medio a amarillo señala su acidificación por la fermentación de azúcares, mientras que un color rojo indica alcalinización por utilización de peptonas. La presencia de burbujas o

desplazamiento del agar indica producción de gas H₂, mientras que la presencia de un precipitado negro indica la producción de ácido sulfhídrico.

- Producción de indol: Se realizó por la metodología detallada en el punto 4.1.
- Movilidad: Se llevó a cabo mediante la metodología detallada en el punto 4.1.
- Prueba de oxidasa: Se realizó por la metodología detallada en el punto 4.1.
- Utilización de citrato: Se sembró el microorganismo a ensayar en superficie en un tubo inclinado con agar Citrato de Simmons, incubándolo a 37°C por 24 h. La reacción positiva se evidencia por un cambio de color del medio de verde a azul. Las bacterias capaces de utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono y fosfato monoamónico como única fuente de nitrógeno producen una alcalinización del medio, lo que causa el viraje del indicador de pH.
- Prueba de ureasa: Para detectar la presencia de esta enzima, se sembró el microorganismo a ensayar en el medio BAM (Britania) y se incubó a 37°C por 24 h. La reacción positiva se evidencia por un viraje del color del medio de verde a azul.
- Fermentación de hidratos de carbono: A partir de un cultivo de 24 h de incubación se inoculó el microorganismo a estudiar en tubos conteniendo 2 ml de medio base OF con el agregado de cada hidrato de carbono ensayado a una concentración final del 1%. Los hidratos de carbono a ensayar fueron: lactosa, sacarosa, manitol, dulcitol, salicina, adonitol, inositol, sorbitol, arabinosa, xilosa, rafinosa y ramnosa. El tubo se selló con vaselina estéril y se incubó a 37°C por 24 – 48 h. El ácido resultante del proceso de fermentación produce una disminución del pH del medio, que se traduce en un cambio de color del mismo de verde a amarillo por el viraje del indicador.

4.3. Conservación de los microorganismos utilizados

La conservación de las cepas de lactobacilos se llevó a cabo mediante un cultivo de cada una en caldo MRS (18 h a 37°C con un 5% de CO₂). A dichos cultivos se les adicionó 30% de glicerol estéril como crioprotector y se conservaron a -20°C.

En el caso de las cepas de ECEH, se sembraron en caldo CTS y se incubaron a 37°C durante 24 h en aerobiosis. Posteriormente, se agregó a cada cultivo un 30% de glicerol estéril y se conservó a -20°C.

4.4. Estudio de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las cepas de lactobacilos sobre cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas

4.4.1. Estudio de la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células y sobrenadante libre de células neutralizado de *Lactobacillus fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 mediante la técnica de difusión en pozos

La determinación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células (SLC) y los sobrenadantes libres de células neutralizados (SLCN) de ambos lactobacilos sobre cepas de ECEH se realizó mediante una adaptación de la técnica de difusión en pozos descrita por García y col. (2015).

A partir de cultivos de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 en caldo MRS de 18 – 24 h de incubación a 37°C en microaerofilia, se inocularon 2 ml en tubos con 8 ml de caldo MRS y se incubó durante 18 h en las mismas condiciones. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 7500 rpm durante 25 min a 4°C. Los SLC fueron recolectados en placas estériles y expuestos a vapores de cloroformo durante 20 min. Luego, los SLC fueron trasvasados a viales estériles y neutralizados utilizando una solución de hidróxido de sodio 1N. De esta manera se eliminó la actividad antimicrobiana debida a los ácidos orgánicos presentes y se obtuvieron los SLCN que contienen las bacteriocinas L23 y L60 en cada caso.

Posteriormente, a partir de una suspensión de cada cepa de *E. coli* realizada en CTS con una densidad óptica equivalente al tubo 0,5 en la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), se hisopó en varias direcciones una placa de ATS con una concentración de agar del 1,2%. Luego, se realizaron pozos en el agar y se inoculó cada uno con 100 µl del SLC o del SLCN de los diferentes lactobacilos. Las placas fueron incubadas durante 18 h a 37°C. Se observó la presencia de halos de inhibición del crecimiento de ECEH alrededor de cada pozo y se midieron en milímetros.

4.4.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre cepas de *E. coli* O157:H7 y no O157:H7 mediante la técnica de difusión en pozos

Para realizar la cuantificación de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas L23 y L60 contenidas en los SLC y SLCN de ambos lactobacilos sobre cepas de *E. coli* patógenas se realizó una adaptación de la técnica de difusión en pozos descrita por García y col. (2015).

Estudios previos demostraron que los SLC y SLCN de ambas cepas de lactobacilos sin diluir presentan una concentración de bacteriocina de 640 UA ml^{-1} (Pascual y col., 2008a,b). Los SLCN de ambos lactobacilos fueron obtenidos utilizando la metodología descrita previamente. Los mismos fueron diluidos al medio de forma seriada en caldo MRS estéril para obtener las distintas concentraciones de bacteriocina ($1/2$: 320 UA ml^{-1} ; $1/4$: 160 UA ml^{-1} ; $1/8$: 80 UA ml^{-1} ; $1/16$: 40 UA ml^{-1} , $1/32$: 20 UA ml^{-1}). Posteriormente, a partir de una suspensión de cada una de las 10 cepas de *E. coli* con una densidad óptica equivalente al tubo 0,5 en la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$), se hisopó una placa de ATS con una concentración de agar del 1,2%. Luego, se realizaron pozos en el agar y en ellos se depositaron 100 μl de cada dilución de SLCN. En cada ensayo se incluyeron controles de actividad antimicrobiana de los SLC y SLCN sin diluir (fig. 7). Las placas fueron incubadas durante 18 h a 37°C y luego se observó la presencia de halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* alrededor de los pozos. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de ambas bacteriocinas fue definida como la inversa de la máxima dilución que mostró inhibición del crecimiento del microorganismo patógeno y fue expresada en unidades de actividad por mililitro (UA ml^{-1}).



Figura 7: Esquema de la determinación de la concentración inhibitoria mínima de los sobrenadantes neutralizados conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 por la técnica de difusión en pozos

Referencias: 1: SLC (Control); 2: 640 UA ml^{-1} (SLCN); 3: 320 UA ml^{-1} ; 4: 160 UA ml^{-1} ; 5: 80 UA ml^{-1} ; 6: 40 UA ml^{-1} ; 7: 20 UA ml^{-1} .

4.4.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica mediante la técnica de microdilución en caldo

Los SLCN conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 fueron obtenidos mediante la metodología anteriormente descrita y diluidos al medio de forma seriada en caldo MRS. En una microplaca de 96 pocillos estéril se colocaron alícuotas de 100 μ l de cada dilución de SLCN como se muestra en la figura 8. Luego, se sembraron 75 μ l de una suspensión de *E. coli* con una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland. Se realizaron controles positivos por duplicado adicionando 100 μ l de caldo MRS estéril y 75 μ l de la suspensión del microorganismo patógeno. De forma similar, como control negativo, se inocularon dos pocillos con 175 μ l de SLCN sin diluir. Posteriormente, se incubó la microplaca a 37°C durante 3,5 h. Luego del período de incubación se adicionaron 10 μ l de una solución de resazurina al 1% (p/v) en todos los pocillos y se incubó durante 1 h a 37°C en oscuridad, controlando el viraje del indicador cada 15 minutos. La CIM fue determinada como la máxima dilución de cada SLCN en donde no se observó cambio de color del indicador de azul a rosa y se expresó en UA ml⁻¹. La resazurina es un indicador de óxido-reducción utilizado para la evaluación del crecimiento celular, que vira desde un color azul en su forma oxidada a rosa cuando es reducida a resorufina por las oxidorreductasas de células viables (Sarker y col., 2007).

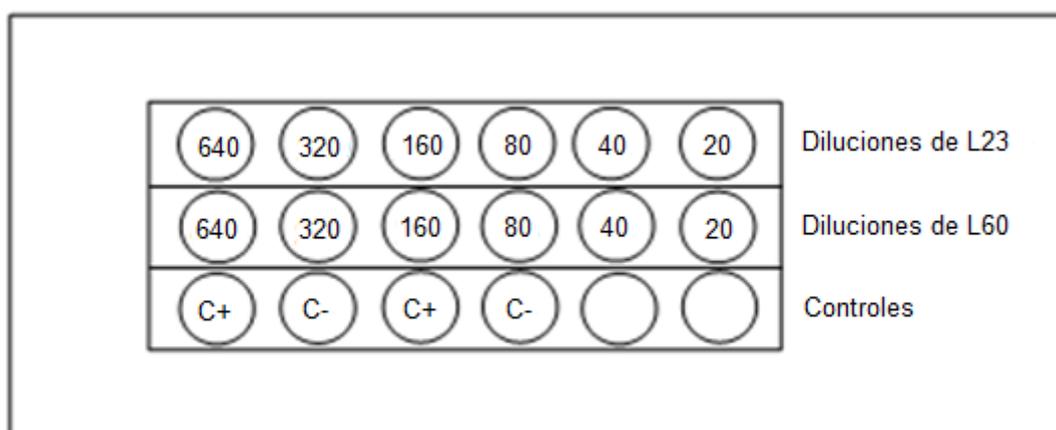


Figura 8: Esquema de la determinación de la concentración inhibitoria mínima de los sobrenadantes neutralizados conteniendo las bacteriocinas L23 y L60

Referencias: los valores representados en cada pocillo corresponden a las diluciones de cada bacteriocina expresados en UA ml⁻¹. C+: control positivo; C-: control negativo

A continuación, se determinó la concentración bactericida mínima (CBM) de las bacteriocinas L23 y L60. Para ello, a partir de los pocillos que permanecieron azules, se extrajo una alícuota de 20 μ l y se sembró en placas de ATS. Las placas se incubaron

durante 18 h a 37°C. La CBM fue definida como la mínima concentración de bacteriocina capaz de matar el 99,9% de un inóculo preestablecido de bacterias en un lapso de tiempo determinado.

4.4.4 Evaluación de la interacción entre las bacteriocinas L23 y L60 por la técnica de checkerboard

Con el objetivo de evaluar las interacciones entre las sustancias antimicrobianas producidas por ambas cepas de lactobacilos sobre una cepa de *E. coli* enterohemorrágica se realizó la técnica de checkerboard o de tablero de ajedrez (Ruiz y col. 2012).

La técnica de checkerboard o tablero de ajedrez se realizó en una microplaca estéril de 96 pocillos. Para ello, se utilizaron concentraciones de cada bacteriocina de al menos el doble del valor de la CIM obtenido mediante la técnica de microdilución en caldo. La obtención de los SLCN conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 se realizó mediante la metodología ya descrita anteriormente. Se inocularon 75 µl de las diferentes diluciones de los SLCN de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 a lo largo del eje de abscisas y ordenadas respectivamente, como se esquematiza en la figura 9. De esta forma se obtuvieron diferentes combinaciones de las concentraciones de bacteriocinas L23 y L60. Luego, se sembraron 25 µl de una suspensión de *E. coli* en caldo CTS con una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland. Se realizaron controles positivos y negativos por duplicado. Los controles positivos se realizaron inoculando dos pocillos con 150 µl de caldo MRS estéril y 25 µl del microorganismo patógeno. En el caso de los controles negativos, los pocillos se inocularon con 175 µl de SLCN sin diluir. La microplaca fue incubada a 37°C durante 3,5 h. A continuación, se adicionaron 10 µl de resazurina al 1% (p/v) en cada pocillo y se continuó la incubación a 37°C en oscuridad durante 18 h.

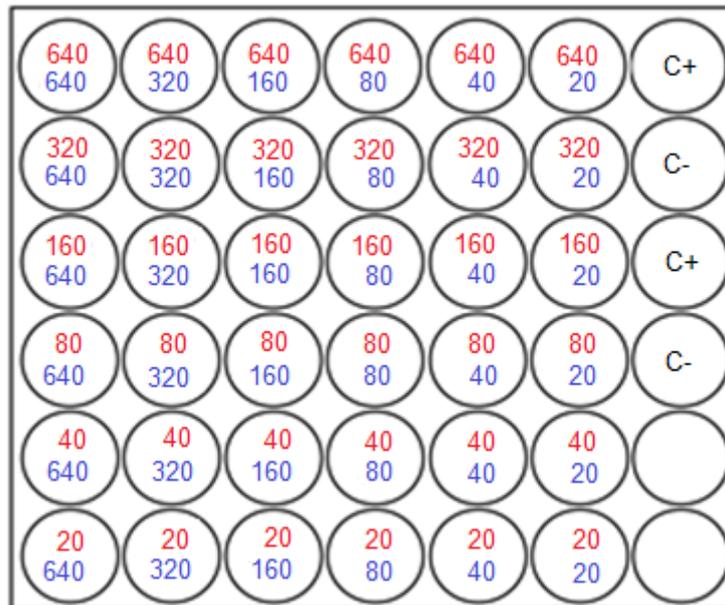


Figura 9: Esquema de las diferentes combinaciones de diluciones del sobrenadante neutralizado conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 utilizadas para la determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria mediante la técnica de checkerboard

Referencias: los valores representados en cada pocillo corresponden a las concentraciones de las bacteriocinas L23 (rojo) y L60 (azul) expresados en UA ml⁻¹. C+: control positivo; C-: control negativo.

Posteriormente, se analizaron las interacciones de las combinaciones de ambas bacteriocinas y se calculó la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF), obteniéndose de esta forma un índice de CIF. Dicho índice se calculó realizando el cociente entre la CIM de la sustancia antimicrobiana en la combinación y la CIM de esa sustancia sola, frente al microorganismo ensayado, de la siguiente manera:

$$\text{CIF} = \frac{\text{CIM A en AB} + \text{CIM B en AB}}{\text{CIM A} \quad \text{CIM B}}$$

Donde A y B representan, en este caso, a las dos bacteriocinas L23 y L60 a evaluar y AB se refiere a la combinación de ambas. Para evaluar las interacciones de las sustancias con actividad antimicrobiana se adoptaron los siguientes criterios:

- Sinergismo, cuando el índice CIF resultó menor a 1 (CIF<1)
- Adición, cuando el valor de CIF es igual a 1 (CIF=1)

- Indiferencia, cuando CIF se presentó con valores mayores a 1 y menores a 2 ($1 < \text{CIF} < 2$)
- Antagonismo, cuando el índice CIF resultó mayor o igual a 2 ($\text{CIF} \geq 2$)

4.5. Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) usando el programa InfoStat, versión 2017, (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina). Cuando éste resultó estadísticamente significativo, se usó el test múltiple de comparación de LSD de la mínima diferencia (LSD) de Fisher (Quinn y Keough, 2002).

4.6. Medios de cultivo utilizados

Medios para el aislamiento de *Escherichia coli*.

Caldo Trypticasa Soya (Britania)	
Tripteína	17,00 g
Peptona de soya	3,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Fosfato dipotásico	2,50 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,3 ± 0,2	

Agar Trypticasa Soya (Britania)	
Tripteína	15,00 g
Peptona de soya	5,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Agar	12,00 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,3 ± 0,2	

Medios para el crecimiento de *Lactobacillus spp.*

Caldo Man Rogosa Sharpe (Britania)	
Proteosa peptona N° 3	10,00 g
Extracto de carne	8,00 g
Extracto de levadura	4,00 g
Glucosa	20,00 g
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2,00 g
Acetato de sodio	5,00 g
Citrato de amonio	2,00 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,4 ± 0,2	

Agar Man Rogosa Sharpe (Britania)	
Proteosa peptona N° 3	10,00 g
Extracto de carne	8,00 g
Extracto de levadura	4,00 g
Glucosa	20,00 g
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2,00 g
Acetato de sodio	5,00 g
Citrato de amonio	2,00 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Agar	13,00 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,4 ± 0,2	

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento e identificación de cepas de *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus rhamnosus*

Las colonias de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* se observaron pequeñas, circulares, convexas, claras y con bordes definidos en agar MRS. La tinción de Gram reveló la presencia de bacilos Gram positivos de longitud variable (fig. 10). Se confirmó la identidad de ambas cepas mediante las pruebas bioquímicas que se muestran en la tabla 2.

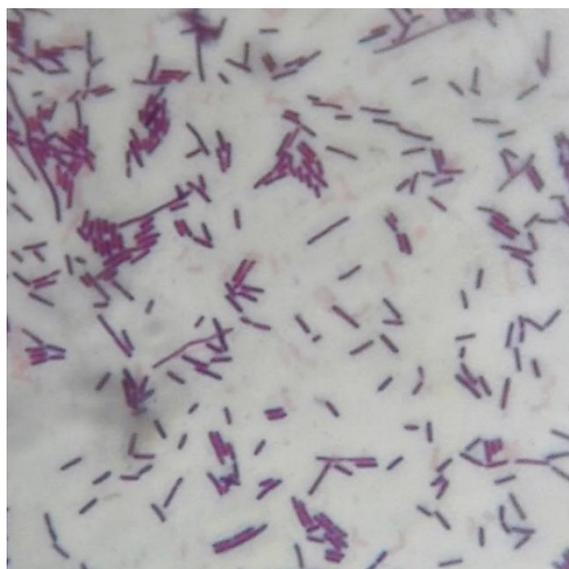


Figura 10: Morfología de una cepa de *Lactobacillus* (1000x)

Tabla 2: Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación del género *Lactobacillus*

Prueba bioquímica	Resultado
Catalasa	Negativo
Gelatinasa	Negativo
Producción de SH ₂	Negativo
Producción de indol	Negativo
Movilidad	Negativo
Reducción de NO ₃	Negativo
Citocromo	Negativo

5.2. Aislamiento e identificación de las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas

La tinción de Gram reveló la presencia de bacilos Gram negativos cortos (fig. 11). Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas permitieron confirmar la identidad de estas cepas bacterianas como *E. coli* (fig. 12 y tabla 3).

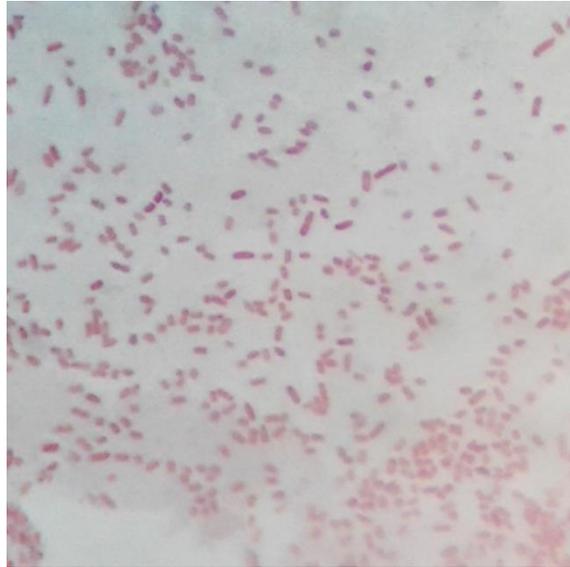


Figura 11: Observación microscópica de una cepa de *Escherichia coli* (1000x)

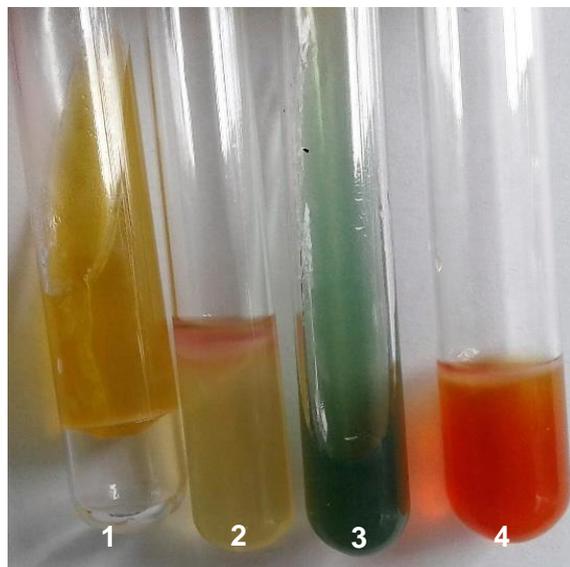


Figura 12: Fotografía de algunas pruebas bioquímicas para *Escherichia coli*

Referencias: 1: TSI; 2: Indol-movilidad; 3: Citrato, 4: Ureasa

Tabla 3: Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli*

Pruebas bioquímicas	Resultados
Catalasa	(+)
Rojo de metilo	(+)
Voges-Proskauer	(-)
Reducción de nitratos	(+)
Producción de SH ₂	(-)
Producción de gas	(+)
Oxidasa	(-)
Indol	(+)
Movilidad	(+)
Citrato	(-)
Ureasa	(-)
<u>Fermentación de:</u>	
Lactosa	(+)
Sacarosa	(+/-)
Manitol	(+)
Dulcitol	(+)
Salicina	(+)
Adonitol	(-)
Inositol	(-)
Sorbitol	(+/-)
Arabinosa	(+)
Xilosa	(+)
Rafinosa	(+)
Ramnosa	(+)

5.3. Estudio de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las cepas de lactobacilos sobre cepas de *Escherichia coli* patógenas

5.3.1. Estudio de la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células y el sobrenadante libre de células neutralizado de *Lactobacillus fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 mediante la técnica de difusión en pozos

La determinación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células (SLC) y los sobrenadantes libres de células neutralizados (SLCN) de ambos lactobacilos fue llevada a cabo sobre 10 cepas de *E. coli* enterohemorrágica mediante la técnica de difusión en pozos. Los halos de inhibición del crecimiento de ECEH se muestran en la tabla 4.

Los resultados mostraron que tanto los SLC como los SLCN de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 produjeron inhibición del crecimiento de todas las cepas de *E. coli* ensayadas. Los halos de inhibición producidos por el SLC de la cepa L23 estuvieron comprendidos en un rango entre 19,50 mm y 32,00 mm, con un valor promedio de $24,20 \pm 1,20$ mm. Cuando se eliminó la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos en el SLCN la actividad biológica disminuyó levemente. El SLCN de L23 produjo halos de inhibición del crecimiento comprendidos entre 14,50 mm y 24,00 mm, con un diámetro promedio de $19,05 \pm 0,56$.

Los valores obtenidos por el SLC de la cepa L60 variaron entre 18,00 mm y 34,00 mm, con un promedio de $25,80 \pm 1,13$ mm. Mientras que el SLCN produjo halos con un diámetro de entre 14,00 mm y 22,50 mm, observándose un promedio de $18,25 \pm 0,71$ mm.

Los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* producidos por el SLCN de ambas cepas de lactobacilos se debe a la presencia de otros metabolitos antimicrobianos diferentes a los ácidos orgánicos. En estudios previos del grupo de investigación (Pascual y col. 2008a,b), se informó que los metabolitos presentes en el SLCN de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* son las bacteriocinas L23 y L60, respectivamente. Aunque la cepa L60 también produce peróxido de hidrógeno, la acción antimicrobiana producida por este metabolito es muy escasa (Pascual y col., 2008b). Por ello, la actividad inhibitoria del SLCN de L60 sobre ECEH se atribuyó principalmente a la bacteriocina L60.

Tabla 4: Halos promedio de inhibición de crecimiento de cepas de *Escherichia coli* producidos por los sobrenadantes libres de células y los sobrenadantes neutralizados de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60

Halos promedio de inhibición del crecimiento (mm ± SD)					
<i>Escherichia coli</i>		<i>Lactobacillus fermentum</i> L23		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> L60	
		SLC	SLCN	SLC	SLCN
Cepa	Serotipo				
LAMA 627	O157:H7	32,00 ± 0,71	24,00 ± 0,00	34,00 ± 0,00	21,00 ± 0,71
LAMA 649	O157:H7	20,50 ± 0,71	14,50 ± 0,71	26,50 ± 0,71	18,50 ± 0,71
LAMA 682	O157:H7	19,50 ± 2,12	15,50 ± 0,71	25,50 ± 0,71	20,00 ± 0,00
LAMA 684	O157:H7	26,00 ± 2,83	20,00 ± 0,00	25,50 ± 3,53	22,50 ± 0,71
LAMA 686	O157:H7	25,00 ± 1,41	20,00 ± 0,71	22,50 ± 0,71	17,00 ± 0,00
LAMA 798	O157:H7	30,00 ± 1,41	22,00 ± 0,71	31,00 ± 0,00	16,00 ± 0,71
LAMA 637	O174:H8	24,50 ± 0,71	23,50 ± 0,71	25,50 ± 2,12	21,00 ± 1,41
LAMA 641	O174:H21	21,00 ± 0,00	19,50 ± 0,71	23,50 ± 2,12	18,00 ± 1,41
LAMA 651	O8/O60:H19	22,50 ± 0,71	16,50 ± 0,71	18,00 ± 1,41	14,50 ± 0,71
LAMA 772	O178:H19	21,00 ± 1,41	15,00 ± 0,00	26,00 ± 0,00	14,00 ± 0,71
Promedio		24,20 ± 1,20	19,05 ± 0,56	25,80 ± 1,13	18,25 ± 0,71

Referencias: SLC: sobrenadante libre de células; SLCN: sobrenadante libre de células neutralizado.

Cuando se compararon los halos de inhibición promedio producidos por los SLC de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los diámetros de los halos producidos por los sobrenadantes de cada cepa. En el caso de los halos promedio producidos por los sobrenadantes conteniendo solamente las bacteriocinas L23 y L60, tampoco se halló diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre los diámetros de los halos obtenidos con cada sobrenadante.

Es importante destacar que los halos de inhibición obtenidos en este trabajo fueron muy superiores a los reportados en investigaciones realizadas por otros autores. Campana y col. (2017), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana del SLCN de cinco cepas de lactobacilos, observaron que solamente dos de dichas cepas inhibieron el crecimiento de *E. coli* O157:H7 con halos comprendidos entre 10 y 11 mm de diámetro, los cuales son muy inferiores a los obtenidos en este estudio.

En la figura 13 se muestran los halos de inhibición del crecimiento de una cepa de *Escherichia coli* producidos por los SLC y SLCN de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60.

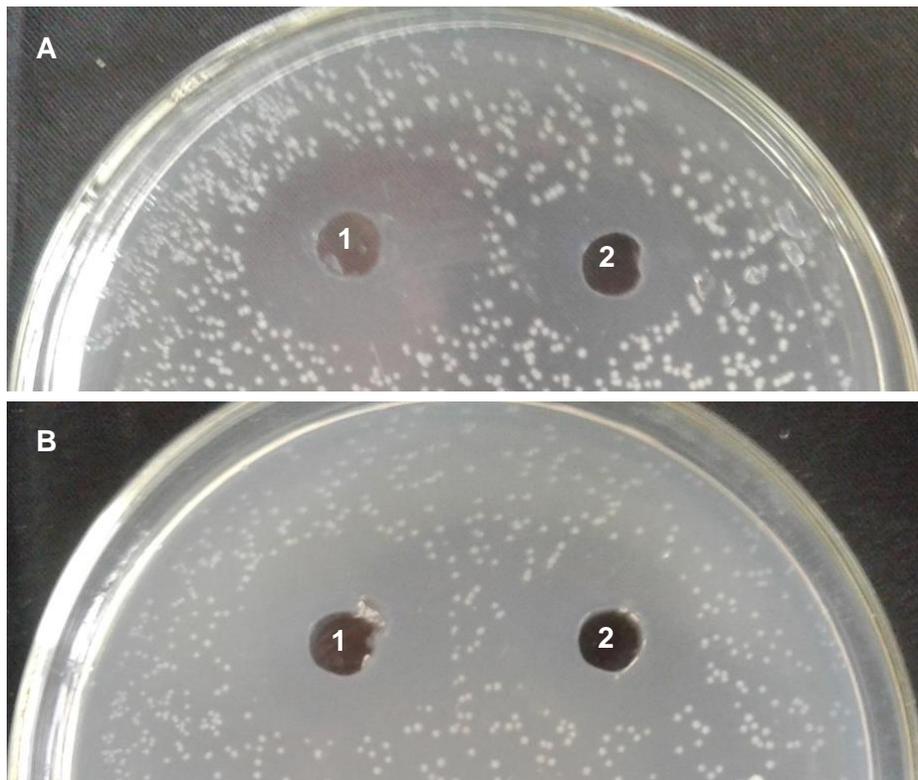


Figura 13: Halos de inhibición del crecimiento microbiano de una cepa de *Escherichia coli* producidos por los sobrenadantes libres de células sin neutralizar y neutralizados de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60

Referencias: A: *Lactobacillus fermentum* L23; B: *Lactobacillus rhamnosus* L60; 1: sobrenadante libre de células sin neutralizar; 2: sobrenadante libre de células neutralizado

Los resultados de este trabajo son muy importantes ya que en la bibliografía consultada son muy pocas las bacteriocinas descritas con actividad biológica sobre ECEH. Sólo en la investigación realizada por Rumjuankiat y col. (2015) se describieron dos bacteriocinas con actividad antimicrobiana sobre *E. coli* O157:H7. Mientras que en el presente trabajo la actividad de las bacteriocinas L23 y L60 fue ensayada sobre 10 cepas de ECEH, demostrando una inhibición del crecimiento del 100%. A diferencia de este trabajo, los autores antes mencionados sólo probaron la actividad de las bacteriocinas sobre una cepa de *E. coli* O157:H7.

Los resultados de este estudio difieren con los obtenidos por Pattanayaiying y col. (2014), quienes reportaron ausencia de inhibición de la bacteriocina nisina Z sobre *E. coli* O157:H7. De forma similar, Sharma y col. (2014), al estudiar la actividad antimicrobiana de los SLC de 31 cepas de lactobacilos, descubrieron que si bien estos producían la inhibición de varios microorganismos patógenos, ninguno fue capaz de inhibir a *E. coli*.

Si bien los análisis de varianza ANOVA mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre los halos de inhibición promedio de los SLC y SLCN de ambos lactobacilos sobre *E. coli*, se observó que la mayor parte de la actividad antimicrobiana era producida por las bacteriocinas producidas por estas cepas. El 78,72% de la inhibición del crecimiento bacteriano producido por *L. fermentum* L23 se debió a la bacteriocina L23 y sólo el 21,28% a los ácidos orgánicos (fig. 14). En el caso de *L. rhamnosus* L60, el 70,74% de la actividad antimicrobiana se atribuyó a la bacteriocina L60 y el 29,26% a los ácidos orgánicos (fig. 15).

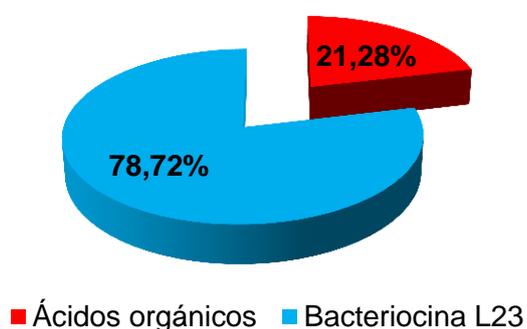


Figura 14: Porcentaje de la actividad inhibitoria causada por las diferentes sustancias antibiomas producidas por *Lactobacillus fermentum* L23 sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica

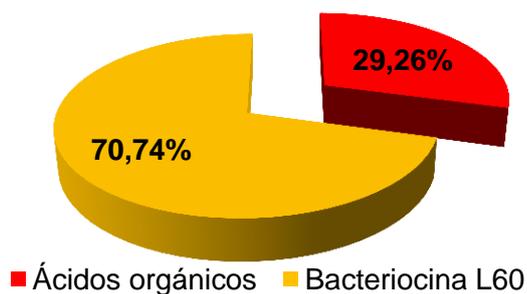


Figura 15: Porcentaje de la actividad inhibitoria causada por las diferentes sustancias antibiomas producidas por *Lactobacillus rhamnosus* L60 sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica

En contraste con los resultados de este trabajo, Davoodabadi y col. (2015) reportaron el hallazgo de cepas de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* con actividad inhibitoria sobre *E. coli* O157:H7 que no se debía a la producción de bacteriocinas sino a los ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno contenidos en el sobrenadante libre de células. De igual manera, Bian y col. (2015) estudiaron el efecto inhibitorio de una cepa de *L. helveticus* sobre *E. coli* O157:H7, observando que dicho efecto era debido a la acción de los ácidos orgánicos producidos por los lactobacilos. Arena y col. (2016) informaron que los ácidos orgánicos producidos por las cepas de lactobacilos estudiadas en su trabajo eran los responsables de la mayor parte de la actividad antimicrobiana que presentaban sobre *E. coli* O157:H7. De forma similar, Oliveira y col. (2017) observaron que el SLC de la cepa bacteriocinogénica *L. rhamnosus* L156.4 perdía actividad inhibitoria sobre ECEH cuando era neutralizado, por lo que dicha actividad se debía principalmente a los ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante y no a la bacteriocina.

5.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre cepas de *E. coli* O157:H7 y no O157:H7 mediante la técnica de pozos en el agar

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los SLCN conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 fue determinada sobre 10 cepas de ECEH serotipo O157:H7 y no O157:H7 mediante la técnica de difusión en pozos.

Los valores de CIM de las bacteriocinas L23 y L60 se muestran en las tablas 5 y 6, respectivamente. Además, en las mismas tablas se muestran los halos promedio de inhibición del crecimiento de cada cepa de *E. coli* producidos por las diferentes concentraciones de bacteriocinas. Los valores de CIM de la bacteriocina L23 estuvieron comprendidos entre 40 y 80 UA ml⁻¹. Mientras que la CIM de la bacteriocina L60 estuvo en un rango de entre 40 y 160 UA ml⁻¹ para todas las cepas de *E. coli* ensayadas. Estos resultados demostraron que muy bajas concentraciones de las bacteriocinas L23 y L60 fueron capaces de inhibir el crecimiento de ECEH.

En la bibliografía consultada se encontraron pocos reportes donde se informen cepas de BAL capaces de generar halos de inhibición de un tamaño similar a los observados en este estudio. Geremew y col. (2015) hallaron cepas de BAL que producían halos de inhibición del crecimiento de una cepa de *E. coli* con diámetros de entre 5 y 8 mm. Por otra parte, Arena y col. (2016) reportaron el hallazgo de cepas de *Lactobacillus* capaces de generar halos de inhibición del crecimiento de una cepa de *E. coli* O157:H7 con un diámetro máximo de 11 mm. En ambos trabajos de investigación, esta técnica fue realizada utilizando

los SLC sin neutralizar y posteriormente se demostró que la actividad antimicrobiana se debía únicamente a la acción de ácidos orgánicos. Por esta razón, es importante destacar los resultados obtenidos en este estudio, ya que el 100% de las cepas de ECEH ensayadas fueron inhibidas con una CIM de la bacteriocina L23 comprendida entre 40 y 80 UA ml⁻¹, lo cual corresponde a una dilución de 1:16 y 1:8, respectivamente. Mientras que la bacteriocina L60 inhibió al 70% de las cepas con el mismo valor de CIM.

Tabla 5: Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina L23 sobre cepas de *Escherichia coli*

Cepa de <i>E. coli</i>	Serotipo	Halos de inhibición de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en presencia de bacteriocina L23 (mm ± SD)						CIM
		640 UA ml ⁻¹	320 UA ml ⁻¹	160 UA ml ⁻¹	80 UA ml ⁻¹	40 UA ml ⁻¹	20 UA ml ⁻¹	UA ml ⁻¹
LAMA 627	O157:H7	24,00 ± 0,71	18,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	14,00 ± 0,71	-	-	80
LAMA 649	O157:H7	14,50 ± 0,71	15,00 ± 1,41	14,00 ± 2,81	15,00 ± 0,00	-	-	80
LAMA 682	O157:H7	15,50 ± 0,71	14,00 ± 2,83	14,00 ± 0,00	13,50 ± 0,71	-	-	80
LAMA 684	O157:H7	20,00 ± 0,00	16,00 ± 1,41	17,50 ± 0,71	13,50 ± 0,71	-	-	80
LAMA 686	O157:H7	20,00 ± 0,71	15,00 ± 1,41	14,00 ± 0,71	13,5 ± 0,71	12,50 ± 0,71	-	40
LAMA 798	O157:H7	22,00 ± 0,71	18,00 ± 0,71	15,00 ± 0,00	13,00 ± 0,71	-	-	80
LAMA 637	O174:H8	23,50 ± 0,71	15,50 ± 2,12	13,50 ± 0,71	12,00 ± 0,71	-	-	80
LAMA 641	O174:H21	19,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71	12,00 ± 0,00	11,00 ± 1,41	-	-	80
LAMA 651	O8/O60:H19	16,50 ± 0,71	13,50 ± 0,71	12,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	-	40
LAMA 772	O178:H19	15,00 ± 0,00	13,00 ± 0,71	13,00 ± 1,41	12,00 ± 0,71	10,50 ± 0,71	-	40

Referencias: UA ml⁻¹: Unidades de Actividad por mililitro; (-): no presenta actividad inhibitoria; CIM: concentración inhibitoria mínima de bacteriocina

Tabla 6: Concentración inhibitoria mínima de la bacteriocina L60 sobre cepas de *Escherichia coli*

Cepa de <i>E. coli</i>	Serotipo	Halos de inhibición de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en presencia de bacteriocina L23 (mm ± SD)						CIM
		640 UA ml ⁻¹	320 UA ml ⁻¹	160 UA ml ⁻¹	80 UA ml ⁻¹	40 UA ml ⁻¹	20 UA ml ⁻¹	UA ml ⁻¹
LAMA 627	O157:H7	21,00 ± 0,71	14,00 ± 0,71	15,00 ± 0,71	12,00 ± 0,71	-	-	80
LAMA 649	O157:H7	18,50 ± 0,71	15,50 ± 0,71	13,00 ± 2,83	-	-	-	160
LAMA 682	O157:H7	20,00 ± 0,71	15,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	10,50 ± 0,71	-	-	80
LAMA 684	O157:H7	22,50 ± 0,71	15,5 ± 0,71	14,50 ± 0,71	-	-	-	160
LAMA 686	O157:H7	17,00 ± 0,71	14,00 ± 1,41	13,5 ± 0,71	12,5 ± 0,71	11,50 ± 0,71	-	40
LAMA 798	O157:H7	16,00 ± 0,71	12,00 ± 0,71	12,00 ± 0,71	-	-	-	160
LAMA 637	O174:H8	21,00 ± 1,41	13,50 ± 0,71	13,00 ± 0,71	11,5 ± 0,71	-	-	80
LAMA 641	O174:H21	18,00 ± 1,41	12,00 ± 0,71	11,50 ± 0,71	11,00 ± 0,71	-	-	80
LAMA 651	O8/O60:H19	14,50 ± 0,71	16,00 ± 0,00	14,00 ± 1,41	12,00 ± 0,71	11,00 ± 0,71	-	40
LAMA 772	O178:H19	14,00 ± 0,71	14,00 ± 0,71	13,50 ± 3,53	11,00 ± 0,71	13,50 ± 3,53	-	40

Referencias: UA ml⁻¹: Unidades de Actividad por mililitro; (-): no presenta actividad inhibitoria; CIM: concentración inhibitoria mínima de bacteriocina

En la figura 16 se observan los halos de inhibición de crecimiento de *E. coli* producidos por diferentes concentraciones de las bacteriocinas L23 y L60 y la CIM de cada bacteriocina.

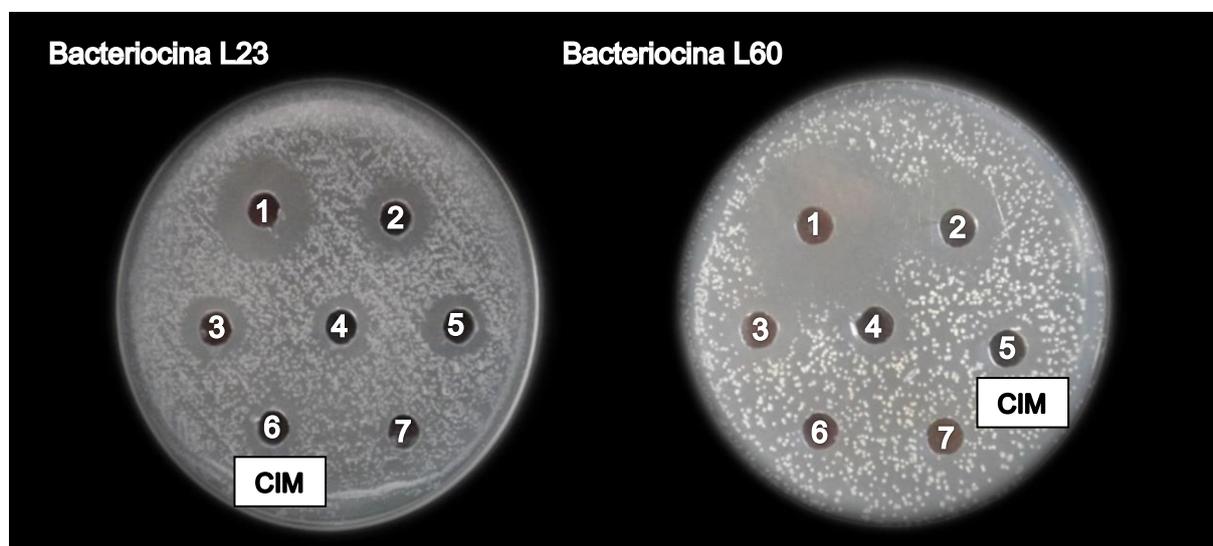


Figura 16: Concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre una cepa de *E. coli*

Referencias: 1: sobrenadante libre de células sin neutralizar (640 UA ml⁻¹); 2: sobrenadante libre de células neutralizado (640 UA ml⁻¹); 3: 320 UA ml⁻¹; 4: 160 UA ml⁻¹; 5: 80 UA ml⁻¹; 6: 40 UA ml⁻¹; 7: 20 UA ml⁻¹

Tabla 7: Porcentaje de cepas de *Escherichia coli* sensibles a diferentes concentraciones inhibitorias mínimas de las bacteriocinas L23 y L60

<i>Escherichia coli</i>	CIM (UA ml ⁻¹)	Porcentaje de cepas sensibles	
		L23	L60
<i>E. coli</i> O157:H7 (n=6)	160	-	50
	80	83,33	33,33
	40	16,67	16,67
<i>E. coli</i> no-O157:H7 (n=4)	80	50	50
	40	50	50

Referencias: UA ml⁻¹: Unidades de Actividad por mililitro; CIM: concentración inhibitoria mínima de bacteriocina.

En la tabla 7 se muestran los porcentajes de cepas de *E. coli* sensibles a las diferentes concentraciones de las bacteriocinas L23 y L60. En el caso de la bacteriocina L23, todos los serotipos de *E. coli* fueron sensibles con concentraciones de bacteriocina entre 40 y 80 UA ml⁻¹, observándose una CIM de 80 UA ml⁻¹ para el 83,33% de las cepas de *E. coli* O157:H7 y una CIM de 40 UA ml⁻¹ para el 16,67% restante. En el caso de la bacteriocina L60, se observó que el 50% de las cepas correspondientes al serotipo O157:H7 fueron sensibles a una CIM de bacteriocina de 160 UA ml⁻¹, un 33,33% a 80 UA ml⁻¹ y el 16,67% restante a 40 UA ml⁻¹. Los valores de CIM para las bacteriocinas L23 y L60 estuvieron comprendidos entre 40 y 80 UA ml⁻¹ para las cepas de *E. coli* no O157:H7, siendo el 50% de las cepas sensibles a cada una de dichas concentraciones. Estos resultados demuestran que, incluso utilizando las bacteriocinas muy diluidas, tienen una efectiva actividad antimicrobiana *in vitro*.

Si bien la técnica de pozos en el agar es útil tanto para evaluar la actividad antimicrobiana de sustancias antimicrobianas sin diluir como para determinar la CIM de las mismas, no se encontraron otros estudios acerca de la CIM de otras bacteriocinas capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 mediante esta técnica en la bibliografía consultada.

5.3.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre *Escherichia coli* enterohemorrágica mediante la técnica de microdilución en caldo

La técnica de microdilución en caldo fue realizada para evaluar la CIM de las bacteriocinas L23 y L60 sobre la cepa de *E. coli* LAMA 627 serotipo O157:H7. La figura 17 muestra los resultados hallados, observándose que ambas bacteriocinas presentaron una CIM de 160 UA ml⁻¹. Este valor de CIM corresponde al último pocillo de la microplaca que no presentó crecimiento bacteriano, evidenciado por el color azul del medio el cual indica que no hay bacterias metabólicamente activas capaces de reducir la resazurina. La diferencia con el valor de CIM obtenido mediante la técnica de difusión en pozos para la misma cepa de *E. coli* puede deberse a diferencias experimentales de cada técnica. El valor de CIM hallado por la técnica de microdilución en caldo fue utilizado como dato preliminar para la realización de la técnica de checkerboard, en la cual se utilizaron concentraciones iniciales de cada bacteriocina correspondientes al doble de la CIM.

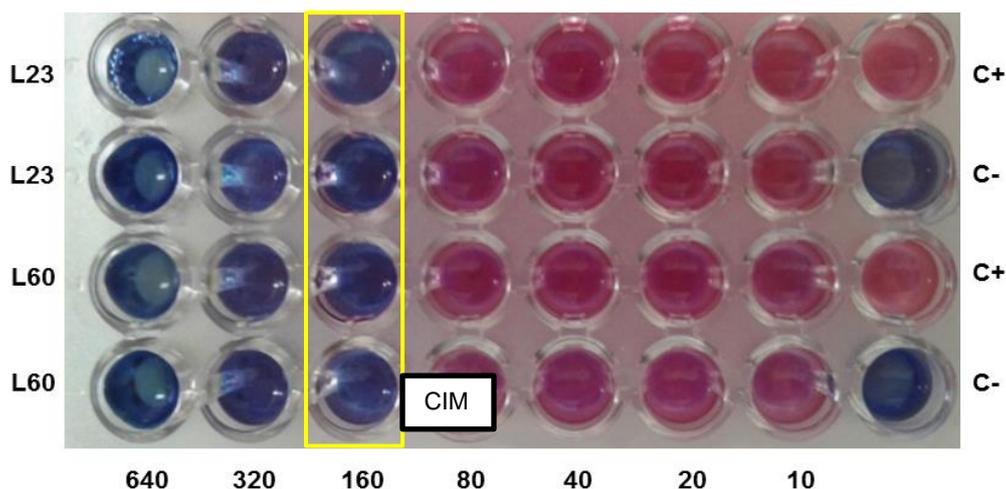


Figura 17: Concentración inhibitoria mínima de las bacteriocinas L23 y L60 sobre una cepa de *Escherichia coli* O157:H7

Referencias: C+: control positivo; C-: control negativo; las concentraciones de bacteriocina se encuentran expresadas en UA ml⁻¹.

A partir de los pocillos en donde no se observó crecimiento bacteriano, se sembraron placas de ATS para determinar la concentración bactericida mínima (CBM). Luego del tiempo de incubación se observó desarrollo microbiano en las placas sembradas. Estos resultados permitieron demostrar que el modo de acción de las bacteriocinas L23 y L60 es bacteriostático, es decir, inhiben el crecimiento bacteriano sin producir la muerte del microorganismo patógeno. De forma similar, en estudios previos, García (2017) describió un efecto bacteriostático de estas bacteriocinas sobre *Listeria monocytogenes*.

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Jena y col. (2013), quienes describieron una bacteriocina producida por una cepa de *L. helveticus* que ejercía un efecto bactericida sobre una cepa de *E. coli* no O157:H7. Por otra parte, Trivedi y col. (2013) reportaron el hallazgo de una bacteriocina producida por una cepa de *L. brevis* con actividad bacteriostática sobre dos cepas de *E. coli* uropatógenas.

Es de destacar la importancia del presente trabajo de investigación debido a que en la bibliografía consultada no se encontraron estudios donde se informe la CIM de bacteriocinas necesaria para inhibir cepas de *E. coli* por esta metodología.

5.3.5. Evaluación de la interacción entre las bacteriocinas L23 y L60 por la técnica de checkerboard

Con el objetivo de estudiar el tipo de interacción entre los SLCN conteniendo las bacteriocinas L23 y L60 se llevó a cabo la técnica de checkerboard o tablero de ajedrez utilizando la cepa *E. coli* LAMA 627 serotipo O157:H7.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de checkerboard demostraron que la combinación de las bacteriocinas L23 y L60 produjo una disminución de la CIM de cada bacteriocina respecto a la observada cuando cada bacteriocina fue ensayada de forma independiente. De manera que cuando actuaron de forma conjunta la CIM de L23 se redujo a la mitad, mientras que la CIM de L60 disminuyó cuatro veces en comparación al valor observado cuando actúa de forma independiente (tabla 8). Teniendo en cuenta los criterios establecidos para la evaluación de las interacciones entre sustancias antimicrobianas de acuerdo al valor CIF, se comprobó que las bacteriocinas L23 y L60 inhibieron de forma sinérgica el crecimiento de ECEH ya que el valor de CIF hallado fue inferior a 1 (tabla 8).

Tabla 8: Concentración inhibitoria mínima y concentración inhibitoria fraccionaria de las bacteriocinas L23 y L60

<i>Escherichia coli</i> LAMA 627	
CIM de A (UA ml ⁻¹)	160
CIM de B (UA ml ⁻¹)	160
CIM de A en AB (UA ml ⁻¹)	80
CIM de B en AB (UA ml ⁻¹)	40
CIF	0,75

Referencias: A: bacteriocina L23; B: bacteriocina L60; AB: combinación de bacteriocinas L23 y L60; CIM: concentración inhibitoria mínima; CIF: concentración inhibitoria fraccionaria.

En la figura 18 se muestran los resultados de la técnica de checkerboard sobre *E. coli* LAMA 627. El pocillo marcado indica la CIF de L23 y L60 en la combinación de bacteriocinas que fue capaz de inhibir al microorganismo patógeno en estudio.

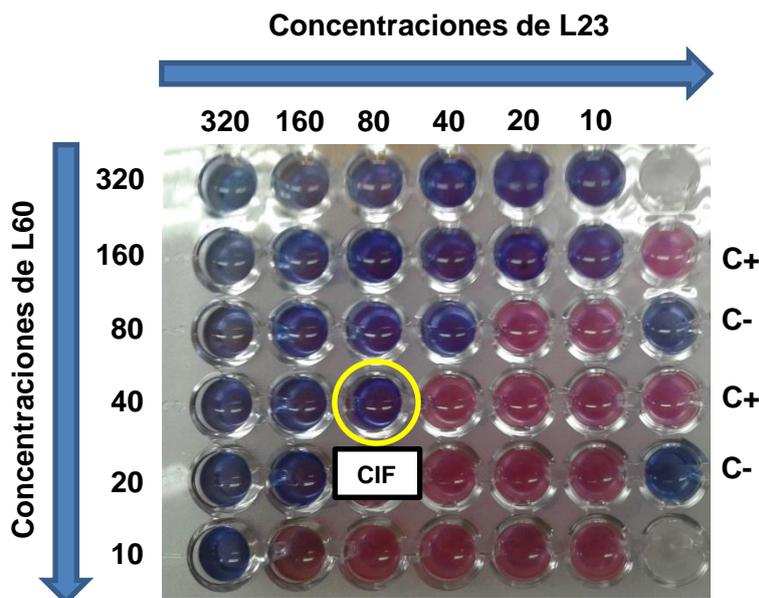


Figura 18: Concentración inhibitoria fraccionaria de las bacteriocinas L23 y L60 sobre *E. coli* enterohemorrágica

Referencias: C+: control positivo; C-: control negativo; UA ml⁻¹: unidades de actividad por mililitro.

Es de destacar que los resultados de este estudio son novedosos, ya que en la bibliografía consultada no se encontraron trabajos referidos a la interacción sinérgica de dos bacteriocinas utilizando la técnica de checkerboard sobre ECEH. La utilización de dos sustancias antimicrobianas en combinación que actúen de forma sinérgica sobre un microorganismo patógeno disminuye la dosis necesaria de cada sustancia para inhibirlo. Por ello, el hecho de que las bacteriocinas L23 y L60 fueron capaces de inhibir de modo sinérgico a *E. coli* O157:H7 representa un antecedente importante para considerar su potencial aplicación como compuestos biocontroladores de estos microorganismos patógenos en la industria alimentaria.

6. CONCLUSIONES

- ✓ Las cepas probióticas de *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 presentaron actividad antimicrobiana sobre todas las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica ensayadas
- ✓ La mayor parte de la actividad antimicrobiana producida por *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 se debe a las bacteriocinas L23 y L60, respectivamente
- ✓ Las bacteriocinas L23 y L60 en bajas concentraciones presentaron actividad antimicrobiana sobre *E. coli* enterohemorrágica
- ✓ Las bacteriocinas producidas por ambos lactobacilos probióticos presentaron actividad bacteriostática sobre las cepas de *E. coli* enterohemorrágica ensayadas
- ✓ Las bacteriocinas L23 y L60 presentaron interacción sinérgica sobre *E. coli* enterohemorrágica

Este estudio permitió demostrar que a bajas concentraciones, las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 son capaces de inhibir a cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica, de ejercer un efecto bacteriostático sobre las mismas y de interactuar sinérgicamente cuando se las aplica en combinación. Estos hallazgos representarían un antecedente promisorio para la posible aplicación de estos lactobacilos productores de bacteriocinas como biocontroladores de microorganismos patógenos en la industria alimentaria.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:2939-2951.
- Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D (2016) Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*. 7:464.
- Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF (2016) Bacteriocins: recent trends and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56:(5), 817-834.
- Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M (2013) Probiotics; properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harb Perspect Med*. DOI: 10.1101/cshperspect.a010074.
- Bian X, Evvie SE, Muhammad Z, Luo GW, Liang HZ, Wang NN, Huo GC (2015) In vitro assessment of the antimicrobial potential of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from traditional cheese in Sinkiang China against food-borne pathogens. *Food & Function*. 7(2):798-797.
- Bielaszewska M, Idelevich EA, Zhang W, Bauwens A, Schaumburg F, Mellmann A, Peters G, Karch H (2012) Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 56(6):3277-3287.
- Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica N° 392 – SE 52 2017* (2018) Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. Ministerio de Salud de la Nación. (pp. 47-49).
- Borges S, Silva J, Teixeira P (2013) The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Archives of Gynecology Obstetrics*. 289 (3):479-89.
- Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega EE, de la Torre JH, Linares LH, Sanz ME, Etcheverría AI, Padola NL, Galli L, Peral García P, Copes J, Leotta GA (2012) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2:171.
- Campana R, van Hemert S, Baffone W (2017) Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*. 9(12). DOI: 10.1186/s13099-017-0162-4.

- Cano-Garrido O, Seras-Franzoso J, García-Fruitós E (2015) Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. *Microbial Cell Factories*. 14:137.
- Castro-Rosas J, Cerna-Cortés JF, Méndez-Reyes E, López-Hernández D, Gómez-Aldapa CA, Estrada-García T (2012) Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an área where crops are irrigated with untreated sewage wáter. *International Journal of Food Microbiology*. 156(2):176-180.
- Ceresa C, Tessarolo F, Caola I, Nollo G, Cavallo M, Rinaldi M, Fracchia L (2015) Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *Journal of Applied Microbiology*. 118(5):1116-25.
- Cordonnier C, Thévenot J, Mesmin LE, Alric M, Livrelli V, Blanquet-Diot S (2016) Probiotic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: An effective strategy against a deadly enemy?. *Critical Reviews in Microbiology*. 43(1):116-132.
- Davoodabadi A, Soltan-Dallal MM, Rahimi-Foroushani A, Douraghi M, Sharifi-Yazdi MK, Amin-Harati F (2015) Antibacterial activity of *Lactobacillus spp.* isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe*. 34:53-8.
- Dicks LMT, Botes M (2010) Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes*. 1(1):11-29.
- Duar RB, Lin XB, Zheng J, Martino ME, Grenier T, Pérez-Muñoz ME, Leulier F, Gänzle M, Walter J (2017) Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*. 41(1):27-48.
- Eichhorn I, Heidemanns K, Semmler T, Kinnemann B, Mellmann A, Harmsen D, Anjum MF, Schmidt H, Fruth A, Valentin-Weigand P, Heesemann J, Suerbaum S, Karch H, Wieler L (2015) Highly virulent non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes reflect similar phylogenetic lineages, providing new insights into the evolution of EHEC. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(20):7041-7.
- Etcheverría AI, Padola NL (2013) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence*. 4(5):366-372.
- FDA (Food and Drug Administration) *Guidance for Industry on Complementary and Alternative Medicine Products and their Regulation 31 by the Food and Drug Administration (Draft Guidance)* (2006). U.S. Department of Health and Human Services.

- Favaro L, Todorov SD (2017) Bacteriocinogenic LAB strains for fermented meat preservation: perspectives, challenges, and limitations. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 9(4):444-458.
- Fernández D, Krüger A, Polifroni R, Bustamante AV, Sanso AM, Etcheverría AI, Lucchesi PMA, Parma AE, Padola NL (2013) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 3:9.
- Fernández D, Padola NL (2012) *Escherichia coli* verotoxigénico: varias cuestiones... y los tambos también. *Revista Argentina de Microbiología*. 44. 312-323.
- Fernández-Brando RJ, Betancor LV, Mejías MP, Panek AC, Cabrera GG, Exeni RA, Palermo MS (2011) Actualización en el tratamiento del síndrome urémico hemolítico endémico: Patogénesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Medicina*. 71(4):383-389.
- García MJ (2017) *Estudio de la capacidad antagonista de dos cepas de lactobacilos productoras de bacteriocinas sobre cepas de Listeria monocytogenes aisladas de alimentos*. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
- García MJ, Ruíz F, Asurmendi P, Pascual L, Barberis L (2015) Bacteriocin producing *Lactobacillus* strains as a biological strategy to control listerial growth. *International Journal of Microbiology and Advanced Immunology*. 03(2), 60-64.
- George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G (2018) Benefaction of probiotics for human health: a review. *Journal of food and drug analysis*. 26(3):927-939.
- Geremew T, Kebede A, Andualem B (2015) The role of spices and lactic acid bacteria as antimicrobial agent to extend the shelf life of metata ayib (traditional Ethiopian spiced fermented cottage cheese). *Journal of Food Science and Technology*. 52(9):5661-5670.
- Gomes TA, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM, Ferreira LC, Martinez MB (2016) Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(1):3-30.
- Gómez NC, Ramiro JMP, Quecan BXV, de Melo Franco BDG (2016) Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*. 7:863.

- Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR (2007) The diversity of bacteriocin in Gram positive bacteria. En: Riley MA y Chavan MA (Eds.) *Bacteriocin Ecology and Evolution* (pp. 44-92). Heidelberg, Germany: Springer.
- Huys G, Botteldoorn N, Delvigne F, De Vuyst L, Heyndrickx M, Pot B, Dubois J, Daube G (2013) Microbial characterization of probiotics—Advisory report of the Working Group “8651 Probiotics” of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular Nutrition & Food Research*. 57, 1479-1504.
- Ibarra C, Goldstein J, Silberstein C, Zotta E, Belardo M, Reppetto HA (2008) Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 106(5):435-442.
- Jena PK, Trivedi D, Chaudhary H, Sahoo TK, Seshadri S (2013) Bacteriocin PJ4 active against enteric pathogen produced by *Lactobacillus helveticus* PJ4 isolated from gut microflora of wistar rat (*Rattus norvegicus*): partial purification and characterization of bacteriocin. *Applied biochemistry and biotechnology*. 169(7):2088-2100.
- Lim JY, Yoon J, Hovde CJ (2010) A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Technology*. 20(1):5-14.
- López EL, Contrini MM, Gladstein E, González Ayala S, Santoro R, Ezcurra G, Teplitz E, Matsumoto Y, Sato H, Sakai K, Katsuura Y, Hoshide S, Morita T, Harning R, Brookman S (2012) An epidemiologic surveillance of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* infection in argentinean children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 31(1):20-24.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009) *Brock Biología de los microorganismos*, 12^a edición. Pearson-Prentice Hall. Capítulos 2, 16 y 21. pp. 46, 493, 494, 681.
- Mele C, Remuzzi G, Noris M (2014) Hemolytic uremic syndrome. *Seminars in immunopathology*. 36(4):399-420.
- Miko A, Rivas M, Betancor A, Delannoy S, Fach P, Beutin L (2014) Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer, and humans from Argentina and Germany. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4:78.
- Mokoena MP (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*. 22(8):1255.
- Oliveira LdC, Silveira AMM, Monteiro AdS, dos Santos VL, Nicoli JR, Azevedo VAdC, Soares SdC, Días-Souza MV, Nardi RMD (2017) In silico prediction, *in vitro* antibacterial spectrum, and physicochemical properties of a putative bacteriocin

- produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain L156.4. *Frontiers in Microbiology*. 8:876.
- Pascual LM, Daniele MB, Giordano W, Pájaro MC, Barberis IL (2008a) Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology*. 56(4): 397-402.
- Pascual LM, Daniele MB, Pájaro C, Barberis L (2006) *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. *Contraception*. 73(1): 78-81.
- Pascual LM, Daniele MB, Ruiz F, Giordano W, Pajaro C, Barberis L (2008b) *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 54(3): 141-148.
- Pascual LM, Ruiz F, Giordano W, Barberis IL (2010) Vaginal colonization and activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus fermentum* L23 in a murine model of vaginal tract infection. *Journal of medical microbiology*. 59(3):360-364.
- Patel R, DuPont HL (2015) New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 60(S2):S108-121.
- Pattanayaiying R, H-Kittikun A, Cutter CN (2014) Effect of lauric arginate, nisin Z, and a combination against several food-related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 188:135-146.
- Quinn G, Keough M (2002) *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press.
- Rai M, Pai R, Gaikwad S, Kövics G (2016) Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *Journal of Food Science and Technology*. 53(9):3381-3394.
- Rigobelo EEC, Karapetkov N, Maestá SA, Ávila FA, McIntosh D (2015) Use of probiotics to reduce faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep. *Beneficial Microbes*. 6(1): 53-60.
- Ruíz FO, Gerbaldo G, García MJ, Giordano W, Pascual L, Barberis IL (2012) Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactobacilli strains with inhibitory activity for *Streptococcus agalactiae*. *Current Microbiology*. 64(4): 349-356.
- Ruíz FO, Pascual L, Giordano W, Barberis L (2015) Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic lactobacilli as biological weapons against *Neisseria gonorrhoeae*. *Pathogens and Disease*. 73(3). DOI: 10.1093/femspd/ftv013.
- Rumjuankiat K, Perez Horanda R, Pilasombut K, Keawsompong S, Zendo T, Sonomoto K, Nitisinprasert S (2015) Purification and characterization of a novel

- plantaricin, KL-1Y, from *Lactobacillus plantarum* KL-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(6):983-94.
- Rumi MV, Irino K, Deza N, Huguet MJ, Betancor AB (2012) First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. *Journal of infection in developing countries*. 6(4):358-363.
- Salvetti E, Torriani S, Felis GE (2012) The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 4:217.
- Salvetti E, Fondi M, Fani R, Torriani S, Felis GE (2013) Evolution of lactic acid bacteria in the order *Lactobacillales* as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *Systematic and Applied Microbiology*. 36(5):291-305.
- Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 42:321-324.
- Sharma D, Singh Saharan B, Chauhan N, Bansal A, Procha S (2014) Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *The Scientific World Journal*. Article ID 493548. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/493548>.
- Singh VP (2018) Recent approaches in food bio-preservation – a review. *Open Veterinary Journal*. 8(1):104-111.
- Theron MM, Lues JFR (2010) Organic Acids and Food Preservation. *CRC Press*. 117-122.
- Trivedi D, Jena PK, Patel JK, Seshadri S (2013) Partial purification and characterization of a bacteriocin DT24 produced by probiotic vaginal *Lactobacillus brevis* DT24 and determination of its anti-uropathogenic *Escherichia coli* potential. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 5(2):142-151
- Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Heinz Schleifer K, Whitman WB (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume three. The Firmicutes. New York, United States: *Springer*.
- Wang X, Hongyang R, Liu D, Wang B, Zhu W, Wang W (2013) H⁺-ATPase-defective variants of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* contribute to inhibition of postacidification of yogurt during chilled storage. *Journal of Food Science*. 78(2):297-302.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL (2008) *Koneman. Diagnóstico Microbiológico*. Texto y atlas color. 6^a edición. Editorial Médica Panamericana. Capítulo 6. pp. 227 y 238.

- Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwivathana A, Benjakul S, Visessanguan W (2016) Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*. 120:118-132.
- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*. 26(5):241.

8. ANEXO

Inhibición de *Escherichia coli* producida por el SLC de cada cepa de *Lactobacillus* spp.

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,02113
 Error: 18,3167 gl: 18
 Columnal Medias n E.E.

SLC	Medias	n	E.E.	
L23	24,20	10	1,35	A
L60	25,80	10	1,35	A

 Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Inhibición de *Escherichia coli* producida por el SLCN de cada cepa de *Lactobacillus* spp.

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,02311
 Error: 10,3528 gl: 18
 Columnal Medias n E.E.

SLCN	Medias	n	E.E.	
L60	18,25	10	1,02	A
L23	19,05	10	1,02	A

 Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición promedio de cepas de *Escherichia coli* producidos por el SLC y SLCN de *Lactobacillus fermentum* L23

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,63098
 Error: 14,9347 gl: 18
 Columnal Medias n E.E.

SLCN	Medias	n	E.E.	
L23	19,05	10	1,22	A
SLC L23	24,20	10	1,22	B

 Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Halos de inhibición promedio de cepas de *Escherichia coli* producidos por el SLC y SLCN de *Lactobacillus rhamnosus* L60

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,48205
 Error: 13,7347 gl: 18
 Columnal Medias n E.E.

SLCN	Medias	n	E.E.	
L60	18,25	10	1,17	A
SLC L60	25,80	10	1,17	B

 Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)