



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico - Químicas y Naturales

Departamento de Microbiología e Inmunología

Cátedra de Bacteriología

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LOS  
METABOLITOS CON ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA PRODUCIDAS POR  
*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*,  
*Lactobacillus brevis* Y *Lactobacillus plantarum*  
SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli*  
PATÓGENAS Y NO PATÓGENAS**

**JULIA FERNÁNDEZ**

**Trabajo Final de Grado para optar por el título de Microbióloga**

**Directora: Dra. BARBERIS, Lucila**

**Co - directora: Dra. ASURMENDI, Paula**

**Mayo 2019**

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.

**Alumna:** Julia Fernández \_\_\_\_\_

**Directora:** Dra. Lucila Barberis \_\_\_\_\_

**Co-directora:** Dra. Paula Asurmendi \_\_\_\_\_

**Jurados:**  
Dra. Carla Barberis \_\_\_\_\_

Dra. Cristina Torres \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Carolina y Raúl, que me dieron la oportunidad de estudiar, acompañándome todos estos años, dándome su apoyo y festejando cada logro. A mis hermanos, Manuel y Lucia, que estuvieron siempre presentes para mí cuando los necesite.

A mis abuelos y querida nona Nela, que ya no están conmigo pero desde algún lado están festejando conmigo. A mi abuela, tíos, tías y primas por su apoyo y preocupación de corazón en todo momento. Gracias por sus consejos y palabras de aliento.

A mi gran amigo Emma, por ser como un hermano que siempre me aconseja y me presta un oído. A mi amigo Dari, con el que pase largas noches de estudio, tardes enteras de juguetitos (nunca abandonar nuestro niño interior) y películas, charlas súper nerds. A mi amiga y hermana de corazón Chor, que desde los primeros días en el campus estuviste al lado mío, compartiendo buenos momentos y malos también. Gracias por tu amistad incondicional.

A Ro, Cacho, Maru, Cinduli, con quienes compartí este trayecto universitario, atravesando cada instancia (con alegrías y sufrimientos). Gracias por su apoyo y buena onda. Me llevo lindos recuerdos de todo lo que hemos compartido. A Mati, gracias por no haberme soltado la mano el primer año (que hubiera sido de mí!) y por hacerme reír en todo momento con tus locuras.

A mis compañeros microbiólogos, los que estuvieron desde el primer día y los que se fueron incorporando. Gracias a ustedes la vida universitaria fue una gran experiencia. Un placer haberlos conocido!

A mis amigas Fla, Lu y Flor, las mejores compañeras de entrenamiento que tengo. Gracias por todos los momentos llenos de risas y karaoke. También mi amiga de la vida Gii, ejemplo de que no hace falta verse diariamente para compartir una amistad. Gracias por seguir compartiendo conmigo las mejores charlas y tardes de birras!

Al equipo de Bacteriología, por permitirme terminar mi formación con ustedes. Lucila, Liliana, Fran, Josesey, Anita por su predisposición a transmitir sus conocimientos. Y especialmente a Pauli, por la paciencia, el tiempo invertido y atención.

A Lucrecia, por permitirme realizar las prácticas profesionales y en el proceso enseñarme tanto. A Vale y Anita, por su predisposición a enseñarme y siempre con la mejor onda, desde el primer día.

A la Universidad Nacional de Rio Cuarto y todos los docentes que formaron parte de mi educación. Eternamente agradecida!



|   |    |
|---|----|
| 3.3.2.3 Evaluación de la interacción entre las bacteriocinas<br>mediante la técnica de difusión en pozos próximos   | 20 |
| 3.4 Análisis estadístico  | 21 |
| 3.5 Medios de cultivo   | 22 |
| 3.5.1 Medios para el crecimiento de <i>Escherichia coli</i>   | 22 |
| 3.5.2 Medios para el crecimiento de <i>Lactobacillus</i> spp.   | 23 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN   | 24 |
| 4.1 Cepas de <i>Lactobacillus</i>   | 24 |
| 4.2 Cepas de <i>Escherichia coli</i>  | 25 |
| 4.3 Actividad antimicrobiana producida por <i>Lactobacillus fermentum</i> L23,<br><i>L. brevis</i> L52, <i>L. plantarum</i> L54, <i>L. plantarum</i> L57 y <i>L. rhamnosus</i><br>L60 sobre cepas de <i>E. coli</i>             | 27 |
| 4.4 Estudio de las interacciones entre los compuestos antimicrobianos<br>producidos por <i>Lactobacillus fermentum</i> L23, <i>L. brevis</i> L52,<br><i>L. plantarum</i> L54, <i>L. plantarum</i> L57 y <i>L. rhamnosus</i> L60 | 29 |
| 4.5 Evaluación de la inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 y<br>no-O157:H7 mediante la técnica de difusión en pozos  | 31 |
| 4.6 Evaluación de las interacciones entre las bacteriocinas L23, L52,<br>L54, L57 y L60 presentes en los SLCN de <i>Lactobacillus</i> spp. sobre<br>cepas de <i>E. coli</i> O157 y no-O157                                      | 35 |
| 5. CONCLUSIONES   | 39 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA   | 41 |
| 7. ANEXO  | 50 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 1</b>  | Esquema de las interacciones entre los compuestos antimicrobianos producidos por cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.  | 19 |
| <b>Figura 2</b>  | Esquema de las interacciones entre las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes libres de células neutralizados de las diferentes cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.   | 20 |
| <b>Figura 3</b>  | Observación microscópica (1000x) de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23 (A), <i>L. brevis</i> L52 (B), <i>L. plantarum</i> L54 (C), <i>L. plantarum</i> L57 (D) y <i>L. rhamnosus</i> L60 (E)   | 24 |
| <b>Figura 4</b>  | Observación microscópica (1000x) de <i>Escherichia coli</i> LAMA 641 (A), <i>E. coli</i> LAMA 649 (B), <i>E. coli</i> LAMA 651 (C), <i>E. coli</i> LAMA 682 (D) y <i>E. coli</i> LAMA 684 (E)  | 25 |
| <b>Figura 5</b>  | Resultados de las pruebas bioquímicas para identificar <i>Escherichia coli</i>   | 26 |
| <b>Figura 6</b>  | Sinergismo entre las sustancias antimicrobianas producidas por <i>Lactobacillus</i> spp. sobre diferentes cepas de <i>Escherichia coli</i>   | 29 |
| <b>Figura 7</b>  | Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células sin tratar (A) y neutralizados (B) de los lactobacilos sobre <i>Escherichia coli</i> LAMA 651  | 33 |
| <b>Figura 8</b>  | Porcentaje de la actividad inhibitoria mediada por las diferentes sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. sobre <i>Escherichia coli</i> productoras de toxinas Shiga  | 34 |
| <b>Figura 9</b>  | Sinergismo entre las bacteriocinas presentes en los SLCN de <i>L. fermentum</i> L23, <i>L. brevis</i> L52, <i>L. plantarum</i> L57 y <i>L. rhamnosus</i> L60 sobre <i>Escherichia coli</i>   | 37 |
| <b>Figura 10</b> | Promedio de los halos de inhibición del crecimiento microbiano producidos por la actividad individual y conjunta de las bacteriocinas presentes en los SLCN de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23, <i>L. brevis</i> L52, <i>L. plantarum</i> L54, <i>L. plantarum</i> L57 y <i>L. rhamnosus</i> L60 sobre <i>Escherichia coli</i> productoras de toxinas Shiga | 38 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| <b>Tabla 1</b> | Identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i>   | 1  |
| <b>Tabla 2</b> | Características de los grupos de <i>Escherichia coli</i> productoras de diarrea  | 3  |
| <b>Tabla 3</b> | Serotipos y toxinas producidas por las cepas de <i>Escherichia coli</i>  | 15 |
| <b>Tabla 4</b> | Pruebas bioquímicas para identificar <i>Escherichia coli</i>   | 26 |
| <b>Tabla 5</b> | Actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23, <i>L. brevis</i> L52, <i>L. plantarum</i> L54, <i>L. plantarum</i> L57 y <i>L. rhamnosus</i> L60 sobre cepas de <i>Escherichia coli</i>  | 28 |
| <b>Tabla 6</b> | Actividad antimicrobiana de las interacciones entre los metabolitos antimicrobianos producidos por <i>Lactobacillus fermentum</i> L23, <i>L. brevis</i> L52, <i>L. plantarum</i> L54, <i>L. plantarum</i> L57 y <i>L. rhamnosus</i> L60 sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> . | 30 |
| <b>Tabla 7</b> | Actividad antimicrobiana de los SLC y SLCN de <i>Lactobacillus fermentum</i> L23, <i>L. brevis</i> L52, <i>L. plantarum</i> L54, <i>L. plantarum</i> L57 y <i>L. rhamnosus</i> L60 sobre <i>Escherichia coli</i> O157 y no-O157  | 32 |
| <b>Tabla 8</b> | Actividad antimicrobiana de las diferentes combinaciones entre los SLCN de <i>Lactobacillus</i> spp. sobre <i>Escherichia coli</i>   | 36 |

# *Resumen*

---

## RESUMEN

Las cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) comprenden un subgrupo de microorganismos patógenos causantes de síndrome urémico hemolítico (SUH). *E. coli* O157:H7 corresponde al serotipo más frecuentemente aislado en casos de SUH, sin embargo existen otros serotipos que también son capaces de causar esta enfermedad. El SUH es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños de temprana edad y la segunda de insuficiencia renal crónica. Varios estudios realizados permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio de ECEH. El consumo de carne vacuna insuficientemente cocida es la vía más común de transmisión. Sin embargo, no son los únicos vehículos que se encuentran involucrados en la diseminación, ya que se ha demostrado también que puede deberse al consumo de vegetales crudos, leche y jugos no pasteurizados, aguas contaminadas, entre otros. Actualmente, los lactobacilos representan una alternativa para el biocontrol de estos microorganismos patógenos debido a su capacidad de producir una variedad de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. El objetivo de este trabajo fue determinar “*in vitro*” la actividad antimicrobiana de cinco cepas diferentes de lactobacilos identificadas como *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 sobre cepas de *E. coli* O157:H7 y no-O157:H7. Se evaluó de manera preliminar la actividad inhibitoria del conjunto de metabolitos bioactivos producidos y liberados al medio por cada cepa de lactobacilo actuando individualmente, obteniéndose los siguientes valores promedio en los halos de inhibición del crecimiento: 19,60 mm (L23), 22,95 mm (L52), 24,10 mm (L54), 25,20 mm (L57) y 22,60 mm (L60). Para determinar el tipo de interacción producida entre los compuestos antimicrobianos sintetizados por las cepas de lactobacilos, se utilizó la técnica de estrías perpendiculares. Fueron ensayadas diez combinaciones entre las distintas cepas de *Lactobacillus* spp. (L54–L60, L23–L57, L60–L23, L52–L57, L52–L60, L52–L54, L52–L23, L54–L57, L54–L23, y L60–L57), observándose que en el 100% de los casos el efecto producido fue del tipo sinérgico. Se evaluó y cuantificó la actividad inhibitoria de los sobrenadantes libre de células puros (SLC) y los sobrenadantes neutralizados (SLCN), mediante la técnica de difusión en pozos. Los resultados mostraron que las bacteriocinas producidas por las cepas de lactobacilos fueron responsables del 67 al 74,75% de la actividad antimicrobiana. Estos metabolitos produjeron halos de inhibición del crecimiento promedio sobre ECEH de 25,54 mm; 23,60 mm; 25,44 mm; 26 mm y 25,93 mm, para las cepas L23, L52, L54, L57 y L60, respectivamente. Finalmente, por la técnica de difusión en pozos próximos se evaluaron las interacciones producidas entre

las bacteriocinas presentes en los SLCN de dos cepas de lactobacilos. Los resultados obtenidos mostraron que todas las combinaciones entre los distintos SLCN de las cepas de *Lactobacillus* spp. utilizadas, actuaron de manera sinérgica sobre las cepas de *E. coli* O157 y no-O157. En conclusión, el presente trabajo destaca el potencial de las cepas *L. fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 con propiedades probióticas, para ser utilizadas como agentes biocontroladores de *E. coli* productora de toxina Shiga.

# *Introducción*

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Características generales de *Escherichia coli*

Las bacterias del género *Escherichia* se caracterizan por ser bacilos Gram negativos de tamaño variable (1,1 – 1,5 µm de diámetro y 2,0 – 6,0 µm de largo), oxidasa negativa, catalasa positiva y reductoras de nitrato. Son anaerobias facultativas y poseen un metabolismo predominantemente fermentativo aunque también pueden realizar metabolismo oxidativo. Desarrollan preferentemente a una temperatura de 37°C (con un rango de 15 – 45°C). Son móviles por flagelos peritricos y no forman esporas. De las cinco especies que conforman el género, *E. coli* es la más importante en relación a salud humana y animal. Esta especie fermenta la lactosa y es capaz de producir indol a partir del triptófano (Scheutz y Strockbine, 2015). Otras pruebas bioquímicas que colaboran en la identificación de especie se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1:** Identificación bioquímica de *Escherichia coli*

| Prueba bioquímica              | % positividad | Prueba bioquímica                   | % positividad |
|--------------------------------|---------------|-------------------------------------|---------------|
| Oxidasa                        | 0             | Fermentación de inositol            | 1             |
| Producción de indol            | 98            | Fermentación de D-sorbitol          | 94            |
| Rojo de metilo                 | 99            | Fermentación de L-arabinosa         | 99            |
| Voges-Proskauer                | 0             | Fermentación de la rafinosa         | 50            |
| Citrato (Simmons)              | 1             | Fermentación de L-ramnosa           | 80            |
| SH <sub>2</sub> (TSI)          | 1             | Fermentación de maltosa             | 95            |
| Hidrólisis de urea             | 1             | Fermentación de D-xilosa            | 95            |
| Fenilalanina desaminasa        | 0             | Fermentación de trealosa            | 98            |
| Lisina descarboxilasa          | 90            | Fermentación de celobiosa           | 2             |
| Arginina dihidrolasa           | 17            | ONPG                                | 95            |
| Ornitina descarboxilasa        | 65            | Fermentación de tritritol           | 0             |
| Movilidad                      | 95            | Hidrólisis de la esculina           | 35            |
| Hidrólisis de gelatina (22 °C) | 0             | Fermentación de melobiosa           | 75            |
| Crecimiento en KCN             | 3             | Fermentación de D-arabitol          | 5             |
| Utilización de malonato        | 0             | Fermentación de glicerol            | 75            |
| D – glucosa, ácido             | 100           | Fermentación de mucato              | 95            |
| D –glucosa, gas                | 95            | Fermentación de D-manosa            | 98            |
| Fermentación de lactosa        | 95            | Reducción del Nitrato               | 100           |
| Fermentación de la sacarosa    | 0             | Tartrato de Jordán                  | 95            |
| Fermentación de D-manitol      | 98            | Utilización de Acetato              | 90            |
| Fermentación de dulcitol       | 60            | Lipasa                              | 0             |
| Fermentación de salicina       | 40            | DNasa a 25 °C                       | 0             |
| Fermentación de adonitol       | 5             | Fermentación de α-metil-D-glucósido | 0             |

Scheutz y Strockbine, 2015

Esta bacteria puede recuperarse fácilmente en medios generales. El uso de medios selectivos y diferenciales como MacConkey y EMB colabora con el aislamiento de estos microorganismos entéricos. En base a la utilización de la lactosa se pueden diferenciar las colonias, observándose rojizas – rosadas en MacConkey y de color violeta oscuro en el medio EMB (Tille, 2014).

La subdivisión de *E. coli* basada en el esquema de Kauffman y LeJeune (2011) es muy utilizada para identificar serotipos dentro de la especie, los cuales difieren en patogenicidad y virulencia. Esta clasificación se basa en la serotificación de los antígenos somáticos “O”, flagelares “H” y capsulares “K”. El antígeno “O” es el responsable del serogrupo, mientras que la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo. El serotipado es informativo para ciertos tipos patogénicos, aunque no siempre es útil debido a que algunas cepas no son tipificables o tienen reactividad cruzada entre antígenos (Ahmad y col., 2011).

La gran mayoría de las cepas de *E. coli* son habitantes normales del tracto gastrointestinal de humanos y animales. Colonizan el intestino del hombre pocas horas después de su nacimiento, siendo capaces de coexistir con el huésped sin producir enfermedad. Pero también existen cepas patógenas que pueden ser capaces de producir problemas en la salud. Las infecciones generadas pueden estar limitadas a la superficie de la mucosa o diseminarse a través del cuerpo. Es por ello que se distinguen dos grandes grupos de *E. coli* patógenas según el tipo de infección que producen. El primero está constituido por cepas patógenas intestinales, responsables de un elevado número de cuadros diarreicos, mientras que el segundo está integrado por aquellas cepas productoras de infecciones extraintestinales (tracto urinario, sepsis y meningitis neonatal) (Scheutz y Strockbine, 2015; Gomes y col., 2016).

## **1.2 *Escherichia coli* productoras de diarrea**

Las diferentes cepas de *E. coli* causantes de diarrea se han agrupado en cinco categorías: *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteropatógena (ECEP) y *E. coli* enteroagregativa (ECEA). Algunos autores consideran una sexta categoría llamada *E. coli* de adherencia difusa (ECAD), aunque es poco clara la patogenia de esta última (Croxen y col., 2013; Scheutz y Strockbine, 2015; Gomes y col., 2016). Las principales características de cada una se describen brevemente en la tabla 2.

**Tabla 2:** Características de los grupos de *Escherichia coli* productoras de diarrea

| Grupo       | Síntomas clínicos   | Epidemiología  | Serogrupos y serotipos más comunes   |
|-------------|---|--|--|
| <b>ECEH</b> | Síndrome urémico hemolítico (SUH), colitis hemorrágica (CH), diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómitos | Niños menores a 5 años, ancianos y personas inmunodeprimidas | O157:H7, O26, O91, O103, O111, O113, O118 O119, O145                                   |
| <b>ECET</b> | Diarrea aguda acuosa sin sangre, ni mucus   | Niños menores a 2 años y diarrea del viajero                 | O6, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128, O139, O148, O153, O159, O167        |
| <b>ECEI</b> | Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, cuadro disentérico, fiebre elevada                                    | Niños mayores a 2 años                                       | O28, O29, O112, O115, O121, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159, O164, O167, O173 |
| <b>ECEP</b> | Diarrea aguda con moco pero sin sangre, dolor abdominal, vómito, fiebre baja                                      | Niños menores a 6 meses hasta 2 años                         | O26, O55, O86, O88, O103, O111, O114, O119, O127, O128, O142, O145                     |
| <b>ECEA</b> | Diarrea líquida verde con moco, sin sangre, persistente   | Recién nacidos y niños menores a 2 años                      | O3, O15, O44, O86, O111, O125  |
| <b>ECAD</b> | Diarrea acuosa sin sangre   | Niños de 1 a 5 años  | O126   |

Scheutz y Strockbine, 2015

De todas las *E. coli* mencionadas, las cepas productoras de toxinas Shiga o verotoxinas son de interés en el presente trabajo. Las mismas se denominan con los términos de ECTS/ECVT. Otra denominación para estas bacterias corresponde a STEC o VTEC, de las siglas en inglés “Shiga toxin – producing *E. coli*” y “Verotoxin – producing *E. coli*”, respectivamente. Estos son términos equivalentes, ambos refieren a las cepas de *E. coli* que producen toxinas de la familia Stx similares a las sintetizadas por *Shigella dysenteriae*. Éstas consisten en citotoxinas que se producen en el lumen del intestino, para luego atravesar la pared intestinal hacia los órganos diana (riñones y cerebro), generando la muerte de las células endoteliales microvasculares de tales órganos

(Cordonnier y col., 2016). ECTS puede portar una sola variante (stx1 o stx2), ambas (stx1 y stx2) o una combinación de subtipos stx2. Tanto ECTS stx1 como stx2 pueden conducir al síndrome urémico hemolítico (SUH), sin embargo stx2 se asocia más a menudo con una enfermedad más grave, ya que tiene una actividad citotóxica superior a stx1 (Fuller y col., 2011).

El término ECEH, del cual está ampliamente estudiado el serotipo O157:H7, fue asignado a las cepas que ocasionan colitis hemorrágica y SUH, que además de sintetizar toxinas Shiga poseen otros factores de virulencia contribuyendo a la patogenicidad del microorganismo, como adhesinas, enterohemolisinas, serinas proteasas, calatasa-peroxidasa, entre otras. También poseen una resistencia intrínseca a la acidez, lo que les permite sobrevivir al pasaje por el estómago (Etcheverría y Padola, 2013).

Una gran variedad de infecciones, desde diarrea leve y casi no aparente hasta manifestaciones más graves como la colitis hemorrágica y el desarrollo de un síndrome potencialmente mortal conocido como síndrome urémico hemolítico, son causadas por ECEH (Rivas y col., 2016). La mayoría de los brotes de SUH se han atribuido a *E. coli* serotipo O157:H7, pero también esta afección puede estar asociada con frecuencia a otros serotipos no-O157 (Gould y col., 2013; Beutin y Fach, 2014; Miko y col., 2014). El potencial de los serotipos no-O157 como patógenos humanos no debe subestimarse, ya que han emergido como patógenos entéricos importantes.

La transmisión es por vía fecal-oral. Por ello, todo alimento y/o agua contaminados con heces de un animal o persona infectada se convierte en una potencial fuente de infección (Brusa y col., 2013; Saxena y col., 2015). Las cepas de ECTS O157 y no-O157 se pueden encontrar comúnmente en el intestino de varios animales, siendo el ganado bovino el principal reservorio (Jure y col., 2015). También pueden encontrarse en otros animales como ciervos, ovejas, cabras, caballos, perros, pájaros e insectos (Ferens y Hovde, 2011). El consumo de carne vacuna insuficientemente cocida es la vía más común de transmisión. Sin embargo, existen otros vehículos involucrados en la diseminación del microorganismo, como el consumo de vegetales y frutas que tuvieron contacto con agua contaminada para su riego, el consumo de leche cruda y jugos de frutas no pasteurizados, entre otras (Castillo Cuenca y col., 2011).

### 1.3 Síndrome urémico hemolítico

A lo largo de las últimas décadas, se han producido numerosos brotes de SUH alrededor de todo el mundo, principalmente en aquellos países donde existe un alto consumo de alimentos cárnicos. En Argentina, se notificaron anualmente alrededor de unos 355 casos (Boletín Integrado de Vigilancia, 2018) por lo que se considera un grave problema de Salud Pública y de notificación obligatoria en nuestro país. Como consecuencia se han desarrollado tres estrategias de vigilancia: un módulo de Vigilancia Clínica (C2), un módulo de Vigilancia por Laboratorios (SIVILA) y módulo de Unidades Centinela (UC-SUH) (Lopardo y col., 2016).

El SUH se caracteriza por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, síntomas que siguen siendo el sello distintivo de la enfermedad (Trachtman, 2013). Dentro de los grupos etarios más propensos a desarrollar SUH se encuentran los niños pequeños (< 5 años), ancianos y personas inmunodeprimidas. El período de incubación promedio es de 3 días (con un rango de 1 – 8 días). El cuadro clínico incluye un período de 1 a 2 días de vómitos, fiebre baja o ausente, dolores abdominales severos, diarrea no hemorrágica y evidencia de edema de la mucosa del colon como síntomas iniciales, seguidos por diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica durante 4 a 6 días. Muchas veces ocurre que la sintomatología clínica puede simular una gastroenteritis común.

En la mayoría de los casos la diarrea por ECTS es autolimitada. Sin embargo, aproximadamente entre un 5 al 10% de los niños infectados evolucionan a SUH. Este síndrome, constituye la principal causa de insuficiencia renal aguda en la edad pediátrica y la segunda de insuficiencia renal crónica, siendo el responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (Lopardo y col., 2016). Los pacientes afectados pueden desarrollar manifestaciones extrarrenales, como una afectación cardíaca, neurológica, respiratoria y/o pancreática (Khalid y Andreoli, 2018).

Hasta el presente no existe una terapia específica para esta enfermedad. La base del tratamiento para los pacientes con SUH es la terapia de soporte, la cual incluye el control de fluidos y electrolitos, el control de la hipertensión, uso de diálisis y transfusiones de sangre, según la función renal y el grado de anemia (Monteverde, 2014). El uso de agentes antidiarreicos que disminuyen la movilidad intestinal, está contraindicado en niños con diarreas agudas ya que se han registrado mayor número de complicaciones y prolongación de la sintomatología, debido probablemente a la retención de toxina en el colon que favorece su absorción sistémica (Nelson y col., 2011). Por otra parte, algunos autores describen que el tratamiento con ciertos antibióticos en una infección producida por *E. coli* O157:H7 aparentemente puede

incrementar el riesgo de evolución a las formas más severas de la enfermedad. Esto puede deberse a la liberación de la citotoxina luego de la lisis bacteriana o a mecanismos que incrementan la inducción y subsecuente expresión de los genes codificantes de Stx (Fernandez-Brando y col., 2011; Bielaszewska y col., 2012).

Ante la elevada incidencia de *E. coli* productora de toxina Shiga en nuestro país y el riesgo que conlleva para la salud, es que resulta de importancia el estudio de estrategias alternativas que permitan su control. En la actualidad, la prevención es la mejor manera de disminuir los cuadros clínicos relacionados a esta bacteria. El uso de lactobacilos probióticos para inhibir a las ECTS ha adquirido relevancia por su capacidad de producir numerosos metabolitos con actividad antimicrobiana que biocontrolan el desarrollo de microorganismos patógenos.

#### **1.4 Género *Lactobacillus***

El género *Lactobacillus* está compuesto por numerosas especies y subespecies. Son bacilos Gram positivos, de longitud variable, rectos o ligeramente curvados. Su morfología puede variar según el tipo de especie, estado nutricional y etapa del crecimiento, de manera que pueden observarse como coco-bacilos, bacilos gruesos cortos, bacilos delgados largos o tipo corineforme. Son inmóviles, catalasa y citocromo oxidasa negativos. Por otra parte, no reducen el nitrato, no producen indol ni SH<sub>2</sub>, no licuan la gelatina ni digieren la caseína y no forman esporas (Lasserrot Cuadrado, 2015).

Poseen un metabolismo fermentativo, en base al cual se clasifican en 3 grupos metabólicos: homofermentadores, heterofermentadores facultativos y heterofermentadores obligados (Salvetti y col., 2012). Un incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> (5 – 10%) puede estimular el crecimiento, especialmente en el aislamiento primario sobre medios sólidos (Madigan y col., 2009). Por otra parte, su desarrollo se ve favorecido bajo condiciones ligeramente ácidas a valores de pH entre 5,4 y 6,4. Son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. Las condiciones de temperaturas óptimas para el crecimiento de estos microorganismos oscilan entre los 30 y 40°C. Sin embargo, son capaces de desarrollar en un amplio rango de temperaturas que varía entre 2 y 53°C (Vos y col., 2009; Moreno Galarza, 2012).

Para su desarrollo necesitan de hidratos de carbono como fuente de carbono y energía, aminoácidos y péptidos, los cuales son provistos por el medio Man–Rogosa–Sharpe (MRS), el cual constituye el medio de elección para aislamiento de estos microorganismos (Vos y col., 2009; Arakawa y col., 2014).

Los lactobacilos han sido aislados de vegetales, carnes, bebidas, ensilados y granos. Además forman parte de la microbiota de la boca, tracto intestinal, aparato reproductor femenino humano y de muchos animales (Lewandowska, 2010; Parra Huertas, 2010; Selle y Klaenhammer, 2013; Moreno y col., 2013; Borges y col., 2014).

### **1.5 Producción de compuestos antimicrobianos por lactobacilos**

Las especies de lactobacilos son capaces de producir una gran variedad de compuestos metabólicos que se liberan al medio y ejercen una acción antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos. Entre las sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus* spp. se pueden mencionar: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, biosurfactantes y bacteriocinas.

#### **1.5.1 Ácidos orgánicos**

Los lactobacilos producen ácidos orgánicos como principales productos finales metabólicos de la fermentación de los azúcares. Ej.: ácido láctico, acético, entre otros. Las formas no disociadas o libres pueden penetrar la pared celular bacteriana, difundir a través de su membrana plasmática y dentro del citoplasma disociarse liberando protones y aniones. Es así que estos compuestos ejercen su acción antimicrobiana, reduciendo el pH interno de las células sensibles. Por otro lado, la fracción aniónica del ácido no puede difundirse libremente a través de la pared celular, por lo que se acumula dentro de la célula bacteriana, conduciendo a un desequilibrio osmótico interno (Kotikalapudi, 2009; Vásquez y col., 2009; Šušcović y col., 2010).

#### **1.5.2 Peróxido de hidrógeno**

Algunos lactobacilos son capaces de producir peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y liberarlo al medio. Su acción bactericida se atribuye a su efecto altamente oxidante, lo que le confiere actividad antimicrobiana no específica que afecta tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas. Esta sustancia ingresa a la célula susceptible por difusión pasiva, donde forma radicales hidroxilo libres altamente reactivos y tóxicos. Éstos producen la oxidación de grupos sulfhidrilo causando modificaciones en la estructura molecular de las proteínas, daño en las moléculas de ADN, como así también afectan los lípidos de la membrana citoplasmática (Dicks y Botes, 2010; Selle y Klaenhammer, 2013).

### 1.5.3 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son un grupo de moléculas tensoactivas, que modifican la hidrofobicidad de las superficies. Se trata de moléculas anfipáticas, es decir, poseen una región hidrofóbica compuesta por ácidos grasos saturados o insaturados y otra hidrofílica comprendida por aminoácidos, péptidos, disacáridos o polisacáridos (Inès y Dhouha, 2015). Actúan como agente antibiofilm, reduciendo la capacidad de adherencia de microorganismos patógenos a las células epiteliales del tracto intestinal (Sharma y Saharan, 2014; Sharma y col., 2016; Satpute y col., 2016).

### 1.5.3 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, etc. Su espectro de acción abarca tanto especies relacionadas como no relacionadas filogenéticamente, presentando actividad bactericida o bacteriostática frente a microorganismos sensibles (Zacharof y Lovitt, 2012; Ruiz y col., 2015; Lagha y col., 2017). Esto constituye una ventaja adaptativa para los microorganismos, debido a que les permite competir por un nicho ecológico (Ramu y col., 2015).

Las bacteriocinas presentan diferentes modos de acción para ejercer su efecto antimicrobiano sobre otros microorganismos. Entre los principales mecanismos de acción se incluyen la formación de poros en la membrana celular (lo que conduce a la pérdida de contenido celular como iones, ATP, aminoácidos, entre otras moléculas), inhibición de la síntesis de la pared celular, la lisis celular y otros mecanismos que afectan la actividad de enzimas involucradas en la expresión génica y síntesis proteica (Cotter y col., 2013).

Según la estructura primaria, peso molecular, estabilidad al calor y organización molecular, se clasifican a las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram positivas en cuatro clases (Heng y col., 2007):

► Clase I o lantibióticos: son péptidos pequeños (<5 kDa), termolábiles y activos a nivel de membrana. Contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina y dihidroalanina. Su formación se debe a modificaciones posteriores al proceso de traducción. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, se subdividen en 3 grupos. El grupo IA son lantibióticos con estructura lineal, cargados positivamente, que generalmente producen un efecto inhibitorio al inducir la formación de poros en las membranas de las bacterias sensibles (ej. nisina). Los del subgrupo IB

poseen un peso molecular menor (2kDa), son de forma globular y su mecanismo de acción se debe a una interferencia en el proceso de biosíntesis de pared celular (ej. mersacidina). En una nueva categoría, la clase IC, están incluidos aquellos lantibióticos que presentan más de una molécula.

► Clase II: no lantibióticos. Incluye bacteriocinas lineales de bajo peso molecular (<10 kDa), estables al calor y pH, no modificadas postraduccionalmente y con una estructura anfifílica helicoidal que le permite actuar a nivel de la membrana plasmática. Esta clase está dividida en tres subgrupos. La clase IIa corresponde a moléculas pequeñas que tienen un solo componente y se caracterizan por la presencia de un N-terminal conservado (ej. pediocina PA-1). La clase IIb presenta bacteriocinas formadas por dos péptidos y la actividad antimicrobiana requiere de la presencia de ambos en proporciones similares. Son formadoras de poros en la membrana celular (la sakacina es la bacteriocina más representativa de este grupo). Mientras que el tipo IIc abarca aquellas bacteriocinas de la clase II cuyas características impide clasificarlas en alguno de las categorías anteriores (Beristain Bauza y col., 2012; Londoño y col., 2015).

► Clase III: son bacteriocinas de alto peso molecular (>10kDa) y termolábiles. Éstas se subdividen en dos tipos. El tipo IIIa o bacteriolisinas, (ej. enterolisina A, zoocina A, millericina B) pertenecen a la familia de endopeptidasas que escinden las uniones interpeptídicas de la pared de bacterias Gram positivas, causando la lisis de los microorganismos sensibles. A diferencia de las bacteriolisinas, las de tipo IIIb presentan un modo de acción que no implica la lisis de la célula blanco. Actúan inhibiendo el transporte de carbohidratos, interfieren con la permeabilidad de la membrana plasmática e inhiben la biosíntesis de ADN y proteínas (Khan y col., 2013).

► Clase IV: compuesta por bacteriocinas pequeñas (<8 kDa) y cíclicas. Sufren modificaciones postraduccionales, de tal manera que el extremo N-terminal queda unido covalentemente al extremo C-terminal. Su estructura circular les confiere resistencia a la degradación proteolítica, la desnaturalización debida a altas temperaturas y resistencia a diferentes valores de pH. Se dividen en dos subgrupos basados en las características bioquímicas y en la similitud de su secuencia. Las del subgrupo I (ej. enterocina AS-48, circularina A, uberolisina, lactociclina Q, carnociclina A y garvicina ML) se caracterizan por ser catiónicas y presentar un elevado punto isoeléctrico (~10). Mientras que en el subgrupo II (ej. gassericina A, butirivibriocina AR10 y acidocina B), se encuentran aquellas bacteriocinas circulares que presentan mayor número de aminoácidos ácidos y su punto isoeléctrico es menor (~7 o inferior) (van Belkum y col., 2011; Gabrielsen y col., 2014; Acedo y col., 2015).

La clasificación realizada por Heng y col. (2007), sirvió de base para que diversos investigadores realicen nuevas categorizaciones, para lograr incorporar a las nuevas bacteriocinas que han sido descritas recientemente. Alvarez Sieiro y col. (2016) proponen la división de estos metabolitos antimicrobianos en 3 clases. La clase I abarca bacteriocinas que se someten a modificación enzimática durante la biosíntesis (modificaciones postraduccionales). Ésta incluye a los lantibióticos, bacteriocinas cíclicas, sactibióticos, bacteriocinas lineales y las glicocinas. La clase II comprende bacteriocinas que no sufren modificaciones, como bacteriocinas de un componente similares a pediocina, aquellas que presentan dos componentes, bacteriocinas que carecen de un péptido líder y aquellas de un componente que difieren de pediocina. Por último, la clase III, que incluye bacteriocinas con un elevado peso molecular.

De todos los metabolitos sintetizados por los lactobacilos, las bacteriocinas se caracterizan por su elevada acción antimicrobiana (Balciunas y col., 2013), además de presentar numerosas ventajas como agentes de biopreservación en la industria alimentaria (Güllüce y col., 2013; Bali y col., 2016; Pérez y col., 2014; Ramu y col., 2015). Las mismas se detallan a continuación:

- ▶ No resultan tóxicas para los humanos.
- ▶ Eficaces a bajas concentraciones.
- ▶ Son activas bajo almacenamiento refrigerado.
- ▶ Debido a su naturaleza proteica, pueden ser inactivadas por proteasas durante su paso por el tracto gastrointestinal, resultando presuntivamente inocuas para el consumidor.
- ▶ No presentan resistencia cruzada con antibióticos.
- ▶ Poseen amplia actividad antimicrobiana respecto del espectro de acción de las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram negativas.
- ▶ Aquellas bacteriocinas con bajo peso molecular (< a 5 kDa) presentan alta termorresistencia, lo cual les permite mantener su actividad después de tratamientos térmicos.
- ▶ No alteran las propiedades nutricionales ni organolépticas del alimento (son incoloras, inodoras e insípidas).

## **1.6 Empleo biotecnológico de los lactobacilos**

### **1.6.1 *Lactobacillus* spp. como probióticos**

Según la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) y OMS (Organización Mundial de la Salud), el término “probióticos” se utiliza para designar a aquellos microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador (FAO/WHO., 2006).

Son variados los géneros de bacterias que pueden ser utilizados como probióticos. Sin embargo, las bacterias ácido lácticas (BAL) son aquellas de mayor interés, siendo las especies del género *Lactobacillus* aquellas más ampliamente utilizadas en productos y suplementos alimenticios (Ramírez Ramírez y col., 2011; Lievin-Le Moal, 2016). Varios estudios demuestran que la incorporación de estas bacterias en la alimentación ayuda a controlar la colonización y/o desarrollo de diversos microorganismos patógenos, además de producir otros efectos benéficos sobre la salud del huésped, razón por la cual han ganado una gran importancia (Azad y col., 2018; Zhang y col., 2018).

Los mecanismos por los cuales estas bacterias ejercen efectos benéficos sobre la salud del huésped no se encuentran completamente dilucidados. Sin embargo, numerosos autores han descrito la inhibición de microorganismos patógenos, ya sea a través de la producción de sustancias antimicrobianas, la exclusión competitiva, la modulación de la respuesta inmune del hospedador o ejerciendo un efecto barrera (Bermúdez Brito y col., 2012; Ketchagia y col., 2013). Entre los beneficios asociados al uso de microorganismos probióticos se incluyen: reducción de los síntomas en enfermedades genitourinarias y gastrointestinales, mantenimiento de la microbiota intestinal, disminución de alergias, prevención de cáncer colorrectal, reducción del colesterol en sangre, aumento de la digestibilidad de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, mejora de la intolerancia a la lactosa, prevención de enfermedades agudas del tracto respiratorio superior, otitis media, rinitis y asma, entre muchas otras (Pascual y col., 2010; Rabot y col., 2010; Niittynen y col., 2012; Homayouni y col., 2014; Zhong y col., 2014; Martinez y col., 2015; Di Cerbo y col., 2016).

### **1.6.2 Lactobacilos en la biopreservación de alimentos**

La seguridad alimentaria constituye una gran preocupación en la salud pública debido a los crecientes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Si bien existen numerosas medidas de control dentro de la industria alimenticia para prevenir o minimizar la contaminación bacteriana (buenas prácticas de manufactura, medidas higiénicas con respecto a las materias primas, la planta productora de alimentos, los productos alimenticios y el personal), parece que no son suficientes para garantizar inocuidad. Se ha observado que ocurre lo mismo con la aplicación de diferentes tecnologías de procesamiento, como la refrigeración, pasteurización y la utilización de conservantes químicos (Ahmadova y col., 2013; Woraprayote y col., 2016). Debido a esto, resultaría de gran importancia proporcionar nuevas estrategias de preservación que ayuden a prevenir el desarrollo de bacterias patógenas y alteradoras, especialmente en situaciones donde la contaminación podría ocurrir después de la producción.

La biopreservación corresponde a una tecnología alternativa para la conservación de alimentos. La misma emplea el potencial antimicrobiano de los microorganismos y/o sus metabolitos en los alimentos para extender la vida útil y mejorar la calidad higiénica, minimizando el impacto en las propiedades nutricionales y organolépticas de los productos alimenticios (García y col., 2010; Singh, 2018). Muchas especies de lactobacilos son capaces de producir metabolitos bioactivos como son las bacteriocinas, sustancias que cumplen un importante papel en los procesos de bioconservación en la industria alimentaria (Bali y col., 2016; Singh, 2018). Las mismas pueden ser aplicadas en los alimentos de diferentes maneras (Woraprayote y col., 2016): por inoculación directa de BAL productoras de bacteriocinas al alimento, adición directa de las bacteriocinas como aditivo alimentario en aquellos alimentos donde las BAL no son capaces de producirlas, o incorporación de bacteriocinas en los envases. Hasta el momento sólo dos bacteriocinas, nisina y pediocina, son utilizadas como conservantes en la industria alimentaria a pesar de que se ha descubierto una amplia variedad de bacteriocinas en las últimas décadas (Silva y col., 2018). La nisina es utilizada para la preservación de alimentos como leche y derivados, bebidas fermentadas y carnes. Cuando se aplica en alimentos con pH neutro, se ha visto que su actividad antimicrobiana disminuye (Ramu y col., 2015; Woraprayote y col., 2016). Por su parte, la pediocina no se encuentra oficialmente aprobada por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) para su uso comercial.

# *Hipótesis y Objetivos*

---

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótesis**

Las sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas presentan diferentes interacciones.

### **2.2 Objetivo general**

Estudiar las diferentes interacciones producidas por los metabolitos secundarios liberados por cepas de lactobacilos probióticos sobre *Escherichia coli*.

### **2.3 Objetivos específicos**

- ◆ Determinar el tipo de interacciones entre los metabolitos antimicrobianos presentes en el sobrenadante libre de células de distintas especies de lactobacilos probióticos.
  
- ◆ Evaluar las interacciones entre bacteriocinas producidas por distintas especies de lactobacilos.
  
- ◆ Realizar semicuantificación de la interacción hallada con las distintas especies de lactobacilos.
  
- ◆ Analizar los resultados estadísticamente.

# *Materialles y Métodos*

---

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Cepas utilizadas en este estudio**

##### **3.1.1 Cepas de *Lactobacillus***

En el presente estudio se emplearon cinco cepas de lactobacilos. *Lactobacillus fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60, aisladas de humanos, fueron identificadas mediante las pruebas bioquímicas recomendadas por el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Vos y col., 2009) y el sistema API 50 CH (BioMérieux Inc., Francia). Esta identificación fue confirmada a través del análisis de las secuencias de ADNr 16S, las cuales fueron registradas en el Gen Bank bajo la numeración EF495247 y GQ455406, respectivamente. Ambas cepas, han sido extensivamente estudiadas por el grupo de investigación de Bacteriología por sus propiedades probióticas y capacidad de producir sustancias con actividad antimicrobiana. *L. fermentum* L23 produce ácidos orgánicos y una bacteriocina L23, mientras que la cepa *L. rhamnosus* L60 sintetiza ácidos orgánicos, bacteriocina L60 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pascual y col., 2008a,b).

Las cepas *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54 y *L. plantarum* L57, aisladas a partir de residuos de cervecería, fueron identificadas por pruebas bioquímicas y caracterizadas por sus propiedades probióticas. Las tres cepas de lactobacilos fueron capaces de sintetizar sustancias del tipo bacteriocinas, además de los ácidos orgánicos característicos de este género (Asurmendi y col., 2015).

Las cinco cepas de *Lactobacillus* spp. que se encontraban en el cepario a -20°C, fueron sembradas en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) e incubadas a una temperatura de 37°C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, para su aislamiento en placa se utilizó agar MRS (Britania®). Se les realizó tinción de Gram a las colonias aisladas.

Los cultivos de las cepas L23, L52, L54, L57 y L60 fueron conservadas en freezer a -20°C con el agregado de glicerol (30%) como crioprotector.

### 3.1.2 Cepas de *Escherichia coli*

Se trabajó con diferentes cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (n=5), aisladas a partir de alimentos (industria cárnica), animales y del medio ambiente. Las mismas fueron identificadas por pruebas bioquímicas y la producción de enterotoxinas fue caracterizada molecularmente (tabla 3).

**Tabla 3.** Serotipos y toxinas producidas por las cepas de *Escherichia coli*

| Cepas de <i>E. coli</i> | Serotipo   | Toxina |
|-------------------------|------------|--------|
| LAMA 641                | O174:H21   | stx1/2 |
| LAMA 649                | O157:H7    | stx2   |
| LAMA 651                | 08/060:H19 | stx1/2 |
| LAMA 682                | O157:H7    | stx2   |
| LAMA 684                | O157:H7    | stx2   |

Las cepas de *E. coli* conservadas a -20°C fueron sembradas en caldo tripticasa soya (CTS) (Britania®) e incubadas en condiciones de aerobiosis a 37°C durante 24 h. Luego, se las aisló en agar tripticasa soya (ATS), bajo las mismas condiciones de incubación descriptas anteriormente. A las colonias aisladas, se les realizó coloración de Gram.

Para la conservación de las cepas, las mismas fueron sembradas en CTS e incubadas a 37°C durante 24 h en aerobiosis. Los cultivos fueron adicionados con 30% de glicerol estéril y conservados a -20°C.

#### 3.1.2.1 Pruebas bioquímicas para la confirmación de género *Escherichia*

Una serie de pruebas bioquímicas fueron realizadas para corroborar la identificación de género. Las mismas se detallan a continuación:

► **Prueba de TSI:** permite evidenciar la capacidad de las cepas de utilizar diferentes fuentes de hidratos de carbono (glucosa 0,1%, lactosa 1% y/o sacarosa 1%), como así también la producción de gas y de sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>). Una reacción ácida se evidencia por coloración amarilla, mientras que en una alcalina se observa un color rojo debido al viraje del indicador de pH.

1. La utilización de hidratos de carbono puede interpretarse de diferentes maneras:  
a) Alcalino/Ácido (utilización de la glucosa): los microorganismos provocan en este medio una reacción alcalina en la superficie (roja) sobre un fondo ácido (amarillo).

b) Ácido/Ácido (utilización de glucosa, y/o sacarosa): algunos microorganismos tienen la facultad de fermentar la glucosa, la lactosa y la sacarosa resultando una reacción ácida en la superficie (amarilla) y ácida en el fondo (amarilla).

c) Alcalino/Alcalino (sin utilización de los hidratos de carbono, solo las peptonas): esta reacción daría una superficie alcalina (rojo) sobre fondo alcalino (rojo).

2. Producción de gas: la enzima deshidrogenasa fórmica, le confiere a los microorganismos la capacidad de desdoblar el ácido fórmico en anhídrido carbónico e hidrógeno. Esto produce la formación de burbujas dentro del medio, como también un desplazamiento del mismo.

3. Producción de sulfuro de hidrógeno: se observa un precipitado negro (el cual puede estar ocultando la condición ácida del medio), producto de que algunos microorganismos son capaces de liberar azufre a partir de los diferentes aminoácidos presentes en el medio por acción de la enzima cisteinasa, con la consiguiente producción de ácido sulfhídrico. La prueba de TSI típica para *E. coli* es: tubo ácido/ácido, con producción de gas y ausencia de SH<sub>2</sub>.

► **Prueba de Citrato de Simmons:** determina si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para su metabolismo. El medio incluye citrato de sodio, como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Aquellos que utilicen el citrato también son capaces de extraer el nitrógeno de la sal de amonio, produciéndose una alcalinización del medio de cultivo por la formación de hidróxido de amonio y consiguiente cambio de color debido al indicador de pH (azul de bromotimol). *E. coli* no utiliza el citrato como fuente de carbono.

► **Prueba de rojo de metilo:** evalúa la capacidad de los microorganismos de utilizar la glucosa por la vía ácido mixta, generando como productos finales ácido acético, ácido fórmico, ácido succínico y ácido láctico. Éstos provocan un descenso en el pH del medio, el cual se detecta al añadir el revelador (rojo de metilo), que vira el medio a rojo a pH menor a 4,4 (bacterias rojo de metilo positivas) y lo mantiene de color amarillo si el pH es mayor a 5,1 (bacterias rojo de metilo negativas). El resultado de esta prueba para *E. coli* es positivo.

► **Prueba de Voges Proskauer:** se utiliza para determinar si los microorganismos utilizan la glucosa por la vía del butilenglicol, generando productos finales neutros como el butanodiol y el etanol, produciéndose etanoína como intermediario, el cual se detecta cuando se añaden al medio los reveladores KOH 40% y alfa-naftol, que reaccionan con este compuesto produciendo un color rojo (bacterias Voges Proskauer positivas). Si las bacterias no utilizan la glucosa por esta vía, el medio

permanece amarillo luego de agregar los reactivos reveladores (bacterias Voges Proskauer negativas). El resultado de esta prueba para *E. coli* es negativo.

▶ **Hidrólisis de la urea (BAM):** determina la hidrólisis de la urea por la presencia de la enzima ureasa, que libera amoníaco alcalinizando el medio con el consiguiente viraje del indicador de pH a un color azul o azulverdoso. *E. coli* no posee la enzima ureasa, de manera que el medio permanece de color verde-amarillo, sin viraje del indicador de pH.

▶ **Prueba de Indol:** es utilizada para demostrar la presencia de la enzima triptofanasa en los microorganismos, capaz de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La detección de la producción de indol es posible al agregar el reactivo de Kovacs (p-dimetilamino benzaldehído, alcohol isoamílico y HCl). Una reacción positiva se observa con la formación de un anillo o halo color fucsia en la interface del reactivo y el caldo, mientras que en un resultado negativo no se observa la formación del halo en la interface del reactivo y el caldo. El resultado de esta prueba para cepas de *E. coli* es positivo.

### **3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los lactobacilos sobre las cepas de *E. coli* O157:H7 y no-O157:H7**

La actividad antimicrobiana de las cepas de *Lactobacillus* spp. en estudio fue ensayada sobre diferentes cepas de *E. coli*. Los lactobacilos fueron sembrados en caldo MRS y se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia. Luego, sobre una placa de Petri con agar MRS se realizó una estría central utilizando un ansa en rulo cargada con el inóculo de cada cepa de *Lactobacillus* spp. y fueron incubadas en las mismas condiciones descriptas anteriormente. El crecimiento bacteriano fue inactivado con vapores de cloroformo durante 20 min y se aireó durante 10 min. Posteriormente, cada una de las suspensiones de las cepas de *E. coli* ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) fueron hisopadas por separado sobre el agar en distintas direcciones sin tocar la estría central. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones de aerobiosis. Luego del periodo de incubación se midieron los halos de inhibición del crecimiento de las cepas de *E. coli* O157:H7 y no-O157:H7.

### **3.3 Ensayos de interacción entre sustancias con actividad antimicrobiana producidas por *Lactobacillus* spp. sobre cepas de *E. coli* enterohemorrágicas**

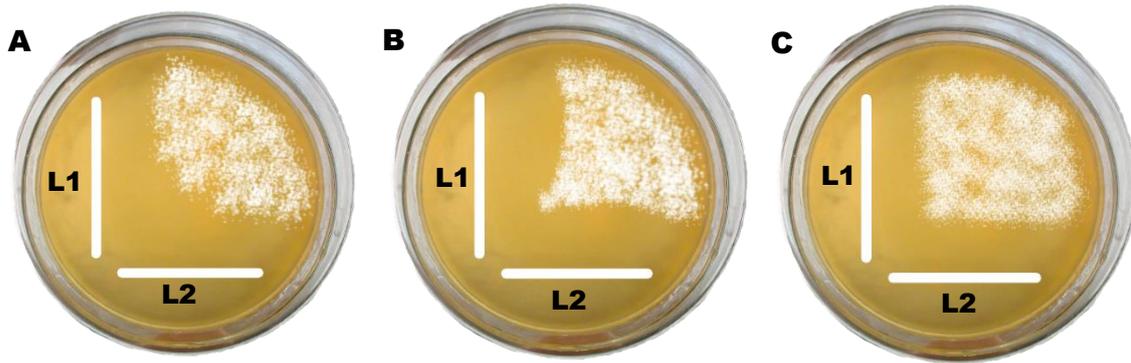
#### **3.3.1 Técnica semicuantitativa de estrías perpendiculares**

Las interacciones entre las sustancias antimicrobianas producidas por los lactobacilos sobre diferentes cepas de *E. coli* enterohemorrágicas, fueron determinadas mediante el método descrito por Asurmendi y col. (2015) y Garcia y col. (2015).

Las cepas de *L. fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60, fueron sembradas en caldo MRS a partir de colonias aisladas y se incubaron a 37°C durante 24 h en microaerofilia. A partir del cultivo de una cepa de *Lactobacillus* spp. se realizó una estría en una placa con medio MRS adicionado con agar al 1,2 % p/v. En perpendicular, fue realizada una estría correspondiente a otra cepa de lactobacilo. Las condiciones de incubación fueron las mismas a las ya descritas. Luego, el crecimiento microbiano fue inactivado durante 20 min mediante exposición a vapores de cloroformo y después aireadas por 10 min. A continuación, se hisopó una suspensión de cada *E. coli* por separado ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) en distintas direcciones dentro de la zona comprendida entre las estrías perpendiculares de los lactobacilos. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h en aerobiosis. Luego del período de incubación, se observaron los halos de inhibición del crecimiento producidos por los metabolitos antimicrobianos de los lactobacilos, con la finalidad de evaluar el tipo de interacción producida entre los mismos.

Las interacciones fueron interpretadas de la siguiente manera:

- ▶ **Sinergismo:** cuando la zona de inhibición del crecimiento bacteriano donde difunden los metabolitos de ambos lactobacilos es mayor que la zona de inhibición del crecimiento bacteriano donde actúan los mismos en forma independiente (fig. 1A).
- ▶ **Antagonismo:** cuando en el ángulo donde difunden los metabolitos de ambas cepas se observa la formación de una cuña de crecimiento bacteriano (fig. 1B).
- ▶ **Indiferencia:** cuando en el ángulo de difusión de los metabolitos, los halos de inhibición son iguales a los halos en forma independiente (fig. 1C).



**Figura 1:** Esquema de las interacciones entre los compuestos antimicrobianos producidos por cepas de *Lactobacillus* spp.

Referencias: A: Sinergismo, B: Antagonismo, C: Indiferencia, L1: cepa de lactobacilo N°1, L2: cepa de lactobacilo N°2.

### 3.3.2 Técnica cuantitativa de difusión en pozos

#### 3.3.2.1 Obtención de sobrenadante libre de células

A partir de colonias aisladas en agar MRS de cada una de las cepas de *Lactobacillus* spp., se inocularon tubos conteniendo 2 ml de caldo MRS, los cuales se incubaron durante 24 h a 37°C y con CO<sub>2</sub> al 5%. El cultivo fue transferido a otro tubo de caldo MRS con un volumen de 8 ml, incubándose bajo las mismas condiciones. Luego se centrifugaron a 8500 rpm durante 30 min a 4°C para obtener los sobrenadantes libres de células (SLC) que contienen los metabolitos con actividad inhibitoria. Luego, los sobrenadantes obtenidos fueron tratados con vapores de cloroformo durante 20 min y fraccionados en viales estériles. Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana mediada por bacteriocinas, una fracción del SLC se neutralizó (SLCN) con NaOH 1N para eliminar la acción de los ácidos orgánicos.

#### 3.3.2.2 Ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de los SLC y SLCN

La actividad inhibitoria de los SLC y SLCN de los diferentes lactobacilos sobre cepas de *E. coli* O157:H7 y no-O157:H7 fue determinada mediante el método de difusión en pozos descrito por Asurmendi y col. (2015) y Ruiz y col. (2015). A partir de una suspensión de cada cepa de *E. coli* ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) se sembró con hisopo la superficie de placas conteniendo agar MRS. Posteriormente, se realizaron pozos en el agar y los mismos fueron inoculados con 100  $\mu$ l de SLC y SLCN de cada una de las

cepas de lactobacilos. Luego de la incubación de las placas en aerobiosis durante 24 h a 37°C, se midieron los halos de inhibición del crecimiento de las cepas de *E. coli*.

### 3.3.2.3 Evaluación de la interacción entre las bacteriocinas mediante la técnica de difusión en pozos próximos

Con la finalidad de determinar el efecto producido entre las bacteriocinas presentes en los SLCN de dos cepas de lactobacilos diferentes, se empleó la técnica de difusión en pozos próximos descrita por Ruiz y col. (2015). Al igual que la metodología descrita anteriormente, una suspensión de *E. coli* ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml) fue hisopada en placas con agar MRS y fueron realizados 2 pozos próximos con la finalidad de que las bacteriocinas contenidas en los SLCN difundan en el medio e interaccionen, examinando los siguientes efectos:

- ▶ **Sinergismo:** cuando el halo de inhibición del crecimiento bacteriano formado en el área de difusión de ambas bacteriocinas, es mayor que el halo correspondiente a la acción de cada una de ellas en forma independiente (fig. 2A).
- ▶ **Antagonismo:** cuando el halo de inhibición formado en el área de difusión de ambas bacteriocinas es menor que el halo correspondiente a cada una de las bacteriocinas en forma individual (fig. 2B).
- ▶ **Indiferencia:** cuando en la zona correspondiente al área de difusión de ambas bacteriocinas, los halos de inhibición del crecimiento bacteriano permanecen del mismo tamaño a los halos de inhibición de cada una de las bacteriocinas de manera individual (fig. 2C).



**Figura 2:** Esquema de las interacciones entre las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes libres de células neutralizados de las diferentes cepas de *Lactobacillus* spp.

Referencias: A: Sinergismo, B: Antagonismo, C: Indiferencia, SLCN1: sobrenadante del lactobacilo N°1, SLCN2: sobrenadante del lactobacilo N°2.

### **3.4 Análisis estadístico**

Todos los resultados obtenidos en este trabajo fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina) (Di Rienzo y col., 2011). Se utilizó la prueba de la diferencia mínima significativa o LSD de Fisher, con un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$ .

### 3.5 Medios de cultivo

#### 3.5.1 Medios para el crecimiento de *Escherichia coli*

##### Caldo tripticasa soya (CTS) (Britania)

|                    |            |
|--------------------|------------|
| Tripteína          | 17,00 g    |
| Peptona de soya    | 3,00 g     |
| Cloruro de sodio   | 5,00 g     |
| Fosfato dipotásico | 2,50 g     |
| Glucosa            | 2,50 g     |
| Agua               | 1000,00 ml |

pH 7,3 ± 0,2

##### Agar tripticasa soya (CTS) (Britania)

|                    |            |
|--------------------|------------|
| Tripteína          | 17,00 g    |
| Peptona de soya    | 3,00 g     |
| Cloruro de sodio   | 5,00 g     |
| Fosfato dipotásico | 2,50 g     |
| Glucosa            | 2,50 g     |
| Agar               | 12,00 g    |
| Agua               | 1000,00 ml |

pH 7,3 ± 0,2

### 3.5.2 Medios para el crecimiento de *Lactobacillus* spp.

#### **Caldo Man Rogosa Sharpe (M.R.S.) (Britania)**

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Proteosa peptona N° 3 | 10,00 g    |
| Extracto de carne     | 10,00 g    |
| Extracto de levadura  | 5,00 g     |
| Glucosa               | 20,00 g    |
| Sorbitán monoleato    | 1,00 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                  | 1000,00 ml |

pH 6,5 ± 0,2

#### **Agar Man Rogosa Sharpe (M.R.S.) (Britania)**

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Proteosa peptona N° 3 | 10,00g     |
| Extracto de carne     | 10,00 g    |
| Extracto de levadura  | 5,00 g     |
| Glucosa               | 20,00 g    |
| Sorbitán monoleato    | 1,00 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                  | 12,00 g    |
| Agua                  | 1000,00 ml |

pH 6,5 ± 0,2

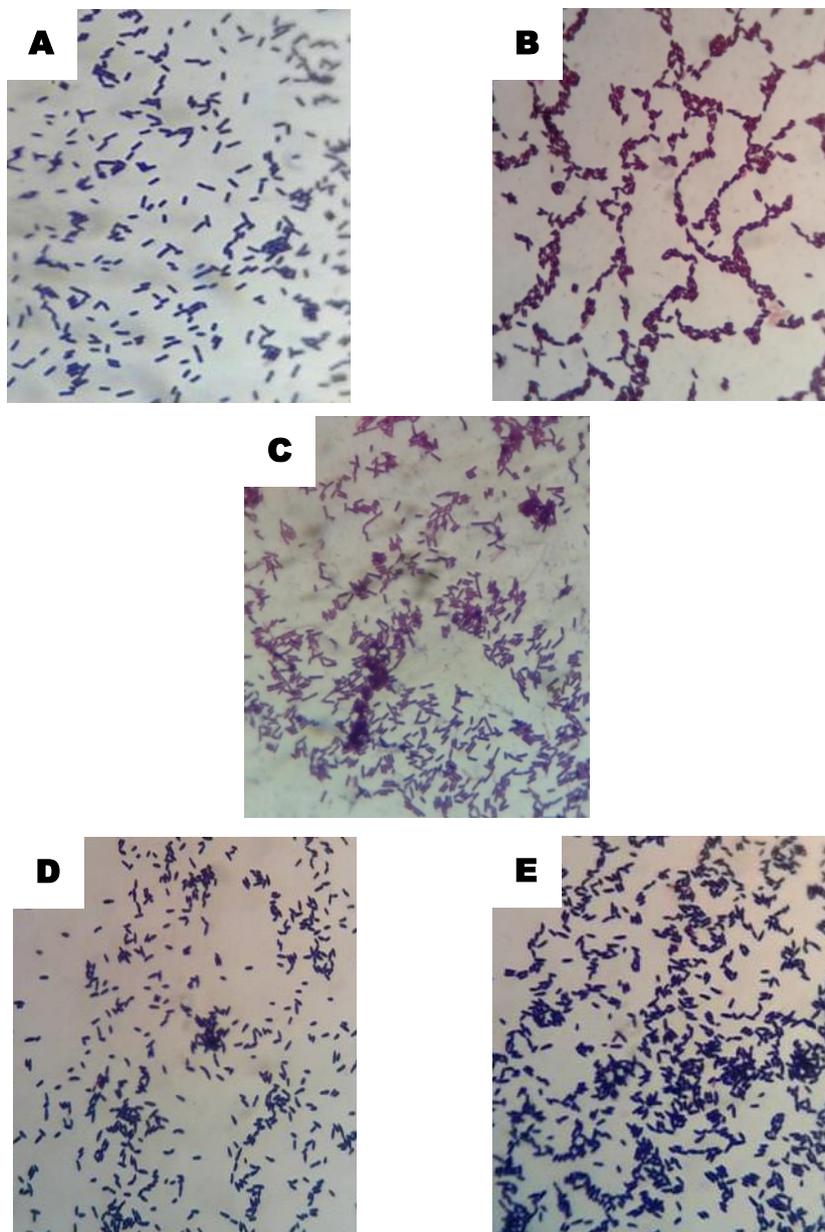
# *Resultados y Discusión*

---

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Cepas de *Lactobacillus*

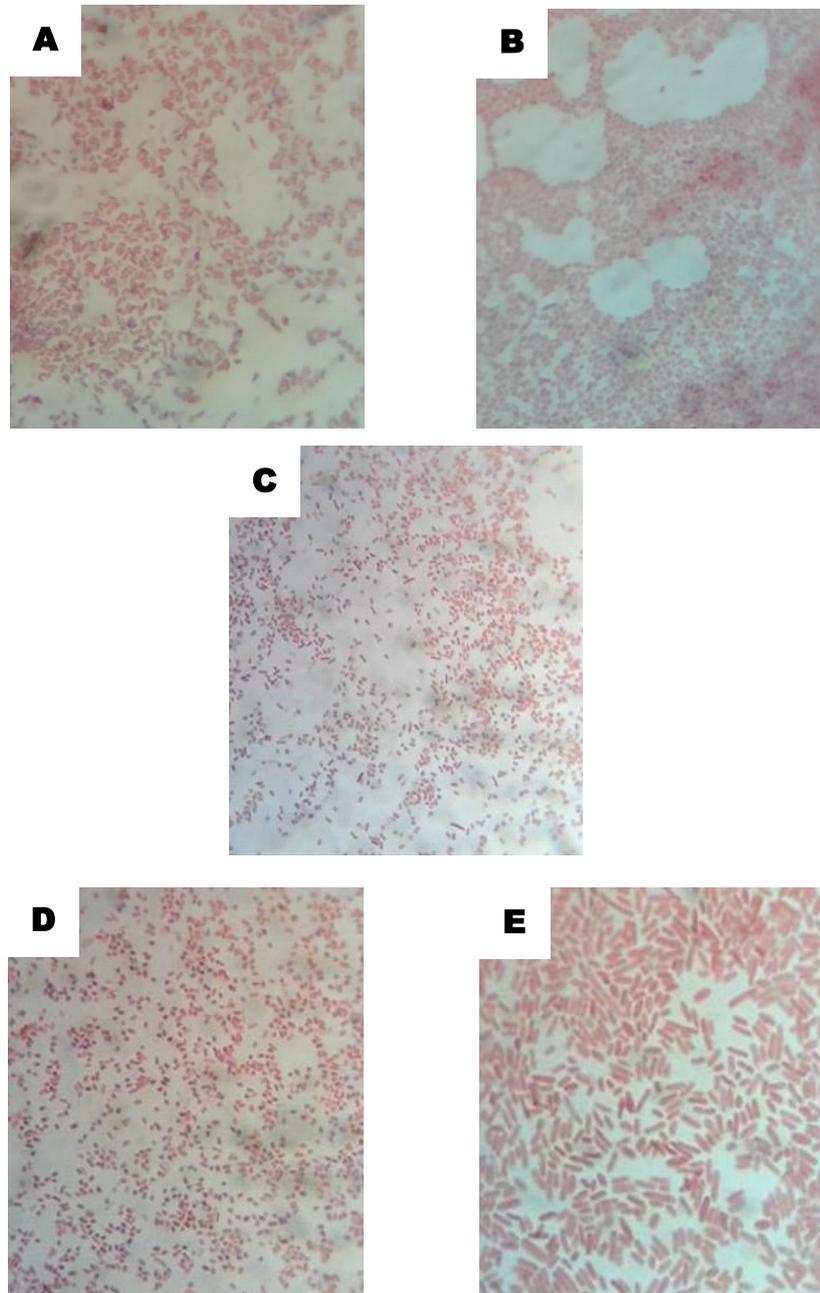
En el presente trabajo se emplearon las cepas *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60. Las mismas fueron aisladas en agar MRS, observándose colonias pequeñas circulares, convexas, de color blanco con márgenes definidos. La tinción de Gram realizada a partir de las colonias aisladas para cada cepa por separado, reveló la presencia de bacilos Gram positivos de longitudes variables correspondiente a la morfología microscópica para este género bacteriano (figura 3).



**Figura 3:** Observación microscópica (1000x) de *Lactobacillus fermentum* L23 (A), *L. brevis* L52 (B), *L. plantarum* L54 (C), *L. plantarum* L57 (D) y *L. rhamnosus* L60 (E).

#### **4.2 Cepas de *Escherichia coli***

Las cepas de *E. coli* patógenas fueron aisladas en ATS donde se observaron colonias pequeñas, blanquecinas, lisas, mucosas y de bordes definidos. Se realizó tinción de Gram a cada una de las cepas, examinándose al microscopio óptico la presencia de bacilos Gram negativos, rectos y de longitud variable (figura 4).



**Figura 4:** Observación microscópica (1000x) de *Escherichia coli* LAMA 641 (A), *E. coli* LAMA 649 (B), *E. coli* LAMA 651 (C), *E. coli* LAMA 682 (D) y *E. coli* LAMA 684 (E).

Las pruebas bioquímicas realizadas para confirmar la identificación de cada cepa se mencionan en la tabla 4. En la figura 5 puede observarse el desplazamiento de la columna de agar TSI (tubo 1) por la producción de gas de una cepa de *E. coli*, también la incapacidad de usar citrato como fuente de carbono (tubo 2), la presencia de actividad triptofanasa (tubo 3) y la carencia de ureasa en el microorganismo (tubo 4).

**Tabla 4:** Pruebas bioquímicas para identificar *Escherichia coli*.

| Pruebas bioquímicas        | Resultados                          |
|----------------------------|-------------------------------------|
| TSI (triple azúcar hierro) | Ác/Ác, SH <sub>2</sub> (-), Gas (+) |
| Citrato (Simmons)          | (-)                                 |
| Indol                      | (+)                                 |
| Hidrolisis de urea         | (-)                                 |
| Rojo de metilo             | (+)                                 |
| Voges Proskauer            | (-)                                 |



**Figura 5:** Resultados de las pruebas bioquímicas para identificar *Escherichia coli*.

Referencias: 1: TSI, 2: Citrato, 3: Indol, 4: Hidrolisis de urea.

#### **4.3 Actividad antimicrobiana producida por *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 sobre cepas de *E. coli***

La actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 fue ensayada sobre cinco cepas de *E. coli* enterohemorrágicas. En este ensayo preliminar se determinó la actividad inhibitoria del conjunto de metabolitos bioactivos producidos y liberados al medio por cada cepa de lactobacilo. En la tabla 5 se presentan los diámetros de los halos de inhibición promedio obtenidos por estos lactobacilos sobre cada cepa de *E. coli*.

Los halos de inhibición del crecimiento producidos por *L. fermentum* L23 oscilaron entre 18,5 y 20,5 mm, con un promedio de 19,6 mm. Para el caso de *L. brevis* L52, el rango estuvo comprendido entre 21 y 26,5 mm, observándose un promedio de 22,95 mm. Con respecto a *L. plantarum* L54 y L57, su rango de inhibición del crecimiento fue de 21,25 a 25,5 mm y 22,5 a 27 mm, con un promedio de 24,1 mm y 25,2 mm, respectivamente. Por último, *L. rhamnosus* L60 presentó un rango en sus halos de inhibición del crecimiento microbiano que osciló de 21,25 a 24,5 mm con un promedio de 22,6 mm.

Los resultados observados permitieron demostrar que el 100% de las cepas de lactobacilos ensayadas presentaron alta actividad antimicrobiana sobre las diferentes cepas de *E. coli*. A diferencia de otros autores (Mogna y col., 2012; Poppi y col., 2015), quienes hallaron un bajo número de cepas de lactobacilos con actividad inhibitoria sobre la bacteria patógena en estudio. Los hallazgos presentados en este trabajo difieren totalmente de los reportados por Jones y col. (2008) quienes observaron que ninguna de las BAL ensayadas inhibieron el crecimiento de las cepas de *E. coli* empleadas.

Los promedios de los halos de inhibición del crecimiento obtenidos por las cinco cepas de lactobacilos sobre las cepas de *E. coli* mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ). De acuerdo al test LSD de Fisher, *L. plantarum* L57 fue la cepa que tuvo mayor efecto inhibitorio sobre este microorganismo patógeno, mientras que la actividad antimicrobiana de *L. fermentum* L23 fue la mínima.

Al comparar las medias de los halos de inhibición para cada cepa de *E. coli* se observó que LAMA 684 (O157:H7) resultó ser la cepa más sensible a las sustancias antimicrobianas sintetizadas por los lactobacilos, con un halo de inhibición del crecimiento microbiano promedio de 24,75 mm.

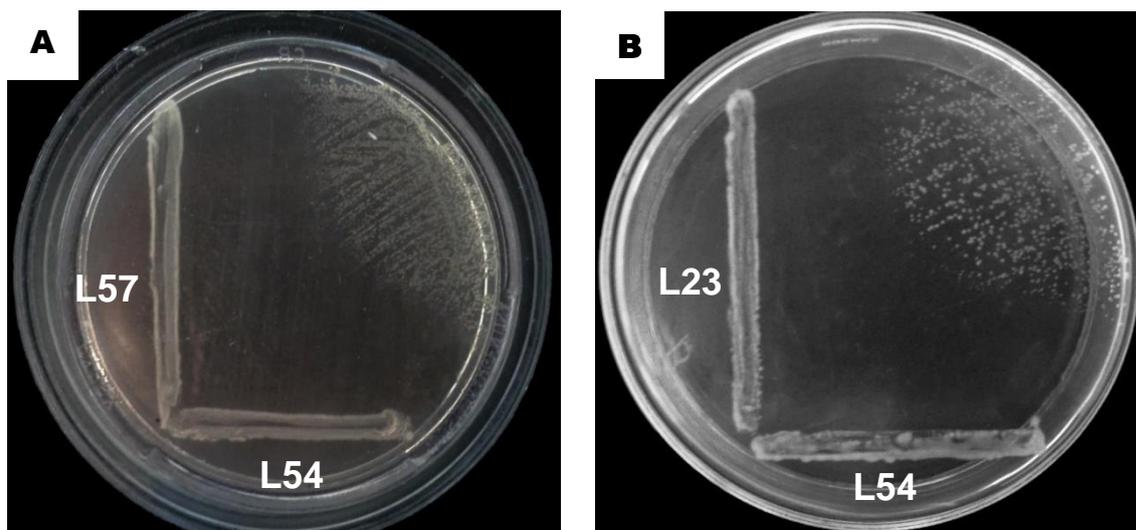
**Tabla 5:** Actividad antimicrobiana de *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 sobre cepas de *Escherichia coli*.

| Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) ± SD |                                    |                                 |                                 |                                   |                                 |                     |
|---|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Cepas de <i>E. coli</i>   | Cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. |                                 |                                 |                                   |                                 | Promedio            |
|   | L23                                | L60                             | L52                             | L54                               | L57                             |                     |
| <b>LAMA 641 (O174:H21)</b>  | 18,75 ± 2,87                       | 22,25 ± 1,26                    | 21,75 ± 1,71                    | 24,25 ± 6,65                      | 22,50 ± 0,58                    | <b>21,90 ± 2,61</b> |
| <b>LAMA 649 (O157:H7)</b>   | 20,50 ± 3,11                       | 22,50 ± 3,11                    | 21,50 ± 2,89                    | 25,25 ± 6,85                      | 25,00 ± 1,83                    | <b>22,95 ± 3,56</b> |
| <b>LAMA 651 (O8/O60:H19)</b>  | 18,50 ± 1,73                       | 22,50 ± 1,91                    | 21,00 ± 3,37                    | 21,25 ± 2,06                      | 25,25 ± 3,10                    | <b>21,70 ± 2,43</b> |
| <b>LAMA 682 (O157:H7)</b>   | 20,00 ± 2,00                       | 21,25 ± 2,50                    | 24,00 ± 5,48                    | 24,25 ± 5,32                      | 26,25 ± 4,72                    | <b>23,15 ± 4,00</b> |
| <b>LAMA 684 (O157:H7)</b>   | 20,25 ± 3,30                       | 24,50 ± 2,08                    | 26,50 ± 3,69                    | 25,50 ± 5,26                      | 27,00 ± 2,58                    | <b>24,75 ± 3,38</b> |
| <b>Promedio</b>   | <b>19,60 ± 2,60<sup>a</sup></b>    | <b>22,60 ± 2,17<sup>c</sup></b> | <b>22,95 ± 3,43<sup>b</sup></b> | <b>24,10 ± 5,23<sup>b,c</sup></b> | <b>25,20 ± 2,56<sup>c</sup></b> |                     |

Referencias: Letras distintas indican diferencias significativas entre los promedios de halos de inhibición producidos por las cepas de *Lactobacillus* spp., según el Test LSD Fisher.

#### 4.4 Estudio de las interacciones entre los compuestos antimicrobianos producidos por *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60

Con el objetivo de evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos antimicrobianos producidos por dos cepas diferentes de lactobacilos sobre *E. coli* O157:H7 y no-O157:H7, se desarrolló la técnica de estrías perpendiculares. Fueron ensayadas diez combinaciones entre las distintas cepas de *Lactobacillus* spp. (L54–L60, L23–L57, L60–L23, L52–L57, L52–L60, L52–L54, L52–L23, L54–L57, L54–L23, y L60–L57) y se observó que en el 100% de los casos el efecto producido fue del tipo sinérgico. Es importante resaltar estos hallazgos, ya que demuestran que cuando actúan en conjunto los metabolitos antimicrobianos sintetizados por cepas de lactobacilos, su actividad se incrementa significativamente respecto a su actividad inhibitoria individual. En la figura 6 se observa que la zona de inhibición del crecimiento microbiano donde difunden los metabolitos de ambos lactobacilos, fue mayor que la zona de inhibición del crecimiento donde actúan los mismos de forma independiente.



**Figura 6:** Sinergismo entre las sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus* spp. sobre diferentes cepas de *Escherichia coli*.

Referencias: A: *E. coli* O174:H21 (LAMA 641); B: *E. coli* O157:H7 (LAMA 649); L23: *L. fermentum* L23; L54: *L. plantarum* L54; L57: *L. plantarum* L57.

Mediante la presente técnica semicuantitativa se determinó el incremento en los halos de inhibición del crecimiento microbiano cuando los metabolitos actúan en conjunto respecto a su acción individual. La tabla 6 detalla estos resultados expresados a través de medidas arbitrarias donde (+) corresponde a un incremento del halo de inhibición del crecimiento menor o igual a 4 mm, (++) de 4 a 7 mm y (+++) igual o mayor a 7 mm.

**Tabla 6:** Actividad antimicrobiana de las interacciones entre los metabolitos antimicrobianos producidos por *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 sobre cepas de *Escherichia coli*.

| <b>Aumento de la actividad antimicrobiana producida por las interacciones entre los metabolitos de <i>Lactobacillus</i> spp. sobre ECEH</b> |                                |                           |                              |                           |                           |
|---|--------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Cepas de lactobacilos</b>  | <b>Cepas de <i>E. coli</i></b> |                           |                              |                           |                           |
|   | <b>LAMA 641 (O174:H21)</b>     | <b>LAMA 649 (O157:H7)</b> | <b>LAMA 651 (O8/O60:H19)</b> | <b>LAMA 682 (O157:H7)</b> | <b>LAMA 684 (O157:H7)</b> |
| <b>L54 – L60</b>  | +++                            | +++                       | +++                          | +++                       | ++                        |
| <b>L23 – L57</b>  | +++                            | ++                        | +++                          | ++                        | +++                       |
| <b>L60 – L23</b>  | ++                             | +++                       | +++                          | ++                        | +++                       |
| <b>L52 – L57</b>  | +++                            | +++                       | +                            | ++                        | ++                        |
| <b>L52 – L60</b>  | ++                             | ++                        | ++                           | +++                       | ++                        |
| <b>L52 – L54</b>  | +++                            | ++                        | ++                           | ++                        | ++                        |
| <b>L52 – L23</b>  | ++                             | +++                       | ++                           | +++                       | +++                       |
| <b>L54 – L57</b>  | +++                            | +++                       | +++                          | +                         | ++                        |
| <b>L54 – L23</b>  | ++                             | +++                       | ++                           | +++                       | +++                       |
| <b>L60 – L57</b>  | +++                            | ++                        | +                            | +++                       | +                         |

Referencias: (+) incremento en el halo de inhibición del crecimiento menor o igual a 4 mm; (++) de 4 a 7 mm; (+++) igual o superior a 7 mm.

Todas las interacciones entre las sustancias antimicrobianas producidas por los distintos lactobacilos ensayados mostraron un incremento en los halos de inhibición del crecimiento sobre *E. coli* O157 y no-O157. En el 50% de los casos, el aumento en el halo de inhibición del crecimiento sobre *E. coli* asociadas a SUH fue mayor a 7 mm, mientras que un 42% estuvo comprendido entre 4 y 7 mm. En solo un 8% de los casos el incremento fue igual o menor a 4 mm. Estos hallazgos son de relevancia debido a que en la bibliografía consultada, no hay trabajos de investigación que evalúen la interacción entre los compuestos antimicrobianos sintetizados por dos cepas de lactobacilos.

#### **4.5 Evaluación de la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7 y no-O157:H7 mediante la técnica de difusión en pozos**

La actividad antimicrobiana de los SLC y SLCN de *L. fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 fue determinada sobre cinco cepas de *E. coli* mediante la técnica de difusión en pozos.

Los resultados obtenidos mostraron que los SLC y SLCN de las cinco cepas de *Lactobacillus* spp. inhibieron el crecimiento de las cepas de *E. coli* ensayadas. Los halos de inhibición promedio se muestran en la tabla 7. El rango de los halos de inhibición del crecimiento para los SLC de *L. fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60, fueron de 21,14 – 32,5 mm, 20 – 31 mm, 22,4 – 29,5 mm, 20,57 – 32 mm y 23,14 – 32 mm, respectivamente. Mientras que los valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento fueron de 25,54 mm, 23,60 mm, 25,44 mm, 26 mm y 25,93 mm, correspondientemente. Los análisis de varianza ANOVA demostraron que no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) al comparar la actividad antimicrobiana producida por los diferentes SLC sobre las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga empleadas.

La actividad inhibitoria producida por los sobrenadantes neutralizados se mantuvo después del tratamiento. Los valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento de los SLCN de *L. fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60, fueron de 17,75 mm, 17,56 mm, 17,04 mm, 18,4 mm y 19,33 mm, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el efecto antimicrobiano producido por los SLCN sobre las cepas de *E. coli* ensayadas.

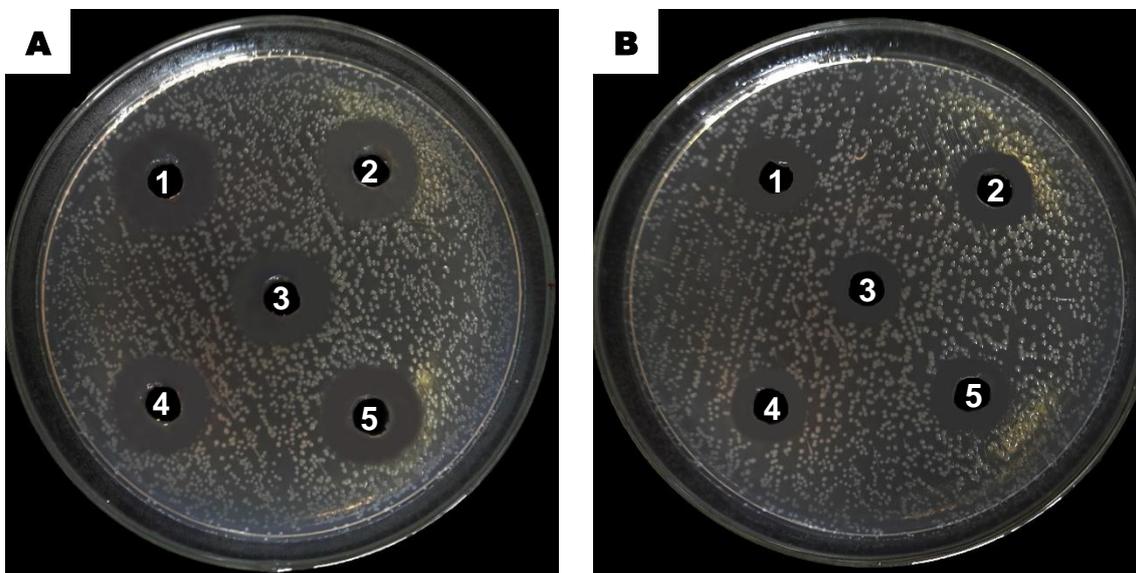
La cepa de *E. coli* LAMA 684 correspondiente al serotipo O157:H7, mostró la mayor sensibilidad a la acción de las bacteriocinas presentes en los SLCN de los diferentes lactobacilos estudiados, con halos de inhibición del crecimiento superiores a 23 mm.

**Tabla 7:** Actividad antimicrobiana de los SLC y SLCN de *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 sobre *Escherichia coli* O157 y no-O157.

| <b>Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento (mm) ± DS</b> |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |                                 |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Cepas de <i>E. coli</i>  | <i>L. fermentum</i> L23         |                                 | <i>L. rhamnosus</i> L60         |                                 | <i>L. brevis</i> L52            |                                 | <i>L. plantarum</i> L54         |                                 | <i>L. plantarum</i> L57         |                                 |
|  | SLC L23                         | SLCN L23                        | SLC L60                         | SLCN L60                        | SLC L52                         | SLCN L52                        | SLC L54                         | SLCN L54                        | SLC L57                         | SLCN L57                        |
| <b>LAMA 641 (O174:H21)</b>   | 21,14 ± 4,88                    | 16,00 ± 1,85                    | 23,14 ± 3,24                    | 17,33 ± 1,63                    | 20,00 ± 2,82                    | 15,71 ± 1,38                    | 24,67 ± 1,63                    | 15,14 ± 2,79                    | 20,57 ± 3,40                    | 15,14 ± 1,57                    |
| <b>LAMA 649 (O157:H7)</b>  | 24,33 ± 1,97                    | 16,29 ± 3,15                    | 24,33 ± 1,97                    | 18,00 ± 2,83                    | 24,80 ± 2,28                    | 17,33 ± 2,73                    | 23,67 ± 1,51                    | 16,67 ± 4,13                    | 26,00 ± 1,41                    | 19,60 ± 1,67                    |
| <b>LAMA 651 (O8/O60:H19)</b>   | 23,60 ± 2,61                    | 17,67 ± 3,20                    | 23,20 ± 3,03                    | 16,80 ± 3,63                    | 22,50 ± 3,00                    | 14,40 ± 2,61                    | 22,40 ± 3,58                    | 15,67 ± 2,66                    | 22,50 ± 3,00                    | 14,00 ± 0,00                    |
| <b>LAMA 682 (O157:H7)</b>  | 30,50 ± 1,91                    | 17,43 ± 3,21                    | 29,60 ± 3,29                    | 19,60 ± 4,77                    | 22,40 ± 2,61                    | 16,40 ± 1,67                    | 29,50 ± 3,79                    | 17,00 ± 2,58                    | 31,60 ± 2,61                    | 19,60 ± 2,97                    |
| <b>LAMA 684 (O157:H7)</b>  | 32,50 ± 1,91                    | 24,50 ± 4,12                    | 32,00 ± 1,63                    | 27,50 ± 3,79                    | 31,00 ± 3,83                    | 26,50 ± 1,00                    | 29,00 ± 2,58                    | 23,00 ± 2,00                    | 32,00 ± 2,83                    | 25,50 ± 1,91                    |
| <b>Promedio</b>  | <b>25,54 ± 2,66<sup>b</sup></b> | <b>17,75 ± 3,11<sup>a</sup></b> | <b>25,93 ± 2,63<sup>b</sup></b> | <b>19,33 ± 3,33<sup>a</sup></b> | <b>23,60 ± 2,91<sup>b</sup></b> | <b>17,56 ± 1,88<sup>a</sup></b> | <b>25,44 ± 2,62<sup>b</sup></b> | <b>17,04 ± 2,83<sup>a</sup></b> | <b>26,00 ± 2,65<sup>b</sup></b> | <b>18,40 ± 1,63<sup>a</sup></b> |

Referencias: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedio de halos de inhibición del crecimiento producidos por el SLC y el SLCN de cada cepa de *Lactobacillus* evaluada, de acuerdo al test de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

En la figura 7 se muestran los halos de inhibición del crecimiento de una cepa de *E. coli* (LAMA 651) producidos por los SLC y SLCN de *L. fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60.



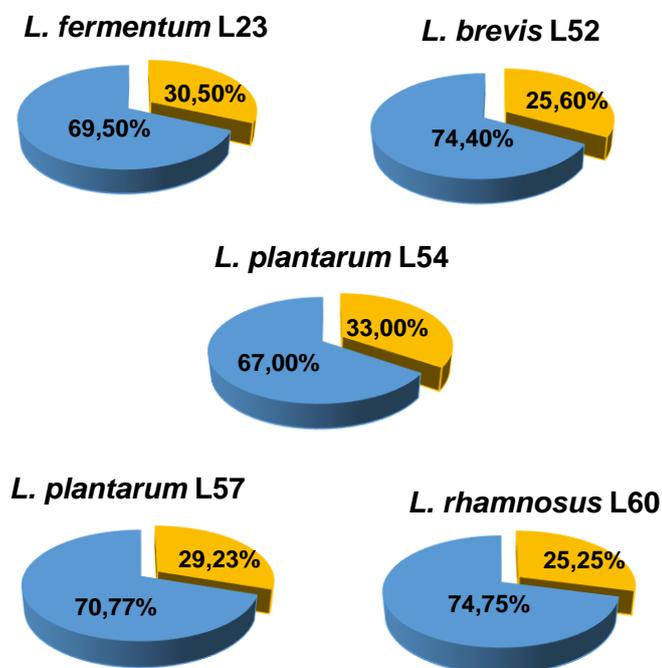
**Figura 7:** Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células sin tratar (A) y neutralizados (B) de los lactobacilos sobre *Escherichia coli* LAMA 651.

Referencias: 1: *Lactobacillus rhamnosus* L60; 2: *L. fermentum* L23; 3: *L. plantarum* L54; 4: *L. brevis* L52; 5: *L. plantarum* L57.

Los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* producidos por los SLCN de cada una de las cepas de lactobacilos, demuestran que luego de eliminar la acción de los ácidos orgánicos por el tratamiento con NaOH, se mantuvo una alta actividad antimicrobiana. Esto indica que otros metabolitos diferentes a los ácidos orgánicos sintetizados por estas cepas, son los principales responsables de la actividad inhibitoria observada sobre ECEH. Estudios previos realizados por el grupo de investigación, describieron que los compuestos antimicrobianos presentes en los SLCN de *L. fermentum* L23 y *L. rhamnosus* L60 son las bacteriocinas L23 y L60, respectivamente (Pascual y col. 2008a,b; Asurmendi y col., 2015; García y col., 2015; Ruiz y col., 2015). La cepa *L. rhamnosus* L60 también produce peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la acción inhibitoria atribuida a este metabolito no supera el 5% de la actividad antimicrobiana total (Pascual y col., 2008b). En el caso de las cepas de *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54 y *L. plantarum* L57, los metabolitos presentes en los SLCN corresponden a sustancias tipo bacteriocinas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el 100% de las *E. coli* ensayadas resultaron inhibidas por los SLC y SLCN de las cinco cepas de lactobacilos estudiadas. Hallazgos que no coinciden con los presentados por otros autores (Voravuthikunchai y col., 2006; Song y col., 2010; Davati y col., 2015; Owusu-Kwarteng y col., 2015), quienes reportaron que las bacteriocinas producidas por otras cepas de lactobacilos no presentaron actividad inhibitoria sobre las cepas de *E. coli* ensayadas. Por ello resulta relevante destacar la actividad antimicrobiana presentada por las bacteriocinas L23, L52, L54, L57 y L60 de este estudio, debido a que en la bibliografía consultada son muy pocas las bacteriocinas descritas con actividad biológica sobre *E. coli* productora de toxina Shiga (Rumjuankiat y col., 2015).

Los análisis de varianza (ANOVA) mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los diámetros de los halos de inhibición promedio producidos por los SLC y SLCN de los lactobacilos utilizados sobre *E. coli*. Esta diferencia se debe a que en los SLC actúan todos los metabolitos antimicrobianos producidos por las cepas de *Lactobacillus* spp., mientras que en los SLCN sólo lo hacen las sustancias tipo bacteriocinas. En base a esto, se calcularon los porcentajes correspondientes a la acción de ácidos orgánicos y bacteriocinas por separado (figura 8). El porcentaje de actividad antimicrobiana producida por las bacteriocinas estuvo comprendido entre el 67 y 74,75%.



**Figura 8:** Porcentaje de la actividad inhibitoria mediada por las diferentes sustancias antimicrobianas producidas por las cepas de *Lactobacillus* spp. sobre *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga.

Los resultados descriptos demuestran que la mayor parte de la actividad antimicrobiana determinada sobre las cepas de *E. coli* se debe principalmente a la actividad de las bacteriocinas. Hallazgos que difieren de los presentados por Arena y col. (2016), quienes reportaron que los ácidos orgánicos eran los responsables de gran parte de la actividad inhibitoria producida por las cepas de *L. plantarum* empleadas. Así mismo, Davoodabadi y col. (2015) demostraron que los SLC luego de su neutralización y tratamiento con catalasa, perdían actividad antimicrobiana. Esto significa que el efecto inhibitorio era debido a la acción de los ácidos orgánicos y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solamente. En otro estudio, Karimi y col. (2018) reportaron que el SLC de una cepa de *L. grasseri* inhibió a *E. coli* O157:H7 con halos de inhibición del crecimiento promedio de 6 mm. Este valor resulta muy por debajo de la media registrada en el presente estudio que osciló entre 23 y 26 mm.

#### **4.6 Evaluación de las interacciones entre las bacteriocinas L23, L52, L54, L57 y L60 presentes en los SLCN de *Lactobacillus* spp. sobre cepas de *E. coli* O157 y no-O157**

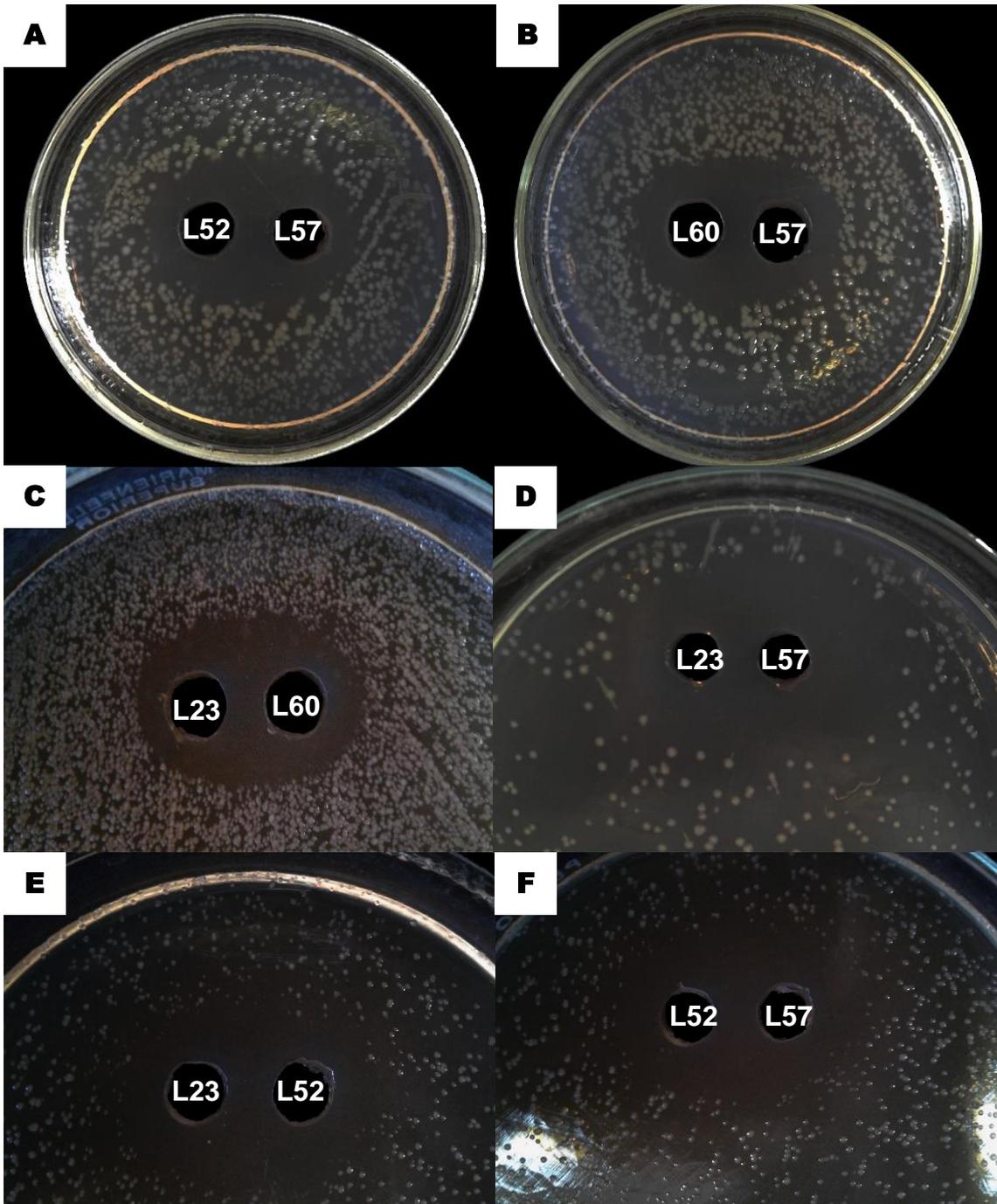
Los resultados obtenidos mediante la técnica de difusión en pozos próximos, mostraron que todas las interacciones entre las bacteriocinas presentaron un efecto sinérgico sobre la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157 y no-O157. Los halos de inhibición promedio producidos por cada una de las combinaciones de bacteriocinas presentes en los SLCN de *L. fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 se muestran en la tabla 8. Al realizar los análisis de varianza (ANOVA) se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los halos de inhibición promedio de las diferentes combinaciones de SLCN. La interacción entre las bacteriocinas L57 y L60, fue aquella que tuvo mayor actividad inhibitoria sobre las cepas de *E. coli* produciendo halos de inhibición del crecimiento promedio de 30,27 mm.

**Tabla 8:** Actividad antimicrobiana de las diferentes combinaciones entre los SLCN de *Lactobacillus* spp. sobre *Escherichia coli*.

| Valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento producidos por las combinaciones entre los SLCN de <i>Lactobacillus</i> spp. (mm) ± DS |                        |                       |                          |                       |                       |                                   |
|--|------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Cepas de <i>Escherichia coli</i>   |                        |                       |                          |                       |                       |                                   |
|  | LAMA 641<br>(O174:H21) | LAMA 649<br>(O157:H7) | LAMA 651<br>(O8/O60:H19) | LAMA 682<br>(O157:H7) | LAMA 684<br>(O157:H7) | Promedio                          |
| <b>L54–L60</b>   | 24,00 ± 4,00           | 23,33 ± 3,06          | 22,00 ± 5,29             | 33,33 ± 3,06          | 28,00 ± 2,00          | <b>26,13 ± 3,48<sup>a</sup></b>   |
| <b>L23–L57</b>   | 28,67 ± 5,03           | 24,67 ± 4,62          | 23,33 ± 2,31             | 28,67 ± 1,15          | 31,33 ± 3,06          | <b>27,33 ± 3,23<sup>a</sup></b>   |
| <b>L60–L23</b>   | 27,33 ± 2,31           | 25,33 ± 2,31          | 27,33 ± 1,15             | 32,67 ± 4,16          | 34,67 ± 3,06          | <b>29,47 ± 2,59<sup>a,b</sup></b> |
| <b>L52–L57</b>   | 28,67 ± 1,15           | 32,67 ± 3,06          | 25,33 ± 4,16             | 25,33 ± 5,77          | 32,00 ± 4,00          | <b>28,80 ± 3,63<sup>a,b</sup></b> |
| <b>L52–L60</b>   | 29,33 ± 4,16           | 32,00 ± 3,46          | 24,67 ± 4,62             | 21,33 ± 2,31          | 34,00 ± 4,00          | <b>28,27 ± 3,71<sup>a,b</sup></b> |
| <b>L52–L54</b>   | 25,33 ± 1,15           | 29,33 ± 2,31          | 26,00 ± 5,29             | 28,67 ± 4,62          | 31,33 ± 2,31          | <b>28,13 ± 3,24<sup>a,b</sup></b> |
| <b>L52–L23</b>   | 27,33 ± 2,31           | 28,00 ± 2,00          | 28,00 ± 4,00             | 27,33 ± 2,31          | 35,33 ± 2,31          | <b>29,20 ± 2,59<sup>a,b</sup></b> |
| <b>L54–L57</b>   | 30,00 ± 4,00           | 28,67 ± 1,15          | 20,00 ± 3,46             | 29,33 ± 3,06          | 30,67 ± 3,06          | <b>27,73 ± 2,95<sup>a,b</sup></b> |
| <b>L54–L23</b>   | 21,33 ± 4,16           | 24,00 ± 3,46          | 26,67 ± 4,62             | 28,67 ± 2,31          | 32,67 ± 2,31          | <b>26,67 ± 3,37<sup>a</sup></b>   |
| <b>L60–L57</b>   | 28,67 ± 2,31           | 30,67 ± 1,15          | 24,67 ± 3,06             | 32,00 ± 4,00          | 35,33 ± 3,06          | <b>30,27 ± 2,71<sup>b</sup></b>   |

Referencias: Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de halos de inhibición producidos por las combinaciones entre los SLCN frente a todas las cepas de *E. coli* evaluadas, de acuerdo al test de LSD Fisher ( $p \leq 0,05$ ).

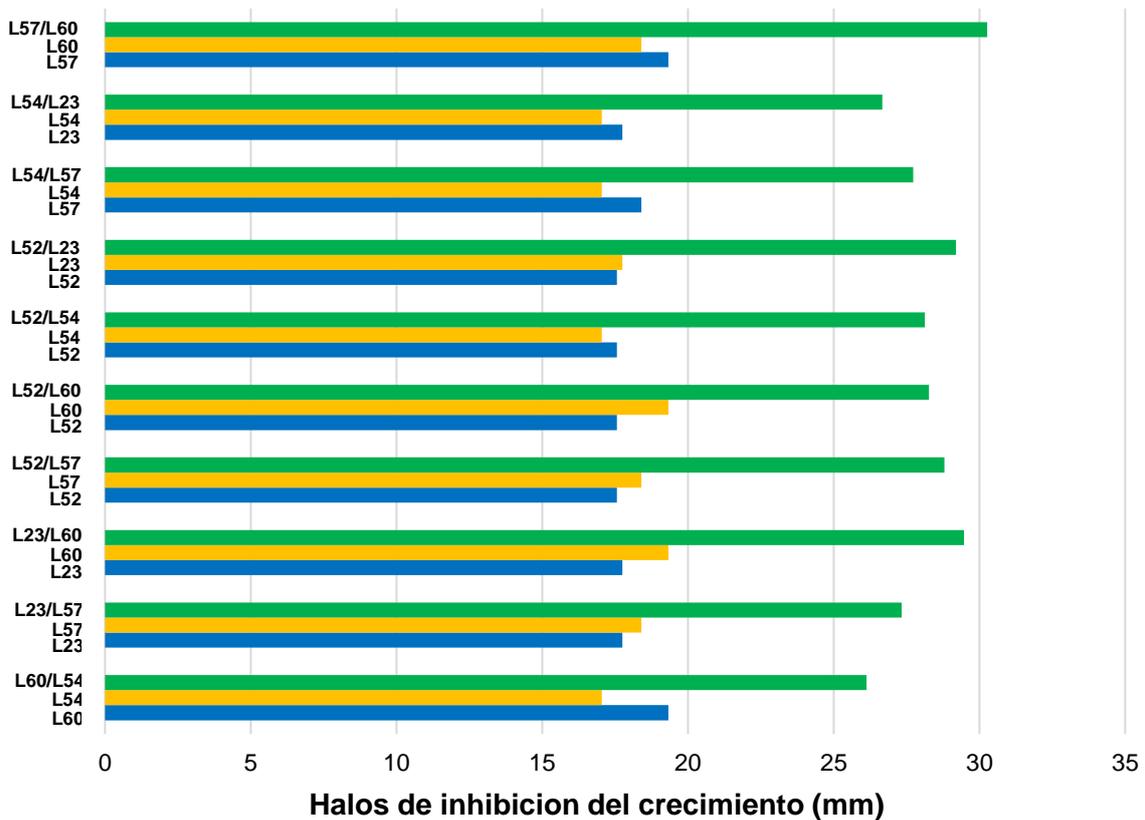
En la figura 9 se observa el incremento de la zona de inhibición del crecimiento de *E. coli* cuando interactúan las bacteriocinas de dos lactobacilos diferentes en la proximidad de los dos pozos.



**Figura 9:** Sinergismo entre las bacteriocinas presentes en los SLCN de *L. fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 sobre *Escherichia coli*

Referencias: A: *E. coli* O157:H7 (LAMA 682); B: *E. coli* O8/O60:H19 (LAMA 651); C: *E. coli* O174:H21 (LAMA 641); D: *E. coli* O157:H7 (LAMA 684); E: *E. coli* O157:H7 (LAMA 649); F: *E. coli* O157:H7 (LAMA 649); L23: SLCN de *L. fermentum* L23; L52: SLCN de *L. brevis* L52; L57: SLCN de *L. plantarum* L57; L60: SLCN de *L. rhamnosus* L60.

Los halos de inhibición del crecimiento producidos por las combinaciones entre los SLCN de las cepas de *Lactobacillus* spp., fueron superiores a aquellos halos observados para cada SLCN individual (figura 10). En la bibliografía consultada, no hay antecedentes previos que demuestren este efecto sinérgico entre bacteriocinas de lactobacilos sobre ECTS.



**Figura 10:** Promedio de los halos de inhibición del crecimiento microbiano producidos por la actividad individual y conjunta de las bacteriocinas presentes en los SLCN de *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 sobre *Escherichia coli* productoras de toxinas Shiga.

Referencias: L23: SLCN de *L. fermentum* L23; L52: SLCN de *L. brevis* L52; L54: SLCN de *L. plantarum* L54; L57: SLCN de *L. plantarum* L57; L60: SLCN de *L. rhamnosus* L60.

Es importante destacar que los resultados de sinergismo entre las bacteriocinas L23, L52, L54, L57 y L60 determinados en el presente trabajo son relevantes, ya que la acción conjunta de estos metabolitos incrementa la inhibición “*in vitro*” del crecimiento de *E. coli* O157 y no-O157 asociadas a SUH.

# *Conclusiones*

---

## **5. CONCLUSIONES**

- ◆ Todas las cepas de lactobacilos productoras de bacteriocinas inhibieron el crecimiento de las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga.
- ◆ Las interacciones entre las sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 fueron del tipo sinérgico.
- ◆ Se observó en este trabajo la ausencia de interacciones antagónicas y/o indiferentes.
- ◆ La interacción sinérgica de las bacteriocinas L57 y L60 fue la más eficiente para inhibir el crecimiento de cepas de *E. coli* O157:H7 y no-O157:H7.
- ◆ Este trabajo describe por primera vez el sinergismo observado entre las bacteriocinas de los lactobacilos, sobre cepas de *E. coli* productoras de síndrome urémico hemolítico.

**Este trabajo demostró *in vitro* el sinergismo de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 sobre cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga.**

**Resultados alentadores para la futura aplicación de estos microorganismos y sus metabolitos en sistemas alimenticios como estrategia de prevención y biocontrol de cepas de *E. coli* asociadas a SUH.**

# *Bibliografia*

---

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**Acedo JZ, van Belkum MJ, Lohans CT, McKay RT, Miskolzie M, Vederas JC (2015)** Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Applied Environmental Microbiology*. 81:2910–2918.

**Ahmad N, Drew W, Plorde J (2011)** Sherris Microbiología Médica. 5ª edición. México. Mc Graw Hill. Capítulo 33. pp 441–442.

**Ahmadova A, Todorov SD, Hadji-Sfaxi I, Choiset Y, Rabesona H, Messaoudi S, Kuliyeu A, Gombossy de Melo Franco BD, Chobert JM, Haertlé T (2013)** Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. *Anaerobe*. 20:42–49.

**Alvarez Sieiro P, Montalbán López M, Mu D, Kuipers OP (2016)** Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100:2939–51.

**Arakawa K, Matsunaga K, Takihiro S, Moritoki A, Ryuto S, Kawai Y, Masuda T, Miyamoto T (2014)** *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. *Journal of Dairy Science*. 98(3):1593–1603.

**Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D (2016)** *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*. 7:464.

**Asurmendi P, García MJ, Pascual L, Barberis L (2015)** Biocontrol of *Listeria monocytogenes* by lactic acid bacteria isolated from brewer's grains used as feedstuff in Argentina. *Journal of Stored Products Research*. 61:27–31.

**Azad MAK, Sarker M, Li T, Yin J (2018)** Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *Biomed Research International*. 2018:9478630.

**Balciunas EM, Martinez FAC, Todorov SD, Franco BDGM, Converti A, Oliveira RPS (2013)** Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*. 32(1):134–142.

**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.

**Beristain Bauza SC, Palou E, López Malo A (2012)** Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6(2):64–78.

**Bermudez Brito M, Plaza Díaz J, Muñoz Quezada S, Gómez Llorente C, Gil A (2012)** Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 61(2):160–174.

**Beutin L, Fach P (2014)** Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from nonhuman sources and strain typing. *Microbiology Spectrum*. 2 (3). DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0001-2013

**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.** Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. N° 397 – SE 05 – Febrero de 2018.

**Borges S, Silva J, Teixeira P (2014)** 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 (2013)** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2:171.

**Castillo Cuenca JC, Silveira Prado EA, Maya García M, Cepero Rodríguez O (2011)** Prevalencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica en terneros lactantes de ganado lechero REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 12(2):1–7.

**Cordonnier C, Thévenot J, Etienne-Mesmin L, Alric M, Livrelli V, Blanquet-Diot S (2016)** Probiotic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: an effective strategy against a deadly enemy?. *Critical Reviews in Microbiology*. 43:116–132.

**Cotter PD, Ross RP, Hill C (2013)** Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. *Nature reviews microbiology*. 11(2):95–105.

**Croxen MA, Law RJ, Schol R, Keeney KM, Wlodarska MB, Finlay B (2013)** Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(4):822–80.

**Davati N, Tabatabaee Yazdi F, Zibae S, Shahidi F, Edalatian MR (2015)** Study of lactic acid bacteria community from raw milk of Iranian one humped camel and evaluation of their probiotic properties. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8(5):e16750.

**Davoodabadi A, Dallal MMS, Lashani E, Ebrahimi MT (2015)** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 8(12):e27852.

**Di Cerbo A, Palmieri B, Aponte M, Morales-Medina JC, Iannitti T (2016)** Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of Clinical Pathology*. 69:187–203.

**Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2011)** InfoStat versión 2011, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

**Dicks LMT, Botes M (2010)** Probiotic lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes*. 1(1):11–29.

**Etcheverría AI, Padola NL (2013)** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. *Virulence*. 4(5):366–372.

**FAO/WHO (2006)** Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for Evaluation. *FAO Food and Nutritional Paper*.

**Ferens WA, Hovde CJ (2011)** *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8:465–487.

**Fernandez–Brando RJ, Betancor LV, Mejias MP (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*. 71:383–89.

**Fuller CA, Pellino CA, Flagler MJ, Strasser JE, Weiss AA (2011)** Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infection and Immunity*. 79:1329–1337.

**Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF, Diep DB (2014)** Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(22):6854–62.

**García P, Rodríguez L, Rodríguez A, Martínez B (2010)** Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*. 21:373–382.

**García MJ, Ruiz F, Asurmendi P, Pascual L, Barberis L (2015)** Bacteriocin producing Lactobacilli strains as a biological strategy to control listerial growth. *International Journal of Microbiology and Advanced Immunology*. 3(2):60–4.

**Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF (2016)** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(1):3–30.

**Gould LH, Mody RK, Ong KL (2013)** Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000–2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathogens and Disease*. 10:453–460.157.

**Güllüce M, Karadayi M, Bariş Ö (2013)** Bacteriocins: Promising antimicrobials. *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education*. Edición Mendes-Vilas A. pp. 1016–1027.

**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). *Bacteriocins Ecology and Evolution*. Ed. Springer. New York, USA. 44–92.

**Homayouni A, Bastani P, Ziyadi S, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S, Ghalibaf M, Mortazavian AM, Mehrabany EV (2014)** Effects of probiotics on the recurrence of bacterial vaginosis: A review. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 18(1):79–86.

**Inès M, Dhouha G (2015)** Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*. 71:100–112.

**Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR (2008)** Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*. 25(2):228–34.

**Jure MA, Condori MS, Perez Terrazzino G, Catalan MG, Lopez Campo A, Zolezzi G, Chinen I, Rivas M, Castillo M (2015)** Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Revista Argentina de Microbiología*. 47(2):125–31.

**Karimi S, Azizi F, Nayeb-Aghaee M, Mahmoodnia L (2018)** The antimicrobial activity of probiotic bacteria *Escherichia coli* isolated from different natural sources against hemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Electronic Physician*. 10(3):6548–6553.

**Kauffman MD, LeJeune J (2011)** European starlings (*Sturnus vulgaris*) challenged with *Escherichia coli* O157 can carry and transmit the human pathogen to cattle. *Letters in Applied Microbiology*. 53:596–601.

**Ketchagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM (2013)** Health Benefits of probiotics: A Review. *Publishing Corporation ISRN Nutrition*. 481651:7.

**Khalid M, Andreoli S (2018)** Extrarenal manifestations of the hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC HUS). *Pediatric Nephrology*. DOI: 10.1007/s00467-018-4105-1

**Khan H, Flint SH, Yu PL (2013)** Determination of mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510. *Journal of Applied Microbiology*. 115(2):484–494.

**Kotikalapudi BL (2009)** Characterization and encapsulation of probiotic bacteria using a pea-protein alginate matrix. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Saskatchewan. Canadá.

**Lagha BA, Haas B, Gottschalk M, Grenier D (2017)** Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*. 48:22.

**Lasserrot Cuadrado AR (2015)** Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Lactobacillus* con potencial probiótico. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

**Lewandowska M (2010)** Microbiota of human gastrointestinal tract. *Food Chemistry and Biotechnology*. N° 1081. Volumen 74.

**Liévin-Le Moal V (2016)** A gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agent: the heat-treated *Lactobacillus* LB. *Advanced Gastroenterology*. 9(1):57 –75.

**Londoño Agudelo N, Torres-Taborda MM, Alvarez-López C, Vélez-Acosta LM (2015)** Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos Hoy*. N° 36. Volumen 23.

**Lopardo HA, Predari S, Vay C (2016)** Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología. Bacterias de Importancia Clínica. Volumen 1.

**Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009)** Brock Biología de los microorganismos. 12ª edición. Pearson–Prentice Hall. Capítulos 2, 16 y 21. pp. 46, 493, 494, 681.

**Martinez RC, Bedani R, Saad SM (2015)** Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. *British Journal of Nutrition*. 114:1993–2015.

**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*. 17(4):78.

**Mogna L, Del Piano M, Deidda F, Nicola S, Soattini L, Debiaggi R, Sforza F, Strozzi G, Mogna G (2012)** Assessment of the *in vitro* inhibitory activity of specific probiotic bacteria against different *Escherichia coli* strains. *Journal of Clinical Gastroenterology*. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31826852b7

**Monteverde M (2014)** Síndrome Urémico Hemolítico. Revisión. *Nefrología, Diálisis y Trasplante*. 34(1):27–41.

**Moreno Galarza LJ (2012)** Aislamiento y selección de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Tesis magister. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

**Moreno R, Salas EJ, Pérez Maldonado C, Jiménez J (2013)** Inocuidad de lactobacilos potencialmente probióticos aislados de heces de lactantes y leche materna. *Acta Bioclinica*. 5(3):149–57.

**Nelson JM, Griffin PM, Jones TF, Smith KE, Scallan E (2011)** Antimicrobial and antimotility agent use in persons with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection in FoodNet Sites. *Clinical Infectious Diseases*. 52:1130–2.

**Niittynen L, Pitkaranta A, Korpela R (2012)** Probiotics and otitis media in children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 76:465–470.

**Owusu-Kwarteng J, Tano-Debrah K, Akabanda F, Jespersen L (2015)** Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. *BMC Microbiology*. 15:261.

**Parra Huertas RA (2010)** Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 8(1):93–105.

**Pascual LM, Daniele MB, Giordano W, Pájaro MC, Baberis 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, 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 L, 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*. 59:360–364.

**Perez RH, Zendo T, Sonomoto K (2014)** Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*. 13(1):1–13.

**Poppi LB, Rivaldi JD, Coutinho TS, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJP, Mancilha IM (2015)** Effect of *Lactobacillus* sp. isolates supernatant on *Escherichia coli* O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 35(4):353–359.

**Rabot S, Rafter J, Rijkers GT, Watzl B, Antoine JM (2010)** Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: impact of probiotics on digestive system metabolism. *The Journal of Nutrition*. 140(3):677S–689S.

**Ramírez Ramírez JC, Ulloa PR, Velázquez González MY, Ulloa JA, Arce Romero F (2011)** Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*. 1–3.

**Ramu R, Shirahatti PS, Devi AT, Prasad A, Kumuda J, Lochana MS, Zameer F, Dhananjaya BL, Nagendra Prasad MN (2015)** Bacteriocins and their applications in food preservation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.2015.1020918.

**Rivas M, Chinen I, Guth BE (2016)** Enterohemorrhagic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*. *Escherichia coli in the Americas*. Springer International Publishing. pp. 97–123.

**Ruiz 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.

**Salvetti E, Torriani S, Felis GE (2012)** The genus *Lactobacillus*: A taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 4(4):217–226.

**Satpute SK, Kulkarni GR, Banpurkar AG, Banat IM, Mone NS, Patil RH, Cameotra SS (2016)** Biosurfactant/s from Lactobacilli species: properties, challenges and potential biomedical applications. *Journal of Basic Microbiology*. 56(11):1140–1158.

**Saxena T, Kaushik P, Krishna Mohan M (2015)** Prevalence of *E. coli* O157:H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 82:249–264.

**Scheutz F, Strockbine N (2015)** *Escherichia*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. DOI: 10.1002/9781118960608.gbm01147.

**Selle K, Klaenhammer TR (2013)** Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. *Review. FEMS Microbiology*. 37(6):915–935.

**Sharma D, Saharan BS (2014)** Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *International Journal of Microbiology*. DOI: 10.1155/2014/698713

**Sharma D, Saharan BS, Kapil S (2016)** Biosurfactants of probiotic lactic acid bacteria. *Springer, Briefs in Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/493548>

**Silva CCG, Silva SPM, Ribeiro SC (2018)** Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*. 9:594.

**Singh VP (2018)** Recent approaches in food bio-preservation – a review. *Open Veterinary Journal*. 8(1):104–111.

**Song TS, Kim JY, Kim KH, Jung BM, Yun SS, Yoon SS (2010)** *In vitro* evaluation of probiotic lactic acid bacteria isolated from dairy and non-dairy environments. *Food Science and Biotechnology*. 19:19–25.

**Šušcović J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc A, Habjanič K, Mantošić S (2010)** Antimicrobial activity – The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 48(3):296–307.

**Tille PM (2014)** Bailey & Scott's. Diagnostic Microbiology. 13<sup>a</sup> edición. Elsevier Mosby. Capítulo 20. pp 311.

**Trachtman H (2013)** HUS and TTP in children. *Pediatric Clinics of North America*. 60(6):1513–26.

**van Belkum MJ, Martin-Visscher LA, Vederas JC (2011)** Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in Microbiology*. 19(8):411–418.

**Vásquez M, Sandra M, Suárez MH, Zapata SB (2009)** Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64–71.

**Voravuthikunchai SP, Bilaso S, Supamala O (2006)** Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Anaerobe*. 12:221–226.

**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. Second Edition. New York, United States: *Springer*.

**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.

**Zacharof MP, Lovitt RW (2012)** Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*. 2:50–56.

**Zhang Z, Lv J, Pan L, Zhang Y (2018)** Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(19):8135–8143.

**Zhong L, Zhang X, Covasa M (2014)** Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 20(24):7878–86.

*Anexo*

---

## 8. ANEXO

### Actividad antimicrobiana producida por *Lactobacillus fermentum* L23, *L. brevis* L52, *L. plantarum* L54, *L. plantarum* L57 y *L. rhamnosus* L60 sobre *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,20838**

Error: 12,3742 gl: 95

| Columnal | Medias | n  | E.E. |     |
|----------|--------|----|------|-----|
| L23      | 19,60  | 20 | 0,79 | A   |
| L60      | 22,60  | 20 | 0,79 | B   |
| L52      | 22,95  | 20 | 0,79 | B   |
| L54      | 24,10  | 20 | 0,79 | B C |
| L57      | 25,20  | 20 | 0,79 | C   |

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

### Actividad antimicrobiana producida por los SLC y SLCN de *Lactobacillus* spp. sobre *Escherichia coli* enterohemorrágicas mediante la técnica de difusión en pozos

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,40541**

Error: 19,7426 gl: 256

| Columnal | Medias | n  | E.E. |   |
|----------|--------|----|------|---|
| SLCN L54 | 17,04  | 27 | 0,86 | A |
| SLCN L52 | 17,56  | 27 | 0,86 | A |
| SLCN L23 | 17,75  | 32 | 0,79 | A |
| SLCN L57 | 18,40  | 25 | 0,89 | A |
| SLCN L60 | 19,33  | 27 | 0,86 | A |
| SLC L52  | 23,60  | 25 | 0,89 | B |
| SLC L54  | 25,44  | 25 | 0,89 | B |
| SLC L23  | 25,54  | 26 | 0,87 | B |
| SLC L60  | 25,93  | 27 | 0,86 | B |
| SLC L57  | 26,00  | 25 | 0,89 | B |

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

### Actividad inhibitoria producida por las interacciones entre las bacteriocinas presentes en los SLCN de *Lactobacillus* spp. sobre *Escherichia coli* mediante la técnica de pozos próximos

**Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,36374**

Error: 21,7105 gl: 140

| Columnal | Medias | n  | E.E. |     |
|----------|--------|----|------|-----|
| L60/L54  | 26,13  | 15 | 1,20 | A   |
| L23/L54  | 26,67  | 15 | 1,20 | A   |
| L23/L57  | 27,33  | 15 | 1,20 | A B |
| L57/L54  | 27,73  | 15 | 1,20 | A B |
| L52/L54  | 28,13  | 15 | 1,20 | A B |
| L52/L60  | 28,27  | 15 | 1,20 | A B |
| L52/L57  | 28,80  | 15 | 1,20 | A B |
| L52/L23  | 29,20  | 15 | 1,20 | A B |
| L23/L60  | 29,47  | 15 | 1,20 | A B |
| L57/L60  | 30,27  | 15 | 1,20 | B   |

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

