

# BACTERIAS LÁCTICAS BIOPROTECTORAS CAPACES DE MITIGAR *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN CARNE. ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN SITU*

Este trabajo recibió la Mención de Honor en el VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria organizado por la IAFP

## INTRODUCCIÓN

En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) siguen constituyendo uno de los principales desafíos para la salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, siendo las más frecuentes aquellas ocasionadas por contaminación biológica.

Entre los patógenos bacterianos emergentes se destaca *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC), un patógeno zoonótico cuyo serotipo más frecuente es O157:H7, aunque hay más de 150 serotipos que poseen un potencial patogénico similar. La habilidad de las cepas STEC para causar enfermedad está relacionada con su capacidad para secretar las toxinas shiga Stx1, Stx2 y sus variantes, responsables del daño al endotelio vascular. Dentro del patotipo STEC, el subgrupo enterohemorrágico de *E. coli* (ECEH) presenta además una isla de patogenicidad cromosómica, LEE (del inglés, locus of enterocyte effacement), donde se encuentran codificados factores bacterianos responsables de la lesión típica a nivel intestinal.

La infección humana por STEC se produce a través de la ingestión de alimentos contaminados, en especial cárnicos. Esta infección zoonótica puede originar el desarrollo de trastornos intestinales, como diarrea acuosa o con sangre. Por otra parte, el 5-10% de los pacientes infectados con STEC puede desarrollar el síndrome urémico-hemolítico (SUH), enfermedad extraintestinal severa que puede dar lugar a la insuficiencia renal crónica. En la Argentina es la causa más común de insuficiencia renal aguda y la segunda causa de insuficiencia renal crónica y de trasplante renal en niños y adolescentes, por lo que constituye un problema crítico para la salud pública.

Orihuel A.; Baillo A.A.; Saavedra L.; Fadda S.  
Centro de Referencia para Lactobacilos -  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y  
Tecnológicas (CERELA-CONICET).  
San Miguel de Tucumán, Argentina.  
sfadda@cerela.org.ar

Esta problemática tiene también un gran impacto en el sector cárnico industrial, siendo una de las principales causas de retiro de productos del mercado y ocasionando por lo tanto grandes pérdidas económicas. Por otra parte, las exigencias de los consumidores por alimentos más seguros, más naturales, menos elaborados y con menor cantidad de conservantes y aditivos químicos son cada vez mayores. Este contexto pone de relieve que *E. coli* entehemorrágico es una seria amenaza para la salud pública y una gran preocupación para la sostenibilidad de la industria cárnica, así como para toda la cadena de producción, por lo que se precisan urgentes soluciones biotecnológicas para limitar y prevenir riesgos futuros.

En este sentido, las Bacterias Lácticas (BL) son ubicuas y están presentes de forma natural en la carne. Estas bacterias son reconocidas como microorganismos seguros (GRAS, del inglés Generally Regarded As Safe) (Wessels *et al.*, 2008); son capaces de producir distintos tipos de metabolitos antimicrobianos, por lo que constituyen una estrategia biológica como biopreservantes en alimentos. Además, algunas cepas producen bacteriocinas, péptidos de síntesis ribosomal con actividad antimicrobiana hacia bacterias relacionadas filogenéticamente, desempeñando un papel importante en la conservación de alimentos. Las bacteriocinas de BL son activas contra microorganismos Gram positivos deteriorantes y/o patógenos tales como *Listeria monocytogenes* y *Brochothrix thermosphacta* (Woraprayote *et al.*, 2016). Debido a estas propiedades, el uso de BL es un sustituto interesante para los conservantes químicos y/o físicos, y hacen de ellas candidatas ideales para el desarrollo de agentes bioprotectores.

La capacidad del patógeno para adherir, colonizar y formar biofilms asegura su persistencia en los alimentos y en superficies de fabricación en contacto con alimentos y equipos (Giaouris, 2015). En efecto, *E. coli* O157:H7 tiene la capacidad de adherirse a las fibras musculares como al tejido conectivo asociado (Chen *et al.*, 2007). Se observó que la adhesión de estas bacterias al músculo es debida principalmente a la interacción con el colágeno presente en la matriz extracelular (MEC) de las fibras musculares (Chagnot *et al.*, 2013). Las BL también tienen la capacidad de unirse a la MEC mediante proteínas específicas (Yadav *et al.*, 2015). La competencia directa entre BL y *E. coli* O157:H7 por la adhesión a la matriz extracelular puede ser una estrategia en la prevención de contaminación en productos cárnicos con dicho patógeno. Por lo que uno de los objetivos abordados en este trabajo fue la evaluación de la capacidad de adhesión de BL y ECEH a proteínas de la MEC.

Para avanzar hacia la elaboración de un cultivo bioprotector eficiente como estrategia alternativa de control contra ECEH en carne es necesario contar con cepas altamente competitivas contra el patógeno. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron la acción inhibitoria de BL sobre ECEH. Se usó un sistema cárnico modelo líquido donde fue inoculada una cepa de BL junto con *E. coli* O157:H7 NCTC12900. Se evaluaron cuatro cepas lácticas seleccionadas por sus propiedades tecnológicas y/o capacidad para producir bacteriocinas con actividad antilisteria. Los resultados mostraron que *Enterococcus* (Ent.) *mundtii* CRL35 y *L. plantarum* CRL 681 aceleraban en mayor medida la fase de muerte de *E. coli* O157:H7, produciendo la reducción total del patógeno entre las 48-96 h de incubación (Orihuel *et al.*, 2018b). Estos avances fueron los que motivaron el presente estudio.

## OBJETIVOS

1. Evaluar la capacidad inhibitoria de *Enterococcus mundtii* CRL35 sobre EHEC mediante estudios in situ (carne molida) para corroborar los resultados obtenidos previamente in vitro.
2. Analizar el potencial de adhesión de *Enterococcus mundtii* CRL35 y de *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 a la matriz extracelular cárnica (MEC).
3. Evaluar in vitro el efecto sinérgico de *Lactobacillus plantarum* CRL681 y *Ent. mundtii* CRL35 sobre la inhibición de EHEC en un sistema experimental cárnico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos utilizados

#### Bacterias Lácticas

*Enterococcus mundtii* CRL35 (colección de CERELA, cepa productora de bacteriocina (Saavedra *et al.*, 2004; Salvucci *et al.*, 2007). Óptima performance en ambientes cárnicos (Orihuel *et al.*, 2018a). Buena capacidad para inhibir ECEH en medio cárnico modelo (Orihuel *et al.*, 2018b). Su genoma fue secuenciado y analizado (Bonacina *et al.*, 2014, 2016).

*Lactobacillus plantarum* CRL 681 (colección CERELA, origen cárnico). Excelente actividad metabólica y crecimiento en sistemas cárnicos (Fadda *et al.*, 1998, 1999). Su genoma fue recientemente secuenciado ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/QOSF00000000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/QOSF00000000)). Efecto positivo en la conservación de carne fresca (Fadda *et al.*, 2008). Excelente capacidad para inhibir ECEH en medio cárnico modelo (Orihuel *et al.*, 2018a). Ambas cepas son compatibles entre sí.

Perfecto afilado de todas nuestras hojas de sierra circulares



AFILADORA DE HOJAS DE SIERRA CIRCULARES. MODELO CBS-1

Hojas siempre afiladas para un corte óptimo



JARVIS ARGENTINA S.A.I.C.: Luis María Drago 2685 (B1852LHO)  
 Burzaco - Bs. As. - Argentina - Tel.: (54 11) 4238-0010 - Fax: (54 11) 4238-6323  
 enriquekelly@jarvis.com.ar - [www.jarvis.com.ar](http://www.jarvis.com.ar)

**TABLA 1** - Composición microbiana de cada lote de carne molida

Nº lote	Lotes	Inóculo (log UFC/gr)
1	Control	Sin inóculo
2	ECEH crecimiento individual	4
3	<i>Ent. mundtii</i> crecimiento individual	7
4	<i>Ent. mundtii</i> + ECEH cocultivo	4-7 (ECEH– <i>Ent. mundtii</i> )

*Escherichia coli*

Por razones de seguridad biológica, se seleccionó *E. coli* O157:H7 NCTC12900 (National Culture Type Collection, Colindale, London). Esta cepa es aislamiento natural realizado en 1992 en Austria que no produce un enterotoxinas Stx1 y Stx2 (Best *et al.*, 2003). Esta cepa si bien es atoxigénica, posee intactos los demás factores de virulencia.

**Procesado y obtención de carne molida**

Se compró en carnicería una pieza de 5 kg aproximadamente de carne vacuna (semimembranosus). El procesado de la carne se realizó en condiciones asépticas, en flujo laminar utilizando guantes. Previo a su utilización, tanto la superficie de los materiales utilizados como la superficie de la pieza de carne fueron rociadas con alcohol 96° y secadas en flujo laminar. Luego se sometieron a radiación ultravioleta durante 15 minutos. Se descartó la capa superior de carne (aproximadamente 2 cm). La pieza de carne restante se cortó con bisturí en pequeños trozos, que fueron triturados en una procesadora previamente desinfectada con alcohol 70°. La carne triturada de colocó en bolsas de muestreo estériles. Se comprobó la carga microbiana de la carne molida obtenida mediante plaqueo en PCA. Finalmente las bolsas con carne molida fueron selladas bajo vacío y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

**Estudios fisiológicos en el sistema experimental Carne Molida (CM)**

Cada bolsa con 50 g de carne, previamente descongelada, fue inoculada con 5 ml de solución fisiológica conteniendo el inóculo (log UFC/g carne) correspondiente según la condición a estudiar (Tabla 1). Además, a cada lote se agregó 5 ml de solución de glucosa para obtener una concentración de 0,5% (p/v) final. Se mezcló adecuadamente para permitir una buena homogeneización del inóculo microbiano y la glucosa en la matriz cárnica. Los diferentes lotes fueron incubados a 16°C durante 72 h. En los tiempos T 0, 7, 24, 48, 72 h se tomaron

asépticamente 5 g de carne de cada lote y se colocaron en una nueva bolsa estéril, agregando solución fisiológica hasta lograr dilución 1/10. Cada muestra luego se procesó en Stomacher Blender (UK) en dos ciclos de un minuto cada uno. Se tomaron 3 ml de la muestra homogeneizada, se colocaron en recipiente adecuado y se realizó medición de pH en pHmeter Altronix TPX I (Nueva York, EE. UU.). A partir del homogenato (el cual constituye la primera dilución de la muestra) se realizaron diluciones 1/10 en solución fisiológica. Diluciones adecuadas se sembraron por duplicado en medios de cultivos agarizados. Los medios de cultivo selectivos utilizados fueron agar Mac Conkey sorbitol para ECEH, MRS para *Ent. mundtii* y PCA como control para el recuento de mesófilos totales. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 24-48 h. Se realizó finalmente recuento bacteriano que se expresó como log UFC/g de carne. En la tabla 1 se detalla la composición microbiana de cada lote de carne molida estudiado.

**Ensayos de unión a Matriz Extracelular (MEC) (BL + ECEH)**

Se analizó la capacidad de adhesión de *Ent. mundtii* CRL35 y ECEH a proteínas claves de la matriz extracelular cárnica (MEC), según la metodología de Chagnot y col. (2013). Para ello se utilizó colágeno tipo IV (C6745, Sigma Aldrich) y laminina (L2020, Sigma Aldrich). Las condiciones a estudiar fueron las siguientes:

- Unión de ECEH a colágeno IV
- Unión de *Ent. mundtii* a colágeno IV
- Unión de ECEH + *Ent. mundtii* a colágeno IV
- Unión de ECEH a laminina
- Unión de *Ent. mundtii* a laminina
- Unión de ECEH + *Ent. mundtii* a laminina

Se preparó una solución 50 µg/ml de cada proteína en buffer carbonato 0,1M pH 9,6. El ensayo se llevó a cabo utilizando una microplaca de poliestireno de 96 pocillos, en la cual los pocillos se cubrieron con 250 µl de la solución de proteína de MEC correspondiente y los

pocillos control con el mismo volumen de solución de BSA (Albúmina Sérica Bovina) 1%. Se permitió la incubación de la microplaca durante toda la noche a 4°C para lograr tapizar el fondo del pocillo con las proteínas utilizadas. Luego se lavaron los pocillos con buffer PBST (buffer PBS + Tween 0,05%, v/v) y fueron saturados con 250 µl de solución de BSA al 1% (w/v) en PBST. Se incubó durante 2 horas a 37° y se lavaron. A continuación, se preparó una suspensión 8 log UFC/ml de cada microorganismo (*Ent mundtii* y ECEH) a partir del cultivo correspondiente en fase exponencial. Se agregó a cada suspensión bacteriana cloranfenicol 90 µg/ml. Se adicionó en los pocillos 200 µl de la suspensión bacteriana 8 log UFC/ml de *Ent. mundtii* o ECEH cuando se estudió su capacidad de adhesión de forma individual. En aquellas condiciones donde se estudió la capacidad de adhesión en co-cultivo se colocó 100 µl de la suspensión 8 log UFC/ml de *Ent. mundtii* y 100 µl de la suspensión de igual concentración de ECEH. Se incubó durante 2 h a 30 °C. Luego se lavó cada pocillo tres veces con TS (agua triptona) y fueron tratados con 250 µL de Tritón X-100 0,05% (v/v) para desorber las bacterias y recuperar de esa forma las células adheridas. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se extrajo 100 µL de cada pocillo y realizaron diluciones seriadas al décimo (1:10). Las diluciones fueron sembradas en placas de agar (MRS y/o LB según corresponda) para recuento bacteriano (18-24 h a 30°C). El porcentaje de células adheridas se calculó en función de las células totales colocadas, es decir, considerando la cantidad de células colocadas como el 100% de adhesión. Cada condición evaluada se realizó por triplicado y el ensayo cuenta con tres replicas biológicas.

### Co-cultivos bacterianos en el Sistema Cárnico Modelo (SCM)

El SCM se elaboró a partir de 5 g de carne diluida al décimo con agua destilada y procesada en Stomacher Blender (UK) durante ocho minutos, según Fadda y col. (1998). El homogenato obtenido fue centrifugado a 10.000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante, con las proteínas cárnicas solubles junto a otros metabolitos, fue filtrado a través de filtros tipo Whatman. El filtrado se suplementó con glucosa (0,5 % p:v) y se esterilizó por filtración usando membranas de 0.2 µm (Steritop GP, Biopore, Buenos Aires, Argentina). Finalmente el Sistema Cárnico Modelo fue suplementado con tween 80 estéril (0,01% v:v) y conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

Los cultivos mixtos de ambas cepas de BL y de ellas con ECEH se llevaron a cabo en 50 ml del SCM, donde se inocularon con aproximadamente 6 log UFC/ml de BL y 4 log UFC/ml de ECEH, se incubaron en condiciones estáticas a 30°C durante 72 h. Se tomaron muestras a las 0, 3, 6, 8, 24, 48 y 72 h de incubación a partir de las cuales se realizó determinación de pH y análisis de viabilidad utilizando medios agarizados selectivos: agar MRS para *L. plantarum*, agar Mac Conkey (Britania, Buenos Aires, Argentina) para ECEH y agar KCA para el recuento selectivo de *Ent. mundtii* en co-cultivo con *L. plantarum* (Gemelas *et al.*, 2013). Se incubaron a 30°C durante 24-48 h. Las mediciones de pH se determinaron usando pHmeter Altronix TPX I (Nueva York, EE. UU.). Se llevaron a cabo tres réplicas biológicas independientes para cada cultivo (mixto e independientes).

## Procesamiento de CARNES y DERIVADOS

En permanente incorporación de tecnología e innovación para el sector frigorífico.

- € Palcos neumáticos.
- € Salas de charqueo y desposte.
- € Transportadores sanitarios para cortes desnudos o envasados.
- € Salas de empaque de alta tecnología para cortes enfriados o congelados.
- € Túneles de termocontracción y escurrido para empaques al vacío.
- € Túneles para congelado dinámicos tipo IQF y girofreezer.
- € Desarrollos de equipos especiales para procesamiento.

**asema**  
Ingeniería y equipos para la industria



[www.asema.com.ar](http://www.asema.com.ar)

asema@asema.com.ar  
Tel/Fax: +54 (0342) 490-4600

Ruta Prov. N°2 km 13  
Monte Vera (3014) | Santa Fe, Argentina

**RESULTADOS**

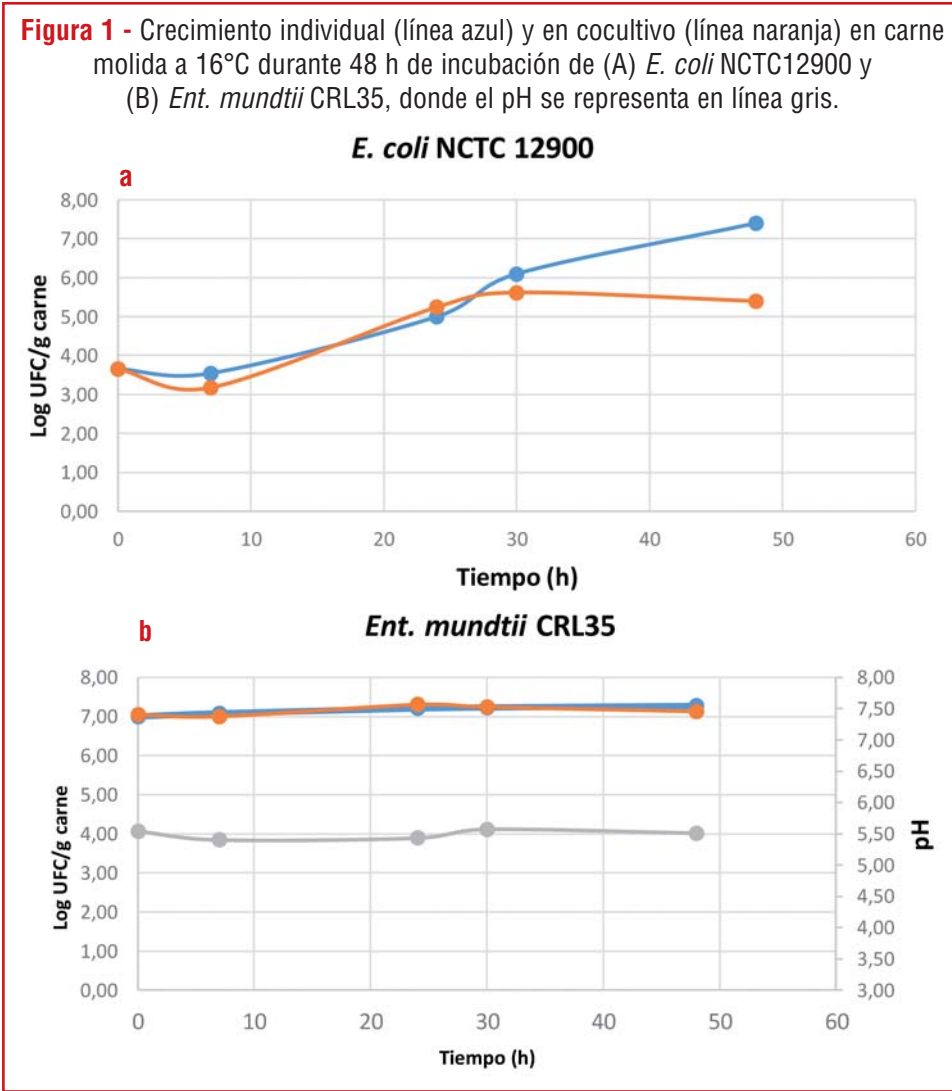
**Desempeño de *Ent. mundtii* y ECEH en carne molida: estudios fisiológicos**

Se diseñó un sistema experimental constituido por carne molida con el objetivo de evaluar la acción bioprotectora de *Ent. mundtii* en escenario real y analizar comparativamente los estudios realizados in vitro. En presencia de la BL, *E. coli* NCTC12900 detuvo su crecimiento exponencial luego de 24 h de incubación a 16°C, alcanzando luego de 48 h, 2 log UFC/g menos de crecimiento que en ausencia de la BL (Figura 1 A). Al estudiar el crecimiento de *Ent. mundtii* en carne molida, se observó que esta BL logró mantener su viabilidad inicial a través del tiempo de incubación (7 log UFC/g) no observándose descenso del pH, que se mantuvo constante en valores cercanos a 5,5 durante las 48 h de incubación. *Ent. mundtii* se comportó de manera similar tanto cuando creció de forma individual como cuando se encontró en co-cultivo con ECEH (Figura 1 B). Por lo tanto, podemos inferir que la presencia del patógeno no interfiere en el desempeño de *Ent. mundtii* en carne molida en las condiciones ensayadas.

Por su parte ECEH, al crecer en forma individual, ingresó en fase exponencial luego de seis h de incubación, manteniéndose en ella hasta el final del periodo de incubación llegando a 7,4 log UFC/gr a las 48 h, sin embargo, cuando el patógeno creció en co-cultivo con *Ent. mundtii*, su fase exponencial de crecimiento se detuvo a las 30 h con 5,62 log UFC/gr, permaneciendo constante hasta las 48 h, logrando reducir 2 unidades log con respecto a su crecimiento individual en esta fase. De manera que *Ent. mundtii* CRL35 ejerció un efecto bacteriostático sobre EHEC en carne molida (a 16°C, 48h). Se prevén ensayos tecnológicos adicionales para optimizar la acción bioprotectora de esta cepa en escenario real.

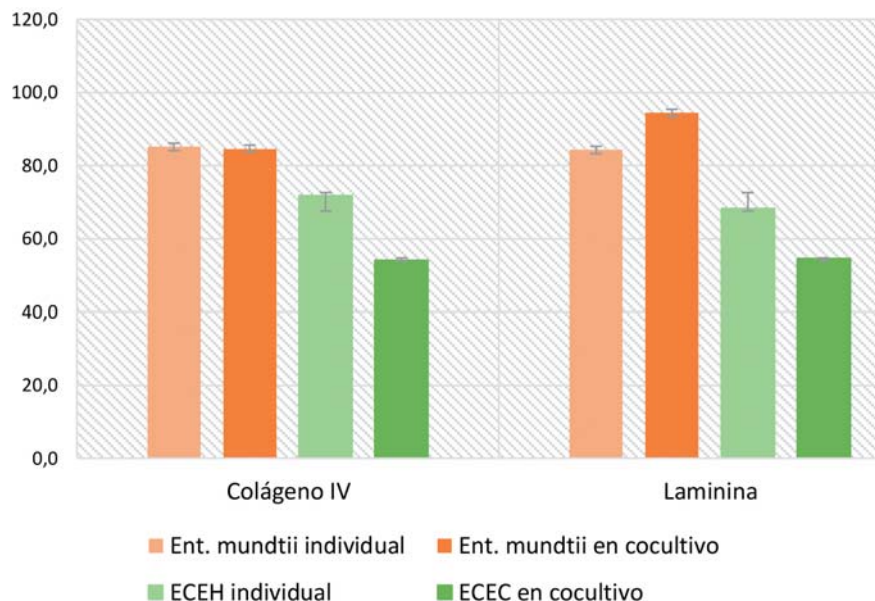
**Estudios de adhesión: capacidad de unión a proteínas de la matriz extracelular cárnica (MEC)**

Se realizó ensayo en microplaca para evaluar la capacidad de adhesión de *Ent. mundtii* y ECEH a colágeno IV y laminina, principales constituyentes de la matriz extracelular cárnica (MEC). Se permitió su adhesión individualmente y de forma conjunta en iguales proporciones. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que *Ent. mundtii* presenta muy buena capacidad de adhesión a ambas proteínas de la MEC, observándose que más del 80% de las células agregadas lograron una óptima adhesión. Además, esta capacidad de adhesión no se vio afectada cuando *Ent. mundtii* se encontraba en presencia del patógeno, incluso, su adhesión a laminina demostró un incremento (94,5%). Por su parte, ECEH, también demostró buena capacidad de adhesión a ambas proteínas de matriz extracelular (alrededor del 70% de las células agregadas) aunque en menor medida que *Ent. mundtii*. Sin embargo, no pudo conservar dicha capacidad en presencia de la BL, por el contrario, se evidenció una disminución en su capacidad de adhesión cuando se encontraba en



nes. Los resultados obtenidos permitieron demostrar que *Ent. mundtii* presenta muy buena capacidad de adhesión a ambas proteínas de la MEC, observándose que más del 80% de las células agregadas lograron una óptima adhesión. Además, esta capacidad de adhesión no se vio afectada cuando *Ent. mundtii* se encontraba en presencia del patógeno, incluso, su adhesión a laminina demostró un incremento (94,5%). Por su parte, ECEH, también demostró buena capacidad de adhesión a ambas proteínas de matriz extracelular (alrededor del 70% de las células agregadas) aunque en menor medida que *Ent. mundtii*. Sin embargo, no pudo conservar dicha capacidad en presencia de la BL, por el contrario, se evidenció una disminución en su capacidad de adhesión cuando se encontraba en

**Figura 2** - Porcentaje de adhesión (células adheridas/células colocadasx100) a Colágeno IV y Laminina de *Ent. mundtii* y ECEH en forma individual o en cocultivo



presencia de *Ent. mundtii*, alcanzando alrededor de un 54% de adhesión a ambas proteínas con respecto a las células colocadas (Figura 2). La adhesión diferencial de las cepas en estudio a las proteínas de la MEC sugiere una ventaja competitiva de *Ent. mundtii* sobre el fenómeno de adhesión/colonización del alimento en presencia del patógeno.

### Co-cultivos bacterianos en el Sistema Cárnico Modelo (SCM)

Al conocer el desempeño de *Ent. mundtii* y *L. plantarum* en medio cárnico creciendo de forma individual, así como la capacidad de inhibición de cada una de ellas contra ECEH, se decidió estudiar el rendimiento de ambas cepas lácticas en cultivo mixto en el mismo sistema experimental para evaluar su capacidad de inhibición del patógeno en forma conjunta.

### Crecimiento de *Ent. mundtii* CRL35 y *L. plantarum* CRL 681 en medio cárnico

Ambas cepas de BL presentan buen crecimiento cuando fueron cocultivadas en SCM, evolucionando ambas de manera similar durante las 72 h evaluadas. Durante su crecimiento individual, *L. plantarum* y *Ent. mundtii*, presentaron una cinética similar, especialmente a partir de las 48 h, aunque la viabilidad final fue mayor (entre 6,5 y 7,2 log UFC/ml, respectivamente). Sin embargo, durante el cocultivo, el pH logró descender de 5,5 a 3,9, alcanzando una acidificación de igual magnitud a la observada cuando cada

cepa creció individualmente (datos no mostrados).

### Crecimiento de *Ent. mundtii* CRL35, *L. plantarum* CRL681 y *E. coli* O157:H7 NCTC:12900

Si bien la cinética de crecimiento de ambas cepas lácticas junto al patógeno presentó variaciones con respecto al crecimiento de cada una de ellas con ECEH, mantienen su viabilidad a lo largo del tiempo de incubación, mostrando un desempeño adecuado en este sistema (datos no mostrados). Más aún, el cultivo bioprotector mixto constituido por ambas cepas lácticas logró una potenciación del efecto inhibitorio sobre el patógeno, agudizando la fase de muerte y produciendo su eliminación total ya a las 48 h de incubación como se muestra en la Figura 3. Por lo tanto, la combinación de ambas cepas lácticas logró combatir con mayor eficiencia al patógeno, reflejando así un efecto de mayor magnitud que la inhibición causada por cada cepa láctica (Figura 3).



#### DESDE 1982 ABASTECIENDO A LA INDUSTRIA DEL CHACINADO

- ✓ Elaboración, molienda, fraccionamiento y distribución de materias primas para elaboración de chacinados (aditivos, integrales de todo tipo, féculas y almidones, sangre deshidratada, especias y condimentos, tripas vacunas, ovinas y porcinas, hilos chorizeros).
- ✓ Única empresa con planta fraccionadora de tripas habilitada por Senasa en la Patagonia.
- ✓ Distribución propia en las provincias de Río Negro, Neuquén, La Pampa, Chubut, Sur de Buenos Aires y Santa Cruz.

Aldo Callieri S.A. - Adm. y ventas: República del Libano 1579

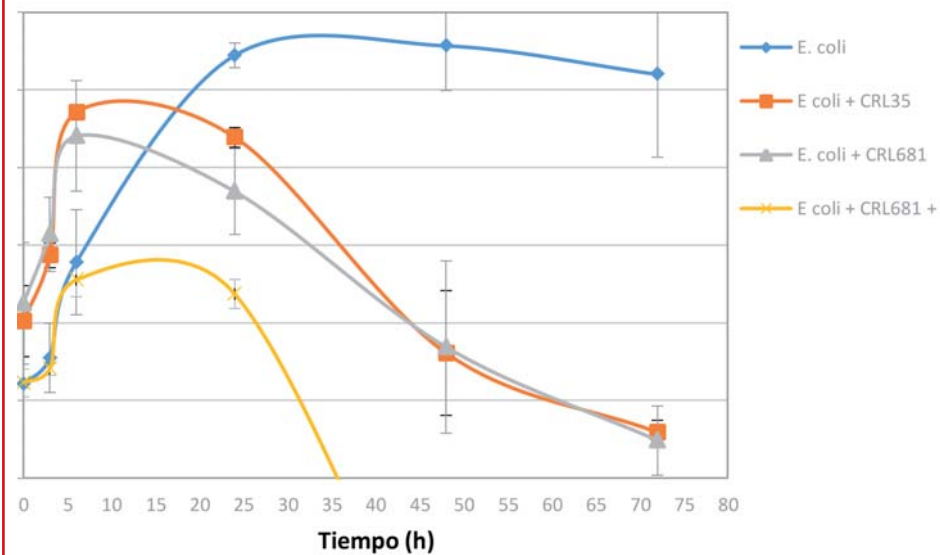
Planta de elaboración: Del Libertador 1711, Parque Industrial 1 - General Roca - Río Negro - Patagonia - Argentina

Tel.: 0298 4435130 / 4435131

pedidos@productoscallieri.com.ar - www.productoscallieri.com.ar

Facebook: productoscallieri - Instagram: sabores\_callieri

**Figura 3** - Crecimiento de *E. coli* O157:H7 NCTC12900 en el sistema cárnico modelo a 30°C durante 72 h, en crecimiento individual (línea azul) y en cocultivo con: *Ent. mundtii* CRL35 (línea naranja); con *L. plantarum* CRL681 (línea gris) y con ambas cepas lácticas (línea amarilla).



tes ajustes para lograr un efecto más contundente sobre ECEH en el alimento. Además, cabe destacar que, de estar presente en carne, el número de células de ECEH es significativamente menor a la utilizada en este trabajo (4 log UFC/g), por lo cual la BL estaría en una importante ventaja competitiva en el ejercicio de su efecto inhibitorio. Concretamente, en este trabajo se logró una reducción de 2 unidades log de ECEH cuando creció en co-cultivo con *Ent. mundtii* en carne. Por otro lado, el efecto bioprotector de *Ent. mundtii* podría ser combinado y fortalecido con otras estrategias

### DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrollaron ensayos tendientes a comprobar la actividad antagonista de ciertas BL contra *E. coli* enterohemorrágico O157:H7 tanto in vitro como in situ. Se realizaron estudios de adhesión a colágeno y laminina, constituyentes de la MEC, a fin de analizar la posible competencia entre BL y ECEH. En efecto, se sabe que muchas BL poseen una proteína específica de unión al colágeno (CBP). La característica sobresaliente de las CBPs es que pueden actuar en la interacción de BL con patógenos, del tipo de *E. coli*, mediante desplazamiento por competencia de los sitios de unión a colágeno (Hsueh *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2015). La competencia directa entre BL y ECEH por la adhesión a la matriz extracelular podría ser utilizada como una estrategia en la prevención en productos cárnicos. Los resultados obtenidos indicarían una ventaja competitiva de la BL sobre ECEH en la adhesión y por lo tanto en la colonización sobre el alimento cárnico. Por otra parte, se realizaron ensayos en escenario real co-inoculando *Ent. mundtii* CRL35 con EHEC en carne molida. Si bien se observó una acción antagónica de *Ent. mundtii* CRL35 sobre *E. coli* O157:H7 NCTC12900, los resultados obtenidos evidencian un efecto de menor magnitud que el observado durante los ensayos in vitro (Orihuel *et al.*, 2018b). Esto podría relacionarse con las condiciones tecnológicas evaluadas (16°C, 48 h), que difieren a las aplicadas in vitro (mayor temperatura y tiempo de incubación, 30°C, 96 h) que posiblemente exacerbaban el fenómeno de interacción entre ambos microorganismos. Sin embargo, estos ensayos requieren diferen-

de control del patógeno, como el agregado de agentes naturales como ciertas especias (orégano, pimienta, etc), lográndose un efecto sinérgico o complementario entre ellas, de acuerdo a la teoría de las barreras que contribuirían a la destrucción del patógeno (Leistner, 2000). En nuestro laboratorio continúan los ensayos destinados a ajustar las condiciones a fin de superar la actividad antagonista anti ECEH obtenida, hasta conseguir su eliminación completa. En este sentido, y debido a los resultados favorables obtenidos en los ensayos in vitro con los cultivos mixtos de *Ent. mundtii* CRL35 y *L. plantarum* CRL681, se pretende profundizar los estudios de interacción entre éstos y el patógeno, y evaluar la potenciación de la actividad inhibitoria en escenario real para optimizar la estrategia bioprotectora propuesta.

### CONCLUSIÓN

En este trabajo se abordan estudios de interacción entre una BL y un patógeno como *E. coli* enterohemorrágica, constituyendo un importante aporte a la tecnología de alimentos. La adhesión diferencial de las cepas en estudio a colágeno y laminina sugiere una ventaja competitiva de *Ent. mundtii* sobre adhesión/colonización del alimento. Los resultados en escenario real demostraron tener la misma tendencia a la observada in vitro aunque de menor magnitud, evidenciando un efecto de tipo bacteriostático de *Ent. mundtii* sobre ECEH en las condiciones ensayadas que requerirán un ajuste tecnológico para su aplicación en la industria. Los ensayos in vitro mostraron que *L. plantarum* CRL681 aumentó sig-

nificativamente el efecto inhibitorio de *Ent. mundtii* CRL35 durante el co-cultivo, confirmándose el efecto sinérgico de ambas cepas lácticas. Un cultivo bioprotector constituido por ambas cepas lácticas, activo contra EHEC y *Listeria monocytogenes*, podría tener un impacto eco-sustentable concreto en la industria cárnica nacional.

## REFERENCIAS

- Best, A., R. M. La Ragione, W. A. Cooley, C. D. O'Connor, P. Velge, and M. J. Woodward. 2003. Interaction with avian cells and colonization of specific pathogen free chicks by Shiga-toxin negative *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900). *Vet. Microbiol.* 93:207–222.
- Bonacina, J., Saavedra, L., Suárez, N.E., and Sesma, F. (2014). Draft Genome Sequence of the Nonstarter Bacteriocin-Producing Strain *Enterococcus mundtii* CRL35. *Genome Announc* 2.
- Bonacina, J., Suárez, N., Hormigo, R, et al. 2016. A genomic view of food-related and probiotic *Enterococcus* strains. *DNA research*, 0(0), 1–14, doi: 10.1093/dnares/dsw043).
- Chagnot, C., Agus, A., Renier, S., Peyrin, F., Talon, R., Astruc, T., and Desvaux, M. (2013). In vitro colonization of the muscle extracellular matrix components by *Escherichia coli* O157:H7: the influence of growth medium, temperature and pH on initial adhesion and induction of biofilm formation by collagens I and III. *PLoS ONE* 8, e59386.
- Chen, J., Rossman, M.L., and Pawar, D.M. (2007). Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 249–254.
- Fadda, S., Vignolo, G., Holgado, A.P., and Oliver, G. (1998). Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry-fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. *Meat Sci.* 49, 11–18.
- Fadda, S., Sanz, Y., Aristoy, M., Vignolo, G., Oliver, G., Toldrá, F. (1999). Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 8:3540-3546
- Fadda, S., Chambon, C., Champomier-Vergès, M.C., Talon, R., and Vignolo, G. (2008). *Lactobacillus* role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged Argentinean meat. *Meat Sci.* 79, 603–610.
- Gemelas, L., Rigobello, V., Ly-Chatain, M. H., & Demarigny, Y. (2013). Selective *Lactococcus* enumeration in raw milk. *Food and Nutrition Sciences*, 4(09), 49.
- Giaouris, E (2015) Ability of Foodborne Bacterial Pathogens to Attach to Meat and Meat Contact Surfaces In: *Biofilms in the Food Environment*, Second Edition. Edited by Anthony L. Pometto III and Ali Demirci, 145-175.
- Hsueh, H.-Y., Yueh, P.-Y., Yu, B., Zhao, X., and Liu, J.-R. (2010). Expression of *Lactobacillus reuteri* Pg4 Collagen-Binding Protein Gene in *Lactobacillus casei* ATCC 393 Increases Its Adhesion Ability to Caco-2 Cells. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12182–12191.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 181–186.
- Orihuel A., Bonacina J., Vildoza MJ, Vignolo G, Saavedra L and Fadda S. (2018a) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a meat model using a combination of a bacteriocinogenic strain with curing additives. *Food Research Internationa* 2018, 107, 289-296, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.043>
- Orihuel A., Terán, L., Renaut J., Vignolo, G., De Almeida, A.M, Saavedra, L., Fadda, S. (2018b) Differential proteomic analysis of Lactic Acid Bacteria - *Escherichia coli* O157:H7 interaction and its contribution to strategies of bioprotection in meat. *Frontiers in Microbiology.* 9:1083 |doi: 10.3389/fmicb.2018.01083
- Saavedra, L., Minahk, C., de Ruiz Holgado, A.P., and Sesma, F. (2004). Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH2-terminal sequence. *Antimicrob. Agents Chemother* 48, 2778–2781.
- Salvucci, E., Saavedra, L., and Sesma, F. (2007). Short peptides derived from the NH2-terminus of subclass IIa bacteriocin enterocin CRL35 show antimicrobial activity. *J. Antimicrob. Chemother* 59, 1102–1108.
- Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwivathana A, Benjakul S, Visessanguan W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat science.* 2016;120:118-32.
- Yadav, A.K., Tyagi, A., Kumar, A., Saklani, A.C., Grover, S., and Batish, V.K. (2015). Adhesion of indigenous *Lactobacillus plantarum* to gut extracellular matrix and its physicochemical characterization. *Arch. Microbiol.* 197, 155–164.

**Envolvedora de Pallets.** La gama más completa del país (manuales, automáticas, de brazo rotante)

**Pegadoras de cintas adhesivas.** De acero inoxidable o chapa común

**Cintas transportadoras especiales**

**DG**  
 FÁBRICA DE MÁQUINAS PARA EMBALAJES

**Excelente servicio post venta**

Seguinos en **YouTube**

**Industria Argentina**

Calle 2 N° 970 - Parque Industrial - Sunchales - Santa Fe - Tel./Fax: 03493 421741 / 423441 / 15665765 - ventas@danielgenta.com - www.danielgenta.com