

Tesis
N°:

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

“Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas
con actividad inhibitoria de bacterias implicadas en
enfermedades transmitidas por alimentos”

Por: María Julia Ruiz

Director: Analía Inés Etcheverría

Co-director: Nora Lía Padola

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A.



2019

2019

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

“Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con actividad inhibitoria de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos”

Por: María Julia Ruiz

Director: Analía Inés Etcheverría

Co-director: Nora Lía Padola

Facultad de Ciencias Veterinarias

U.N.C.P.B.A.

Miembros del jurado:

Dra. Fátima Nader

Dr. Marcelo Signorini

Dra. Cristina Monteavaro

Agradecimientos

A mis padres Lucía y Jorge que me formaron en valores y me dieron todo.

A mis abuelos que me acompañan siempre.

A mis hermanos que siempre me apoyan.

A mi directora Dra. Analía Etcheverría por dedicar su tiempo a mi formación con el presente y otros proyectos.

A mi codirectora Dra. Nora Lía Padola por todos los aportes realizados durante mi formación profesional.

A Guillermo Arroyo por su asesoramiento desinteresado.

A Rocío Colello por su valiosa contribución en este proyecto.

A mis compañeras y colegas Jimena, Julia, Juliana, Victoria y Emilia por compartir todos los días.

A Alejandra y Paula por sus consejos.

A Mauro por su ayuda en cada ensayo propuesto.

A María Rosa por su colaboración en la preparación de todo el material.

A Luis Medina Canalejo por aceptarme como pasante y brindarme todo su apoyo.

A Marcelo Rodríguez por la colaboración en el análisis estadístico.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias por brindarme el ámbito para realizar mi trabajo.

A las instituciones que financiaron este proyecto: FONCYT, CIC, SECAT-UNCPBA.

ÍNDICE

Resumen	9
Abstract	11
Palabras clave	13
Abreviaturas	14
Capítulo I: Introducción	16
1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)	18
1.1. Clasificación de las ETA	20
1.2. Síntomas y bacterias implicadas en ETA	20
1.2.a. <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga (STEC).....	21
1.2.a.1. Patogenicidad de STEC	22
1.2.a.2. Prevalencia de STEC en cerdo	25
1.2.b. <i>Salmonella</i> spp.....	25
1.2.b.1. Patogenicidad de <i>Salmonella</i> spp.	27
1.2.b.2. Prevalencia de <i>Salmonella</i> spp. en cerdo.....	28
1.2.c. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
1.2.c.1. Patogenicidad de <i>S. aureus</i>	31
1.2.c.2. Prevalencia de <i>S. aureus</i> en cerdo.....	31
1.3. <i>Biofilms</i> : causa potencial de ETA.....	32
1.4. Consumo de carne de cerdo en Argentina	35
2. Prevención y control de patógenos en la cadena agroalimentaria	36
2.1. Métodos de biopreservación de alimentos	38
3. Bacterias ácido lácticas (BAL) biopreservadoras.....	40
3.1. Evolución del término BAL.....	40
3.2. Características generales de las BAL.....	42
3.3. Clasificación de las BAL	43
3.4. BAL probióticas.....	44
3.4.a. Efecto probiótico potencial	47
3.5. Actividad inhibitoria de BAL	48

3.5.a. Producción de bacteriocinas	50
3.6. Géneros representativos de BAL	51
3.6.a. <i>Lactobacillus</i> spp.	52
3.6.a.1. Actividad antibacteriana de <i>Lactobacillus</i> spp.	53
3.6.a.2. Relevancia de <i>Lactobacillus plantarum</i>	54
3.6.b. <i>Pediococcus</i> spp.	57
3.6.b.1. Actividad antibacteriana de <i>Pediococcus</i> spp.	58
Capítulo II: Hipótesis Objetivos	59
Hipótesis	60
Objetivo general y Objetivos particulares	61
Capítulo III: Diseño Experimental	62
A. Obtención de bacterias.....	63
A.1. Selección de patógenos indicadores.....	63
A.2. Toma de muestra y aislamiento de BAL	63
B. Identificación de los aislamientos por pruebas bioquímicas y métodos moleculares	65
B.1. Pruebas bioquímicas	65
B.1.1. Tinción Gram	65
B.1.2. Movilidad	65
B.1.3. Catalasa	66
B.2. Método genotípico de identificación: PCR	66
B.2.1. Extracción de ADN	66
B.2.2. Selección de iniciadores o <i>primers</i>	67
B.2.3. Mezcla de reacción o cóctel	69
B.2.4. Programa de amplificación	69
B.2.5. Electroforesis y lectura	69
B.3. Cinética de crecimiento.....	70
C. Evaluación de actividad inhibitoria de las BAL	71
C.1. Selección de BAL	71
C.2. Ensayo de inhibición	71
C.3. Identificación genética: Secuenciación de Sanger	73
C.3.1. Extracción de ADN	73

C.3.2. Selección de iniciadores o <i>primers</i>	74
C.3.3. Mezcla de reacción o cóctel	75
C.3.4. Programa de amplificación	75
C.3.5. Purificación de productos de PCR	75
C.3.6. Secuenciación de Sanger	76
C.4. Selección de BAL con mayor potencial inhibitorio	76
C.5. Producción de la sustancia antibacteriana	77
C.5.1. Cinética de producción de la sustancia antibacteriana	77
C.5.2. Concentración de la sustancia antibacteriana	78
C.6. Determinación de la naturaleza química de la sustancia antibacteriana	79
C.6.1. Naturaleza química de la sustancia antibacteriana	80
C.6.1.a. Ensayo I	80
C.6.1.b. Ensayo II	81
C.6.2. Identificación genética de la sustancia antibacteriana	82
C.6.2.a. Detección genética de plantaricinas.....	82
C.6.2.b. Expresión genética de plantaricinas	84
D. Actividad de sustancias antibacterianas concentradas	85
E. Interacción de dos BAL ante bacterias patógenas	87
F. <i>Biofilms</i> : acción de BAL ante bacterias patógenas	89
F.1. Formación de <i>biofilms</i> de BAL	89
F.2. Reducción de <i>biofilms</i> de bacterias patógenas	90
G. Aplicación de <i>L. plantarum</i> en carne porcina	94
G.1. Ensayo I	94
G.1.1. Selección de BAL y bacterias patógenas	94
G.1.2. Preparación de cultivos	95
G.1.3. Preparación de matriz cárnica	95
G.1.4. Lavado de cultivos	95
G.1.4.1. Lavado de <i>L. plantarum</i>	95
G.1.4.2. Lavado de cultivos patógenos	96
G.1.5. Inoculación de patógenos y <i>L. plantarum</i> en matriz cárnica	96
G.1.6. Análisis de muestras de 24 h	98

G.1.7. Análisis de muestras de 48 h	100
G.1.8. Análisis de muestras control	101
G.1.9. Comparación de la cuantificación de bacterias viables	102
G.2. Ensayo II	103
Capítulo IV: Resultados	104
A. Toma de muestra y aislamiento de BAL	105
B. Identificación de los aislamientos pruebas bioquímicas y métodos moleculares	107
B.1. Pruebas bioquímicas	107
B.1.1. Tinción Gram	107
B.1.2. Movilidad	108
B.1.3. Catalasa	108
B.2. Identificación molecular: PCR	108
B.3. Cinética de crecimiento	109
C. Evaluación de la actividad inhibitoria de BAL	112
C.1. Selección de BAL y bacterias patógenas	112
C.2. Ensayo de inhibición	112
C.3. Identificación genética: Secuenciación de Sanger	113
C.4. Selección de BAL con mayor potencial inhibitorio	115
C.5. Producción de la sustancia antibacteriana de <i>L. plantarum</i>	115
C.6. Determinación de la naturaleza química de la sustancia antibacteriana de <i>L. plantarum</i> ...	118
C.6.1. Naturaleza química de la sustancia antibacteriana	118
C.6.1.a. Ensayo I	118
C.6.1.b. Ensayo II	120
C.6.2. Identificación genética de la sustancia antibacteriana	120
C.6.2.a. Detección genética de plantaricinas	120
C.6.2.b. Expresión genética de plantaricinas	121
D. Actividad de sustancias antibacterianas concentradas	122
E. Interacción de dos BAL ante bacterias patógenas	123
F. <i>Biofilms</i> : acción de BAL ante bacterias patógenas	124
F.1. Formación de <i>biofilms</i> de BAL	124
F.2. Reducción de <i>biofilms</i> de patógenos	125

G. Aplicación de <i>L. plantarum</i> en carne porcina	127
G.1. Ensayo I	127
G.2. Ensayo II	128
Capítulo V: Discusión	130
Capítulo VI: Conclusiones	143
Capítulo VII: Referencias Bibliográficas	145
Anexo I	162
Anexo II	167

Resumen

Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA se encuentran las especies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* y *Shigella*, entre otras. La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y se ha demostrado que la contaminación de estos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la microbiota de aves, cerdos y bovinos. Además, estas bacterias, presentan capacidad de formación de *biofilms* lo que implica un potencial riesgo de contaminación de los alimentos a lo largo de la cadena de producción.

Para disminuir el riesgo de infección por patógenos se necesita un control microbiológico estricto en toda la cadena de producción de alimentos. Para ello se han estudiado diversas estrategias como sistemas de biopreservación mediante bacterias ácido lácticas (BAL) o sus metabolitos, tecnologías no térmicas o combinaciones de estas. Las BAL resultan sumamente atractivas para ser utilizadas como herramientas para controlar el crecimiento de patógenos en una gran variedad de alimentos, debido a que son consideradas seguras y se utilizan hace cientos de años a nivel mundial en la producción de alimentos fermentados.

El género *Lactobacillus* spp. y en menor medida *Pediococcus* spp. pertenecen al grupo de las BAL y generan día a día un creciente interés entre microbiólogos y tecnólogos dedicados a descubrir nuevas aplicaciones biotecnológicas y propiedades probióticas. Estas bacterias representan una alternativa para inactivar los patógenos de los alimentos mediante sus metabolitos activos con actividad inhibitoria y brindar así alimentos seguros a los consumidores.

En este trabajo de Tesis se planteó como objetivo aislar y caracterizar BAL de las distintas etapas de la cadena productiva de cerdo y evaluar su capacidad antagónica ante patógenos implicados en ETA, tales como *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), *Salmonella entérica* subsp. entérica serovar Typhimurium (*S. Tiphymurium*) y *S. aureus*. Asimismo, se planteó determinar el efecto inhibitorio en cortes de carne de cerdo mediante el empleo de BAL.

Se tomaron muestras mediante hisopado de las distintas etapas de la cadena productiva porcina: criadero, frigorífico, boca de expendio. De 32 muestras se aislaron en total 63 bacterias, de las cuales

un 38,09% presentaron características fenotípicas y genotípicas correspondientes al género *Lactobacillus* spp. y por secuenciación de Sanger fue posible determinar la especie, siendo *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) y *Pediococcus acidilactiti* (*P. acidilactiti*), las BAL identificadas.

El 95,83% de las BAL presentaron capacidad inhibitoria frente a por lo menos una de las cepas patógenas evaluadas. La actividad antibacteriana de estos aislamientos se atribuye a la producción de metabolitos proteicos tales como bacteriocinas, específicamente las producidas por *L. plantarum* llamadas plantaricinas que fueron detectadas bioquímica y genéticamente en la etapa de crecimiento logarítmico o exponencial. Estos metabolitos con capacidad antibacteriana fueron concentrados por liofilización, permitiendo un mayor carácter inhibitorio ante las bacterias patógenas. Se determinó que los aislamientos de *L. plantarum* estudiados presentan un efecto sinérgico cuando son combinados entre sí y que presentan una acción natural de reducción de *biofilms* de los patógenos implicados en ETA. Finalmente, se determinó la potencial capacidad biopreservadora de *L. plantarum* al reducir la presencia de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* en una matriz cárnica de origen porcino.

Estos resultados indican que los microorganismos aislados representan una potencial alternativa para inactivar a los patógenos en las distintas etapas del procesamiento de la carne de cerdo para mejorar su calidad microbiológica, limitando el número de bacterias patógenas que puedan ingresar en la cadena de producción de alimentos. Esto permitirá brindar alimentos más seguros a los consumidores y un impacto benéfico en la salud pública.

Abstract

Among the bacteria commonly recognized as causing food-borne diseases are species *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* and *Shigella*, etc. The incidence of these diseases is a direct indicator of the hygienic-sanitary quality of the food, and it has been shown that the food contamination can occur during their processing or using contaminated raw material, as some bacteria pathogenic for man form part of the microbiota of birds, pigs and cattle. These bacteria have the capacity to form biofilms, which implies a potential risk of contamination of the food along the production chain.

Strict microbiological control is needed throughout the food production chain. To reduce the risk of infection by pathogens, several strategies have been studied, such as bio-preservation systems using lactic acid bacteria (LAB) or their metabolites, non-thermal technologies or combinations of these. The LAB are extremely attractive to be used as tools to control the growth of pathogens in a wide variety of foods, because they are considered safe and are since used hundreds of years ago worldwide in the production of fermented foods.

The genus *Lactobacillus* spp. and to a lesser extent *Pediococcus* spp. belong to the BAL group and generate day by day a growing interest among microbiologists and technologists dedicated to discovering new biotechnological applications and probiotic properties. These bacteria represent an alternative to inactivate food pathogens through their active metabolites with inhibitory activity and thus provide safe foods to consumers.

In this Thesis the objective was to isolate and characterize LAB from the different stages of the pork production chain and evaluate its antagonistic capacity against pathogens involved in food-borne diseases, such as Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella enterica* subsp. enteric serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) and *S. aureus*. Likewise, it is proposed to determine the inhibitory effect in cuts of pork meat using BAL.

Samples were taken by swabbing at different stages of the pork production chain: breeding center, slaughterhouse, boning rooms, and retail. A total of 63 bacterial strains were isolated from 32 samples, of which 38.09% presented phenotypic and genotypic characteristics corresponding to the

genus *Lactobacillus* spp. and by sequencing of Sanger it was possible to determine the species, being identified *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) and *Pediococcus acidilactiti* (*P. acidilactiti*).

The 95.83% of BAL showed inhibitory capacity against at least one of the pathogenic strains evaluated. The antibacterial activity of these strains is attributed to the production of protein metabolites such as bacteriocins, specifically those produced by *L. plantarum* called plantaricins that were identified biochemically and genetically at the logarithmic or exponential growth stage. These metabolites with antibacterial capacity were concentrated by lyophilization, allowing a greater inhibitory character against pathogenic bacteria. It was determined that the strains of *L. plantarum* studied have a synergistic effect when combined with each other and that they present a natural action of reduction of biofilms of the pathogens involved in food-borne diseases. Finally, the potential biopreservative capacity of *L. plantarum* was determined by reducing the presence of STEC, *S. Tiphymurium* and *S. aureus* in a meat matrix of porcine origin.

These results indicate that the isolated microorganisms represent a potential alternative to inactivate STEC, *S. Tiphymurium* and *S. aureus* in the different stages of pork processing to improve their microbiological quality, limiting the number of pathogenic bacteria that can enter to the food production chain. This will allow providing safer food to consumers and a beneficial impact on public health.

Palabras Clave

Enfermedades transmitidas por los alimentos

Escherichia coli productor de toxina Shiga

Salmonella Tiphymurium

Staphylococcus aureus

Biopreservación

Bacterias ácido lácticas

Inhibición

Plantaricina

Biofilms

Carne porcina

Abreviaturas

μl: microlitro

AcNa/EtOH: Acetato de sodio etanólico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica

aw: Actividad de agua

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

CIC-PBA: Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de Buenos Aires.

CIMg₂: Cloruro de Magnesio

CO₂: Dióxido de Carbono

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

DMSO: Dimetil Sulfóxido

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

D.O.: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: European Food Safety Authority

ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FCV: Facultad de Ciencias Veterinarias

FDA: Food and Drug Administration

Fw: Forward

GRAS: Generally Recognized As Safe

h: hora

HACCP: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IPCVA: Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina

kDa: KiloDalton

LB: Luria Bertani

LPS: Lipopolisacáridos

Mb: Megabase
MRS: Man Rogosa Sharpe
MICAL: Grupo de Investigación Microbiología de los Alimentos, Universidad de Córdoba, España.
ml: mililitro
NaCl: Cloruro de Sodio
OMS: Organización Mundial de la Salud
ONCCA: Oficina Nacional de Control Comercial Agropecuario
PCR: Polymerase Chain Reaction
pH: Potencial de Hidrógeno
QPS: Qualified Presumption of Safety
RENAPRA: Red Nacional de Protección de Alimentos
RNAsa: Ribonucleasa
Rv Reverse
SECAT: Secretaría de Ciencia, Arte y Tecnología
SEE: Sala de Elaboración de Embutidos
seg: segundos
SLC: Sobrenadante libre de células
SRR: Sala de Recepción de Reses
S-S: *Salmonella-Shigella*
STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga
SUH: Síndrome Urémico Hemolítico
TSA: Agar Tripticasa Soya
UFC: Unidades Formadoras de Colonias

CAPÍTULO I
Introducción

A lo largo del tiempo, los sistemas productivos de alimentos, su procesamiento y las preferencias de los consumidores han ido evolucionando. La urbanización y los cambios en los hábitos alimentarios, ya sea por trabajo, viajes, ocio, han multiplicado el número de personas que consumen alimentos preparados en lugares públicos. Dado que la globalización ha potenciado la demanda de una mayor variedad de alimentos, la cadena alimentaria mundial es cada vez más larga y compleja.

El suministro de alimentos inocuos es el fundamento para el desarrollo sostenible de una región. La inversión en salud pública y la seguridad alimentaria y nutricional fortalecen las economías nacionales, el comercio y el turismo (Ruge Garzón, 2018).

El crecimiento de la población mundial, la intensificación e industrialización de la agricultura y la producción ganadera para satisfacer la creciente demanda de alimentos generan oportunidades y dificultades en el control de los alimentos. Se prevé que el cambio climático también incidirá en la inocuidad de los alimentos. La modificación de la temperatura puede modificar los riesgos de contaminación que amenazan la producción, el almacenamiento y distribución de alimentos; como así también la aparición de nuevos patógenos o de cepas microbianas con mayor resistencia (Pérez *et al.*, 2004).

Estos antecedentes implican una responsabilidad para los productores y distribuidores de alimentos en lo que atañe a su inocuidad. Cualquier contaminación que suponga un incidente local puede transformarse rápidamente en emergencias internacionales debido a la velocidad y el alcance de la distribución de los productos. En los últimos diez años se han registrado brotes de graves enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) en todos los continentes y la globalización del comercio ha sido la principal causa de masificación (Saltos Solórzano *et al.*, 2018).

1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las ETA, según el Código Alimentario Argentino (CAA), se definen como un conjunto de síntomas y signos clásicos originados por la ingestión de agua o alimentos contaminados, que contienen agentes patógenos, químicos y/o parásitos en cantidades tales que provocan un efecto nocivo en la salud del consumidor o grupo de consumidores en forma aguda o crónica. Los alimentos involucrados en la producción de ETA pueden ser contaminados en distintos puntos de la cadena productiva (ANMAT, 2011).

La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y se ha demostrado que la contaminación de estos puede ocurrir durante su procesamiento o por el empleo de materia prima contaminada, pues algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la microbiota de aves, cerdos y bovinos (Flores *et al.*, 2005).

Existen numerosos tipos de ETA que presentan diferentes sintomatologías. La ocurrencia de una ETA se produce por la presencia de un patógeno o su toxina en el alimento. Sin embargo, la sola presencia del patógeno no es suficiente para que la enfermedad se desarrolle. Por eso, generalmente en la mayoría de los casos de ETA:

- el patógeno debe estar presente en cantidad suficiente como para causar una infección o para producir toxinas;
- el alimento debe ser capaz de sustentar el crecimiento de los patógenos, o sea, debe presentar características intrínsecas que favorezcan el desarrollo del agente;
- el alimento debe permanecer en la zona de peligro de temperatura durante el tiempo suficiente como para que el organismo patógeno se multiplique y/o produzca toxina;
- debe ingerirse una cantidad (porción) suficiente del alimento conteniendo el agente, para que la barrera de susceptibilidad del individuo sea sobrepasada (OMS, 2018).

Las ETA constituyen un problema sanitario y económico de relevancia mundial. Los alimentos contaminados plantean amenazas para la salud y ponen en peligro la vida de gran cantidad de individuos. Los lactantes, los niños pequeños, las mujeres embarazadas, las personas mayores y las personas con enfermedades subyacentes son particularmente vulnerables (Vesga *et al.*, 2014).

La gran cantidad de casos y brotes asociados a microorganismos patógenos ponen de manifiesto la fragilidad de los programas de protección de alimentos para prevenir y controlar las ETA. Esto aumenta los riesgos de la población de enfermarse y también afecta el comercio nacional e internacional de alimentos. Otro desafío para los sistemas de vigilancia es la de atribuir los casos de ETA a la ingesta de un determinado alimento. Por estos motivos, en la mayor parte de los países o regiones, la verdadera relevancia de las ETA en la población es generalmente desconocida (Engo *et al.*, 2015).

La principal manifestación clínica de las enfermedades transmitidas por alimentos es la diarrea. Las enfermedades diarreicas afectan a nivel mundial, cada año, a unos 220 millones de niños, de los cuales 96.000 mueren. La carga que las ETA imponen a la salud pública, el bienestar social y la economía se ha subestimado a menudo debido a la subnotificación y la dificultad para establecer una relación de causalidad entre las contaminaciones de alimentos y las enfermedades o muertes provocadas por ellas. Pese a las deficiencias de los datos y a las limitaciones de estas estimaciones iniciales, queda de manifiesto que la cantidad de ETA a nivel mundial es considerable y afecta a personas de todas las edades, pero sobre todo a los menores de 5 años y a quienes viven en subregiones del mundo con ingresos bajos (OMS, 2018).

Cada año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recibe informes sobre la ocurrencia de cientos de casos en todo el mundo, y los más frecuentes son aquellos ocasionados por alimentos que sufrieron contaminación biológica. La realidad es que, por distintos medios, los alimentos se pueden contaminar y así convertirse en transmisores de enfermedades, en detrimento de su función esencial como fuente de nutrientes para una buena salud de quien los consume.

Las notificaciones de los casos de ETA en nuestro país han puesto de manifiesto unos 450.000 y 500.000 episodios de diarrea por año. Como sugieren los datos a nivel mundial, entre el 40 y 50% de los casos corresponden a niños menores a 5 años (Barragán, 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, los episodios de diarrea notificados por año vinculados con ETA representan sólo una pequeña porción del número real de casos dado que existe un alto subreporte de los mismos (Tauxe *et al.*, 2010). La OMS estima que el 70% de las diarreas son provocadas por el consumo de alimentos o agua contaminados.

1.1. Clasificación de las ETA

Infecciones alimentarias

Las infecciones alimentarias son enfermedades causadas por la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales. En general, son determinadas por la invasión, multiplicación y alteraciones de los tejidos del huésped producidas por los gérmenes transportados por los alimentos. Infecciones alimentarias tales como salmonelosis, listeriosis, triquinosis, hepatitis A y toxoplasmosis son algunos ejemplos típicos (OMS, 2018).

Intoxicaciones alimentarias

Intoxicaciones alimentarias son las enfermedades producidas al ingerir un alimento que contiene una toxina ya sea formada en tejidos de plantas o animales o producida como producto del metabolismo de los microorganismos. Intoxicaciones tales como botulismo, intoxicación estafilocócica o por toxinas producidas por bacterias tales como *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), hongos o especies marinas como ciguatonina, saxitonina y otras son algunos ejemplos típicos (OMS, 2018).

1.2. Síntomas y bacterias implicadas en ETA

La severidad de una ETA y el período de incubación, es decir el tiempo entre la ingesta del alimento y la aparición de los síntomas, varían en función del agente patógeno y su dosis infectiva, de la cantidad de bacteria ingerida, de la franja etaria y del estado inmunológico del paciente. La manifestación clínica más común de las ETA consiste en la aparición de síntomas gastrointestinales tales como diarrea, malestar estomacal, cólicos estomacales, náuseas, vómitos, fiebre, deshidratación,

calambres, entre otros (Figura 1). Pero estas enfermedades también pueden dar lugar a síntomas neurológicos, ginecológicos e inmunológicos entre otros. La ingestión de alimentos contaminados puede provocar una insuficiencia multiorgánica, incluso cáncer, por lo que representa un riesgo considerable de discapacidad, así como de mortalidad (OMS, 2018).

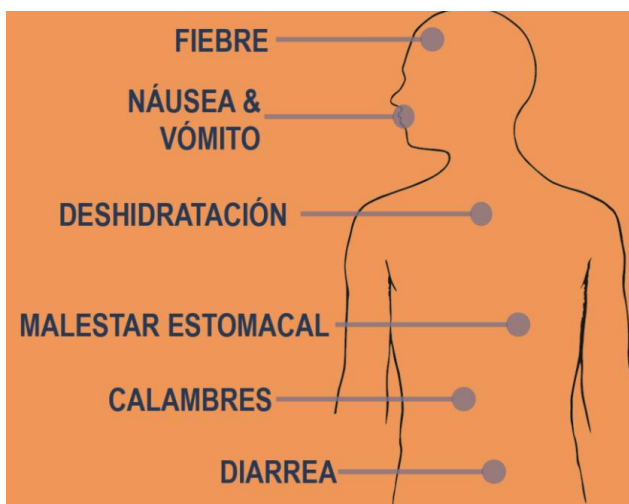


Figura 1: Síntomas generales de las ETA (Shew, 2017)

Las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA corresponden a las especies de los géneros *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), *Salmonella entérica* subsp. entérica serovar Typhimurium (*S. Tiphymurium*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., entre otras (Newell *et al.*, 2010).

1.2.a. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC)

Escherichia coli (*E. coli*) pertenece al orden de las Eubacteriales, familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichieae*, género *Escherichia*, especie *coli* (Kalule, 2017). Fue descrita por primera vez por el bacteriólogo alemán Theodore Von Escherich en 1885, quien la denominó *Bacterium coli*. El nombre de *E. coli* fue adjudicado posteriormente en 1919 en honor a su descubridor (Kaper, 2014).

E. coli es una enterobacteria ubicua que se puede encontrar en diferentes hábitats y generalmente forma parte de la microbiota del hombre y de los animales de sangre caliente. Si la bacteria no ha adquirido elementos genéticos que codifican factores virulentos, actúa como un comensal ayudando a la absorción de nutrientes y al correcto funcionamiento del proceso digestivo. En humanos, coloniza el tracto gastrointestinal de un neonato adhiriéndose a las mucosas del intestino grueso en el plazo de 48 h después de la primera comida (Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas de *E. coli* asociadas con infecciones gastrointestinales, se clasifican en función de la enfermedad clínica que producen y por la identificación molecular de sus factores de virulencia, en seis grupos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998).

STEC es un bacilo, Gram negativo, recto de 1,1-1,5 por 2,0-6,0 μm , puede aparecer aislado o en pares, móvil por presencia flagelos peritricos o inmóvil, oxidasa negativo y fermentador de glucosa y lactosa. Puede vivir en presencia o ausencia de O_2 . En condiciones anaeróbicas tiene un metabolismo fermentativo produciendo ácido y gas. Sin embargo, sino crecen en estas condiciones pueden reducir nitratos a nitritos. Se estima que esta versatilidad le otorga a STEC la habilidad de adaptarse a vivir en el intestino o fuera del mismo. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 35 °C y 42 °C, a 7 °C reduce su crecimiento y a -20 °C continúa siendo viable, pero sin capacidad de desarrollo. La actividad de agua (a_w) que necesita para sobrevivir oscila entre 0,95 y 0,99. Si bien su pH óptimo de crecimiento es entre 6,5 y 7, puede adaptarse a pH tanto ácidos como alcalinos (rango de pH 2,5 a 9,0) (Scheutz y Strockbine, 2005, Shiloach *et al.*, 2010).

1.2.a.1. Patogenicidad de STEC

STEC se caracteriza por la producción de potentes citotoxinas que inhiben la síntesis de proteína en las células. Estas toxinas se conocen con el nombre de Vero-citotoxinas o Shiga-toxinas que son las que dan nombre a las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (Shiga Toxin producing *Escherichia coli* que se suelen denominar por sus siglas en inglés “STEC”) término sinónimo de

VTEC (Verocytotoxin producing *Escherichia coli*) de las cuales existen dos grupos principales: uno que produce la toxina *stx1* y otro la que produce la toxina *stx2* (Strockbine *et al.*, 1986, Soto Varela *et al.*, 2016).

En los años ´70 se reportó por primera vez que cultivos filtrados de algunas cepas de *E. coli* obtenidos de niños con diarrea tenían efecto citotóxico en cultivos de células Vero (Konowalchuk *et al.*, 1977). En EEUU, en el año 1982, después de llevar a cabo el análisis de dos brotes epidemiológicos, se encontró la asociación entre el serotipo O157:H7 y la ingestión de hamburguesas mal cocidas en una cadena de restaurantes de comida rápida (Riley *et al.*, 1983). La evolución en el conocimiento de la virulencia de STEC comenzó a aclararse cuando Karmali *et al.* (1983) observó que las toxinas producidas por STEC eran responsables del síndrome urémico hemolítico (SUH).

Las propiedades virulentas de STEC se relacionan con la diarrea en humanos y otros animales. Algunas cepas causan diarreas hemorrágicas por su agresividad, patogenicidad y toxicidad y en algunos casos el paciente puede desarrollar SUH. La franja etaria más vulnerable incluye a niños entre 6 meses y 6 años. La causa generalmente es la contaminación de alimentos y posterior mala cocción de estos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70 °C o la contaminación cruzada entre alimentos crudos y cocidos por manipuladores, equipamiento o utensilios (Ortega Mafla, 2014).

Hasta el presente, si bien existen otros serotipos de STEC aislados de casos de SUH, diarrea acuosa y sanguinolenta, O157 es el serogrupo más frecuentemente asociado a brotes epidémicos. Argentina tiene la mayor incidencia mundial de SUH. Debido a la importancia del serotipo O157:H7 es común clasificar a STEC en dos categorías: O157 y no-O157 (Imamovic *et al.*, 2010, Gyles, 2007). La dosis de infección de este tipo de microorganismos para producir una toxinfeción alimentaria ha sido estimada en niveles muy bajos, menor a 100 UFC totales.

Actualmente, según los datos aportados por el Ministerio de Salud, nuestro país presenta el registro más alto de casos de SUH a nivel mundial, con aproximadamente 500 casos nuevos declarados anualmente y siendo la media de la incidencia entre 2010-2015 de 8,4 casos por cada 100.000 chicos menores de 5 años, con una tasa de letalidad de 2 a 5% (Rivas *et al.*, 2010, CONICET, 2016).

Se han identificado además de las toxinas, otros factores de virulencia como una proteína denominada intimina, responsable de la lesión de adherencia y borrado del enterocito, y un plásmido que presenta una gran variabilidad genética y codifica entre otros factores, una hemolisina

enterohemorrágica (EhxA), una serinproteasa (EspP), una proteína autoaglutinante (Saa), una proteína Sab que participaría en la adherencia y la formación de *biofilms* (Farfán-García *et al.*, 2016).

El antecedente principal de infecciones por STEC es el contacto directo o indirecto con heces de rumiantes (O'Brien *et al.*, 2001). En el frigorífico generalmente la contaminación se produce durante la evisceración como consecuencia de la ruptura de segmentos del tracto gastrointestinal. Otra fuente importante de contaminación de las reses durante la faena en el frigorífico es el cuero debido a que existe una alta correlación entre la presencia de *E. coli* O157:H7 en heces y en cuero con la contaminación de las carcasas (Elder *et al.*, 2000) (Figura 2). El cerdo en menor medida también es considerado reservorio de STEC. Se ha detectado su presencia a lo largo de la cadena productiva de carne porcina, incrementándose desde la granja hasta el consumidor (Colello *et al.*, 2018).

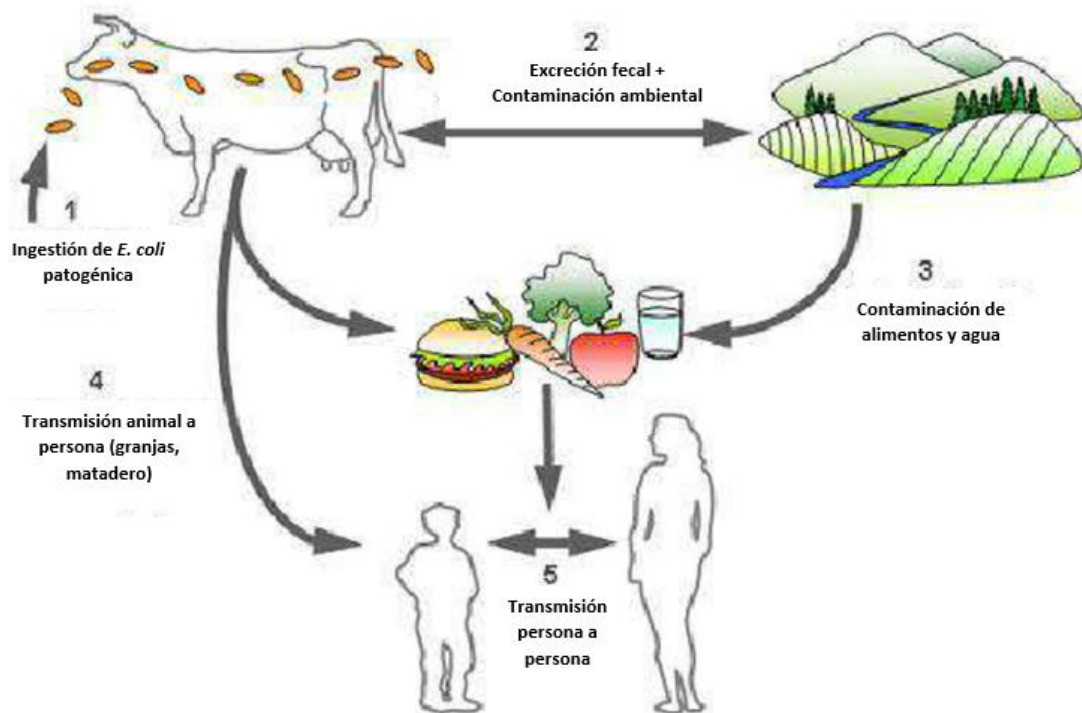


Figura 2: Ciclo de transmisión de STEC del rumiante al hombre (Desmarais, 2016).

1.2.a.2. Prevalencia de STEC en cerdo

STEC se transmite principalmente por ingestión de alimentos contaminados con heces de rumiantes. Durante el proceso de faena o en la manipulación posterior, la superficie de las carnes puede ser contaminada. Las carnes picadas son uno de los productos de mayor riesgo. Esto se debe a que, durante el picado, la bacteria pasa de la superficie de la carne al interior del producto donde es más difícil que alcance la temperatura necesaria para eliminarla durante la cocción (ANMAT, 2018).

Las prevalencias en granjas de cerdos de distintas categorías varían en un rango del 0 al 20%. En Argentina se estudiaron 28 criaderos en la región central del país, en ningún animal se detectó cepas STEC, pero si cepas que poseían factores de virulencia tanto para ETEC y STEC (Parma *et al.*, 2000). En un estudio realizado en 11 granjas de producción porcina ubicadas en las provincias de Buenos Aires y Santa Fé, se analizaron 21 STEC aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea y 7 de ellas presentaron al gen *vt1* y 14 *vt2* (Moredo, 2012). En cuanto a la prevalencia en hisopados de canales en frigoríficos varían en un rango de 0,2% a 26% en diferentes regiones del mundo (Leung *et al.*, 2001, Bouvet *et al.*, 2002, Bohaychuk *et al.*, 2011, Koláčková *et al.*, 2014). Los porcinos son reservorios de STEC, y su contaminación originada en las granjas se transfiere de los cerdos a las canales, y con el procesamiento de las mismas, en el desposte aumenta en los diferentes cortes de carne, llegando a la boca de expendio (Colello, 2018).

1.2.b. *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* spp. pertenece al orden de las *Eubacteriales*, familia *Enterobacteriaceae* (Popoff y Le Minor, 2005). El bacteriólogo Daniel E. Salmon aisló y describió por primera vez *Salmonella* a partir del intestino de porcinos en 1885 (Salmon y Smith, 1886).

Debido a la distribución ubicua de *Salmonella*, el creciente número de serovariedades, el amplio rango de hospedadores y su compleja patogénesis, que involucra a humanos, animales y medio

ambiente, la salmonelosis tiene una gran prevalencia en poblaciones humanas y animales, convirtiéndola en una de las ETA zoonóticas más frecuentes en el mundo (Mead, 2000).

Salmonella spp. es una bacteria que se comporta como patógeno intracelular facultativo. Es un bacilo gramnegativo, de 0,7-1,5 x 2-5 µm, anaerobio facultativo, con flagelos peritricos, no desarrolla cápsula. Produce ácido sulfhídrico (H₂S) y emplea glucosa (a excepción del serotipo Typhi) con formación de ácido o ácido y gas mediante los procesos de oxidación y fermentación por poseer una enzima especializada, pero no utiliza lactosa y no produce ureasa. Es catalasa y oxidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito y tolera altas concentraciones de sales biliares. Generalmente es móvil por flagelos peritricos. Las colonias generalmente tienen de 2-4 mm de diámetro. Es capaz de crecer en un rango de temperatura de 5 a 47 °C, siendo la temperatura óptima de 35-37 °C. El pH óptimo de crecimiento es de 7, soportando un rango de 4,5-9 (Popoff y Le Minor, 2005).

El tratamiento taxonómico actual ha simplificado el espectro de *Salmonella*, reagrupando todas las cepas, patógenas o no en dos únicas especies *Salmonella entérica* (*S. entérica*) y *Salmonella bongori* (*S. bongori*). Ésta última no es patógena para el ser humano. La especie *S. entérica* tiene las subespecies: *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houteneae* e *indica*. Cada subespecie a su vez está conformada por varios serovares, habiéndose identificado alrededor de 2579 (Grimont y Weill, 2007).

Las cepas de *Salmonella* de mayor importancia médica pertenecen a la subespecie *entérica* y corresponden al serovar Typhi, Paratyphi y Typhimurium (Le Minor y Popoff, 1987).

Dependiendo del grado de adaptación a un hospedador o ambiente específico se pueden clasificar en:

- serotipos adaptados al hombre (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B, C y *S. Sendai*): provocan infecciones en humanos, pero rara vez afectan a los animales. La infección se produce por contacto con heces de personas enfermas o portadores asintomáticos y se transmite a través de agua, alimentos e insectos;

- serotipos adaptados a los animales: como *S. Pullorum* y *S. Gallinarium* (pollos y gallinas), *S. Abortus-ovis* (ovinos), *S. Choleraesuis* (cerdos) y *S. Dublin* (bovinos). Estos dos últimos serotipos pueden afectar tanto a animales como a humanos;

- serotipos no adaptados a hospedadores específicos: son la mayoría y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza.

1.2.b.1. Patogenicidad de *Salmonella* spp.

Salmonella spp. es un agente productor de ETA de distribución universal. El hábitat natural de esta especie normalmente es el intestino de los animales y los seres humanos. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación en el procesado de alimentos, en el hogar o a través del agua. La salmonelosis es una enfermedad aguda de importancia tanto en salud pública como en salud animal. Puede ser asintomática lo que genera un gran problema ya que es altamente contagiosa (Zhang *et al.*, 2003). El tamaño del inóculo de *Salmonella* requerido para causar enfermedad sintomática en adultos sanos no está bien establecido, en general, es necesaria una inoculación relativamente grande, entre 10^5 y 10^6 UFC/g. Al ser estas bacterias muy poco resistentes a los medios ácidos, no sobreviven en el estómago. Aquellas que llegan hasta el intestino, se enfrentan con otras líneas de defensas: la rapidez del tránsito intestinal y la microbiota las que logran vencer estas defensas, se adhieren a la mucosa y producen diarrea aguda acuosa o una enfermedad clínica conocida como fiebre entérica, fiebre tifoidea o fiebre paratifoidea (Coburn *et al.*, 2007).

Salmonella spp. invade las células de huésped por un mecanismo conocido como disparo (*trigger*) (Figuroa Ochoa y Verdugo Rodríguez, 2005). Su capacidad para adherirse y entrar en las células del epitelio intestinal es un paso esencial en el ciclo de vida de estos microorganismos (Figura 3). Presenta múltiples genes involucrados en la invasión, por ejemplo, el gen *invA*, codificado en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1), que, a su vez, codifica para un sistema de secreción tipo III requerido para la estimulación de la respuesta celular que conduce a la penetración de la bacteria en las células epiteliales, iniciación de apoptosis en macrófagos y producción de citoquinas pro-inflamatorias por células epiteliales (Zhang *et al.*, 2003).

Específicamente *S. Typhimurium* se encuentra predominantemente en la luz intestinal. Su toxicidad se debe al LPS de la membrana externa que protege a las bacterias de las condiciones adversas del medio ambiente. El LPS está compuesto de un antígeno O, un núcleo de polisacárido y

un lípido A, que lo conecta a la membrana externa. El lípido A está formado por dos glucosaminas fosforiladas que están unidas a los ácidos grasos. Estos grupos fosfato determinan la toxicidad bacteriana. Los animales portan una enzima que elimina específicamente estos grupos fosfato como mecanismo de protección ante estos patógenos (Tuin *et al.*, 2006). El antígeno O, que se encuentra en la parte externa del complejo LPS, es responsable de la respuesta inmune del huésped. *S. Typhimurium* tiene la capacidad de someterse a la acetilación de este antígeno O, de esta forma, cambia su conformación, e impide el reconocimiento por los anticuerpos del huésped (Slauch *et al.*, 1995).

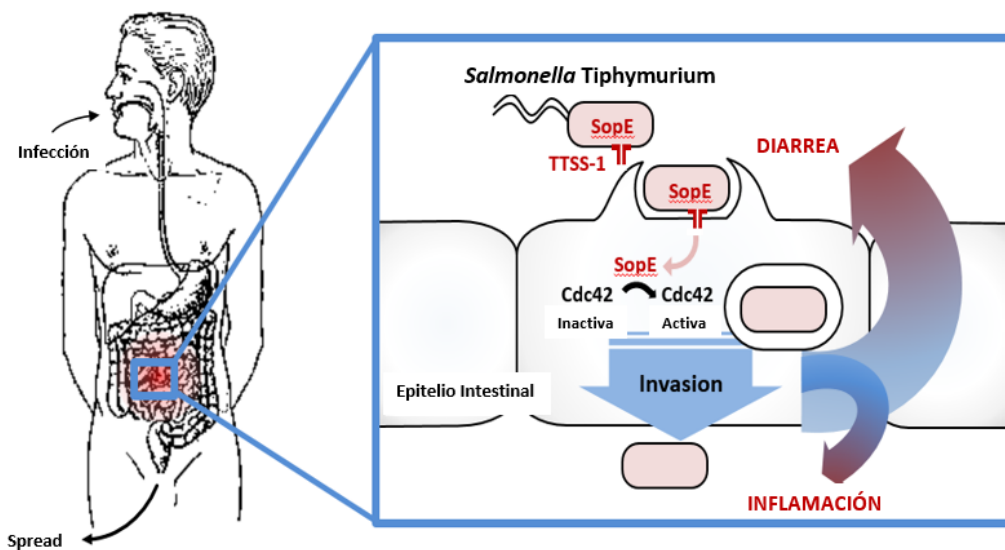


Figura 3: Rol de *S. Typhimurium* en la inducción de enterocolitis

1.2.b.2. Prevalencia de *Salmonella* spp. en cerdo

Salmonella spp. es uno de los patógenos más común transmitido por los alimentos y ampliamente distribuidos en el mundo. *S. Typhimurium* es el segundo serovar más aislado. Los estudios epidemiológicos de toda la cadena porcina son todavía escasos en Argentina, desconociéndose la importancia global que tiene *Salmonella* spp. en la población porcina del país y en los distintos eslabones de la cadena porcina (Colello, 2018).

En las provincias de Buenos Aires y Santa Fe se realizó un estudio para determinar la prevalencia de *Salmonella* en cerdos de faena y se obtuvieron 93 cepas de *Salmonella enterica* de las 386 muestras procesadas (24,1%), de las cuales 52 (55,9%) fueron de contenido cecal y 41 (44,1%) de nódulo linfático ileocecal (Ibar *et al.*, 2009). En San Luis, se analizaron un total de 90 salchichas de cerdos, de los cuales el 22,3% fueron positivas a *Salmonella* spp. (Favier *et al.*, 2013). Los datos provistos por Argentina al programa internacional de la OMS indican que *S. Typhimurium* es el principal serotipo identificado tanto en muestras de origen animal, como en muestras de heces de personas denotando la importancia de este serotipo en la Salud Pública. Una de las principales fuentes de *Salmonella* spp. en los productos cárnicos porcinos provienen de los cerdos infectados asintomáticamente (Vico, 2014).

Numerosos estudios demuestran la prevalencia de *Salmonella* en granjas, cerdos de faena o terminación, frigoríficos y carnes de cerdos. Entre el 30 y el 60% de las granjas en EEUU están infectadas con al menos un serovar de *Salmonella* (Rodríguez y Suárez, 2014). En Canadá, el 83,3% de las granjas analizadas fueron reportadas como positivas, con el 13,3% de los cerdos infectados (Rajic *et al.*, 2007). En Europa numerosos estudios reportan la prevalencia de *Salmonella* en cerdos va del 11 al 40%, esto se debe a que en los últimos 10 años la carne de cerdo ha sido identificada como la segunda fuente más importante de Salmonelosis humana (Bonardi *et al.*, 2013, Andres y Davies, 2015, EFSA, 2015). Hay reportes a nivel mundial en los cuales se estudian los cerdos prefaena, canales en frigoríficos y carne de cerdo. En un estudio realizado en Rumania se aislaron cepas de *Salmonella*, lo que representaba un 22,9% de las muestras analizadas, de las cuales 48 procedían de muestras de carne de cerdo (32,21%) (Mihaiu *et al.*, 2014). En Italia el 10,8% de canales estudiadas fueron positivas a *Salmonella* spp. (Bonardi *et al.*, 2013). Por otro lado, en China, se estima que aproximadamente el 20% de los casos de ETA son causados por *Salmonella*, dentro de las cuales la carne de cerdo ha sido la fuente más importante de infección (Yang *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2013). El cerdo es reservorio de *Salmonella* spp. y la contaminación con esta bacteria en las granjas podría transferirse a las canales y con el procesamiento de estas a los diferentes cortes de carne, llegando a la boca de expendio (Colello *et al.*, 2018).

1.2.c. *Staphylococcus aureus*

S. aureus pertenece al orden *Bacillales*, Familia *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus*, especie *aureus*. *Staphylococcus* proviene del griego *staphyle*: racimo, denominación otorgada por Alexander Ogston en 1880, quien aisló estas bacterias de abscesos con pus. *S. aureus* es la especie de estafilococo más virulenta para el hombre. Es un agente etiológico que causa intoxicaciones alimentarias frecuentes debido al consumo de alimentos en los que esta bacteria se ha multiplicado y producido enterotoxinas (Torrens *et al.*, 2015).

Es un microorganismo oportunista que forma parte de la microbiota de la piel y de las mucosas del hombre y de los animales (Pinchuk *et al.*, 2010).

S. aureus es una bacteria con forma de coco de 0,5-1,5 μm de diámetro (Figura 4), es Gram positiva, inmóvil, aerobia o anaerobia facultativa y no formadora de esporos. Fermenta la glucosa con producción de gas y es catalasa positiva. Crece en un rango de temperatura de 6 y 46 $^{\circ}\text{C}$, con un óptimo de 30 a 37 $^{\circ}\text{C}$ y un pH de entre 4 y 9,8. Es tolerante a altas concentraciones de sal, resistiendo hasta un 10% de NaCl (Le Loir *et al.*, 2003, Becker *et al.*, 2015) Se agrupa en “racimos de uvas” debido a su capacidad de dividirse en tres planos.



Figura 4: Micrografía electrónica de barrido de *S. aureus* (da Silva *et al.*, 2017)

1.2.c.1. Patogenicidad de *S. aureus*

S. aureus suele estar presente en la piel y en las membranas mucosas sin llegar a causar infección, pero cuando penetra en los tejidos puede ocasionar una amplia gama de afecciones debido a la producción de enzimas extracelulares llamadas toxinas. Son responsables de gran variedad de enfermedades, entre ellas, osteomielitis, conjuntivitis, artritis, sinusitis, meningitis, bronquitis, neumonía, enterocolitis. Se considera que entre el 20% y el 40% de los adultos sanos son portadores asintomáticos, lo que constituye un serio problema como fuente de infección (Casas *et al.*, 2011).

Los alimentos contaminados pueden ser también causa de infección por *S. aureus* (Calderini *et al.*, 2015). La intoxicación en el hombre se produce por consumo de alimentos en el que el microorganismo se ha multiplicado y producido enterotoxinas (SE). Las SE constituyen un grupo heterogéneo de proteínas solubles en agua que presentan un peso molecular bajo que oscila entre 26 kDa y 30 kDa. Estas toxinas provienen de cepas específicas, aunque una cepa de *S. aureus* puede sintetizar múltiples SE. Han sido identificadas hasta la fecha 20 tipos diferentes de SE, asignándoles siglas desde SEA hasta SEU, codificadas por los genes respectivamente: *sea* hasta *seu* (Mehrotra *et al.*, 2000). Las SE son termorresistentes, algunas pueden mantenerse estables incluso al calentar los alimentos a más de 100 °C durante 30 min y son resistentes a la hidrólisis por enzimas gástricas y pancreáticas. Se cree que el mecanismo de acción de algunas, consiste en actuar como superantígenos, con la subsecuente liberación de citocinas responsables de los síntomas (Murray *et al.*, 2009).

Generalmente se asume que las cepas productoras de coagulasa y termonucleasa son enterotoxigénicas, no obstante, la *Food and Drug Administration* (FDA) establece que la sola presencia de grandes cantidades de *S. aureus* en los alimentos no constituye evidencia suficiente para incriminar un alimento como causante de intoxicación (Figuroa *et al.*, 2002).

1.2.c.2. Prevalencia de *S. aureus* en carnes

El principal reservorio de *S. aureus* es la piel y la mucosa, se estima que entre 30 y 40% de la población humana, todos los animales de sangre caliente y las aves son portadores y más del 60%

puede ser colonizado transitoriamente (Argudín *et al.*, 2010, Kong *et al.*, 2016). Los manipuladores pueden ser portadores o llevarlos en sus manos a los alimentos. Su presencia en los alimentos se podría deber a una inadecuada manipulación o al empleo de materias primas contaminadas pudiendo contaminar los alimentos durante su preparación y elaboración. Los alimentos implicados son carnes y subproductos, tales como jamón, leche y derivados, ensaladas, productos de panadería particularmente en crema pastelera y sándwich.

Los orígenes de la intoxicación por *S. aureus* difieren entre los distintos países, lo que puede deberse a diferencias en los hábitos de consumo y alimentación en cada uno (Le Loir *et al.*, 2003). Los porcentajes de prevalencias varían ampliamente en alimentos listos para consumir y carnes de distintas especies como bovino, pollo, pavo y cerdo. Estas variaciones son de un 7% a 70%, en donde el porcentaje de detección de toxinas varía de un 0 a un 30%, donde la más prevalente es la toxina SEA (Moon *et al.*, 2007, Zargar *et al.*, 2014). La prevalencia en cortes de carne de cerdo a nivel mundial varía de 45 a 70%. Estas variaciones se podrían deber a las diferencias geográficas, al ambiente, cepas naturales circulantes y los alimentos consumidos en cada región (Zargar *et al.*, 2014) y se estima que la prevalencia de este patógeno aumenta con el procesamiento de la carne de cerdo desde la granja hasta llegar al consumidor (Colello, 2018).

1.3. *Biofilms*: causa potencial de ETA

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos formas o estados: bacterias planctónicas, de libre flotación y bacterias que forman *biofilms* o comunidades, que son aquellas que cuando se enfrentan a una superficie, se adhieren a ella y a continuación, elaboran señales químicas para coordinar dichas comunidades (Davey y O'toole, 2000). Recientemente, dos grandes avances han incrementado sustancialmente la comprensión de los *biofilms*, el microscopio láser confocal y la investigación de los genes involucrados en la adhesión celular y la formación de *biofilms* (Nazar, 2007).

Los *biofilms* están estructurados principalmente por grandes colonias de bacterias incrustadas en una matriz polimérica extracelular o glicocálix (Chole y Faddis, 2003). Aunque la composición del *biofilms* es variable en función del sistema en estudio, en general, su componente mayoritario es el

agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total (Lasa *et al.*, 2005). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como polisacáridos, proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Davey y O'toole, 2000).

El ciclo vital del *biofilm* es un proceso dinámico que puede ser dividido en 3 etapas: adhesión, crecimiento y separación o desprendimiento (Lasa *et al.*, 2005) (Figura 5). La etapa inicial del proceso es la adherencia sobre la superficie, que dependerá del tipo de bacteria. En las bacterias gramnegativas se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y curli son importantes para la etapa de adherencia primaria. La motilidad permite que la bacteria alcance la superficie y contrarreste las repulsiones hidrofóbicas. En el caso de las bacterias grampositivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtlE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia primaria. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión formando una microcolonia. Se ha descrito además que la adhesión de bacterias a una superficie ocurrirá fácilmente en aquéllas que presentan rugosidad e hidrofobicidad. En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del *biofilms* y forma estructuras similares a setas (*mushrooms*) entre las cuales se observa la presencia de canales (Lasa *et al.*, 2005). En la etapa final las bacterias de la matriz del *biofilms* se liberan del mismo para colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de formación.

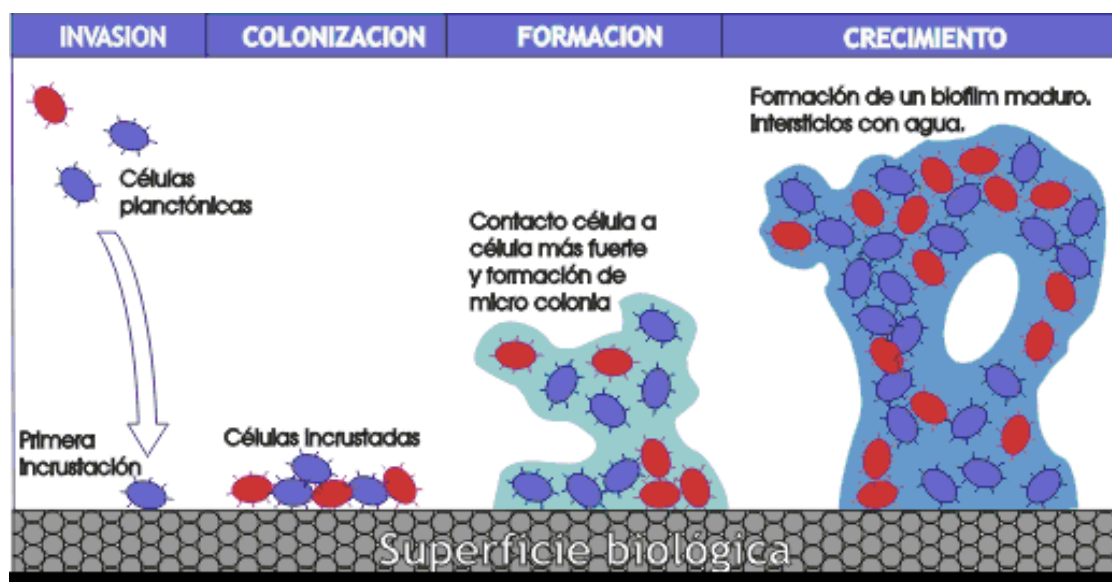


Figura 5: Ciclo de formación de *biofilms* (Mendoza y Esp, 2004)

La capacidad de crear *biofilms* no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formarlos (Jones, 2009). Las bacterias patógenas tienen también la capacidad de adherirse y formar *biofilms* en diversos sistemas incluyendo la industria alimenticia, donde crean una fuente permanente de contaminación del alimento. Las zonas de duchas, de intercambio de calor, refrigeradores o grietas de superficies resultan ser sitios de potencial formación de *biofilms*, ya que son el microhábitat perfecto.

La matriz orgánica de un *biofilms* proporciona a los microorganismos una barrera protectora extraordinaria frente a agresiones externas. Se estima que los microorganismos presentes en un *biofilms* pueden ser 1.000 veces más resistentes a los desinfectantes convencionales que las bacterias en estado planctónico. Esto puede conducir al desarrollo de enfermedades como así también a pérdidas económicas debido al rechazo del producto (Serra, 2003).

Los *biofilms* formados sobre las carnes crudas y en el entorno del manipulador (superficie, utensilios, instrumentos) aumentan la posibilidad de producir contaminación cruzada y contaminaciones posteriores en el procesado. Por este motivo es preciso eliminar todos los microorganismos de las superficies de contacto con los alimentos, antes de que establezcan un *biofilm* que les servirá de reservorio (Serra, 2003). Además del riesgo de contaminación, el desarrollo de *biofilm* puede interferir en diferentes procesos y causar daños en equipos. En sistemas de agua potable, estas comunidades pueden obstruir las cañerías disminuyendo su velocidad y capacidad de transporte originando un incremento en el consumo energético. En las superficies metálicas pueden causar corrosión debido a la producción de ácido por parte de las bacterias (Chmielewski y Frank, 2003).

Dichas contaminaciones pueden ser provocadas por numerosas especies de microorganismos de deterioro, como así también patógenos, entre los que se destacan: STEC, *Salmonella* spp. y *S. aureus*.

Las bacterias, sobre todo patógenas, pueden adherirse a casi cualquier tipo de superficie, como plástico, metal, vidrio, madera, partículas del suelo y productos alimenticios (Gandhi y Chikindas, 2007). Por lo tanto, en la industria alimentaria, resulta fundamental su tratamiento ya que podrían derivar en ETA. La OMS determina que las ETA vinculan a *biofilms* y trastornos digestivos debido a una posible contaminación cruzada durante el proceso de producción de alimentos. De esta manera, se puede establecer una relación entre los microorganismos que habitan en una planta de producción y

el alimento que se produce en la misma. Esto pone en riesgo la salud de los consumidores y el renombre de la empresa que ha expedido los alimentos en cuestión (Gómez *et al.*, 2016).

1.4. Consumo de carne de cerdo en Argentina

La carne de cerdo es un alimento ampliamente consumido en el mundo, sin embargo, posee características particulares que favorecen el crecimiento de numerosos microorganismos, por lo que la manipulación inadecuada aumenta el riesgo de enfermar a los consumidores (Colello *et al.*, 2018).

Los principales países que exportan carne de cerdo al mundo son EE. UU. con el 33,5 %, Unión Europea (31,5 %), Canadá (17,3 %) y Brasil (8,4 %). Argentina participa con el 0,09 % del volumen de carne que se exporta a nivel mundial (Brunori, 2013).

Según datos obtenidos de la Oficina Nacional de Control Comercial Agropecuario (ONCAA) en los últimos años se ha registrado un incremento en la producción y consumo de carne de cerdo en nuestro país. Asimismo, cabe recordar que el consumo por habitante de carne vacuna se mantuvo siempre muy elevado en términos absolutos (superior a 60 kg/hab/año) siendo el más alto del mundo, y en las últimas décadas en nuestro país se produjeron cambios de precios relativos y de gustos, a partir del desarrollo de carnes alternativas, como la aviar (IPCVA, 2013).

Por otra parte, cambios dinámicos, socioeconómicos y tecnológicos en la producción y preferencias del consumidor por nuevas y rápidas formas de alimentación, representan oportunidades para que los microorganismos contaminen los alimentos. La carne ofrece un sustrato ideal para el desarrollo de microorganismos, incluyendo algunos patógenos (Cornellá, 2018).

Por estas razones, las estrategias de conservación de los alimentos deben asegurar que el crecimiento microbiano no represente un problema de seguridad alimentaria. Entonces surge la necesidad de utilizar nuevas alternativas que permitan obtener alimentos protegidos naturalmente, que den solución a problemas de este tipo aportando un mayor beneficio a los eslabones de la cadena de elaboración de productos cárnicos incluido el receptor final que es el consumidor (Villalobos *et al.*, 2018, Torres Rubio, 2018).

2. Prevención y control de patógenos en la cadena agroalimentaria

El riesgo de infección por patógenos a lo largo de la cadena de producción de alimentos podría ser disminuido mediante la aplicación de un control microbiológico estricto. El manejo de aquellos factores que impiden la persistencia de patógenos productores de ETA en la cadena alimentaria ayuda a reducir los riesgos para la salud pública.

La identificación de los puntos críticos de control, la aplicación de buenas prácticas de higiene, de agricultura y de manufactura, el control de parámetros críticos en la elaboración de alimentos como temperatura de cocción y almacenamiento, valor del pH y actividad de agua, mejoran la calidad higiénico-sanitaria de la cadena desde la granja al consumidor (Sofos, 2008).

La reducción de la carga de bacterias patógenas que puedan transmitirse a través de los alimentos representa un desafío en los sistemas de producción de alimentos. Para ello se han planteado numerosas estrategias:

- La descontaminación de las canales puede mejorar la seguridad microbiológica. Es natural e inevitable que, durante la faena, se contaminen las canales, entonces la producción de carne libre de patógenos no se puede garantizar. Por lo tanto, la descontaminación mediante la utilización de ácidos orgánicos, biopreservadores, peróxido de hidrógeno, ozono o pasteurización de utensilios, representa una alternativa de control de patógenos (Edwards y Fung, 2006).

- Las estrategias de prevención para evitar la contaminación y proliferación de bacterias patógenas en los productos cárnicos deberían comenzar dentro del establecimiento productor y no solo tienen que ser implementadas en la faena. El uso de probióticos, la aplicación de mejoras en el manejo de los animales y el desarrollo de nuevas vacunas, son algunas de las estrategias propuestas para disminuir la incidencia de ETA a través del control en los animales. Teniendo en cuenta las diferentes vías por las cuales el hombre puede tomar contacto con materia fecal de los animales, las estrategias de intervención que se focalicen en el animal en pie, antes de la faena, serán de gran impacto en el mejoramiento de la seguridad de los alimentos (Sofos, 2008, LeJeune y Wetzel, 2007).

- Las frutas y hortalizas son un fuente de transmisión de patógenos, es por ello que se debe evitar el uso de abono con materia fecal sin tratar, regar con agua segura, limitación del acceso de animales domésticos y silvestres a la zona de cultivo (Johannessen *et al.*, 2004). Existen algunos

métodos para transformar estos desechos y reducir los microorganismos patógenos, tales como los tratamientos activos o pasivos. Entre los tratamientos activos se encuentran la pasteurización, el secado por calor, la digestión anaeróbica, la estabilización con álcalis, la digestión aeróbica, o una combinación de estos. La conversión en abono es el proceso activo normalmente utilizado para reducir el riesgo microbiano en la materia fecal no tratada. Cuando dicha conversión se lleva a cabo bajo el debido control y se logran las condiciones necesarias, el riesgo de contaminación microbiana por la materia fecal animal convertido en abono es menor que la materia fecal no tratada. En los tratamientos pasivos, la materia fecal se almacena bajo condiciones ambientales naturales y se somete a variaciones de temperatura, humedad y radiaciones propias del sitio de almacenamiento. Antes de ser aplicada a los campos de cultivo, la materia fecal debe almacenarse por un tiempo suficientemente largo para lograr su descomposición y la depuración de microorganismos patógenos (FDA, 1998).

- El agua puede ser también vehículo para la transmisión de las ETA, por eso la utilización de agua potable para bebida y el tomar baños solo en aguas recreacionales habilitadas, son medidas fundamentales de prevención para los consumidores (Ashbolt, 2004).

Las 5 claves de inocuidad de los alimentos para los consumidores propuesta por la OMS son:

- Mantenga la limpieza de la cocina.

En la tierra, el agua, los animales y el hombre se encuentran microorganismos peligrosos que pueden contaminar los alimentos mediante el solo contacto con las manos, los utensilios, ropa, trapos de limpieza, esponjas y cualquier otro elemento que no ha sido adecuadamente higienizado.

- Separe siempre los alimentos crudos y los cocinados.

Los alimentos crudos, especialmente carne, pollo y pescado y sus jugos podrían estar contaminados con microorganismos peligrosos potencialmente transferibles a otros alimentos, tales como comidas cocinadas o listas para su consumo, ya sea, durante su preparación o conservación.

- Cocine completamente los alimentos.

La correcta cocción mata casi todos los microorganismos peligrosos. Estudios enseñan que cocinar el alimento tal que todas las partes alcancen 70 °C, garantiza la inocuidad de estos alimentos para el consumo. Existen alimentos, como trozos grandes de carne, pollos enteros o carne molida, que requieren especial control de la cocción. El recalentamiento adecuado mata los microorganismos que puedan haberse desarrollado.

- Mantenga los alimentos a temperaturas seguras.

Algunos microorganismos pueden multiplicarse muy rápidamente si el alimento es conservado a temperatura ambiente, pues necesitan nutrientes, humedad, temperatura y tiempo para reproducirse. Por debajo de los 5 °C o encima de los 60 °C el crecimiento microbiano se hace más lento o se detiene. Algunos microorganismos patógenos pueden todavía crecer en temperaturas bajo los 5 °C.

- Use agua y materias primas seguras.

Las materias primas, incluyendo el agua, pueden contener no sólo microorganismos sino también químicos dañinos. Es necesario tener cuidado en la selección de los productos crudos y tomar medidas de prevención que reducen el peligro, como el lavado y pelado de los mismos.

Debido a la intensificación en la producción animal, el cambio en el procesamiento y distribución de los alimentos y las exigencias internacionales para su comercialización, estos retos se vuelven de mayor relevancia.

2.1. Métodos de biopreservación de alimentos

Para disminuir el riesgo de infección por patógenos y la potencial producción de ETA, se necesita un control microbiológico estricto en toda la cadena de producción de alimentos. Para inactivar los patógenos de los alimentos se han estudiado diversas estrategias como por ejemplo sistemas de biopreservación, tecnologías no térmicas o combinaciones de estas.

En la industria alimentaria se emplea una gran cantidad de conservantes químicos como el ácido benzoico, el ácido sórbico, el anhídrido sulfuroso, los nitritos y nitratos, entre otros. El inconveniente en la utilización de estos compuestos recae en que la inocuidad en algunos casos no se encuentra mundialmente admitida e incluso se les asocia a enfermedades. De forma alternativa, existen conservantes alimentarios de origen biológico, como los ácidos orgánicos y otros compuestos metabólicos como ácido láctico y acético, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, bacteriófagos, entre otros (Durán, 2001).

La bioconservación permite alargar la vida útil y la inocuidad de los alimentos mediante la utilización de microorganismos reconocidos como seguros por las autoridades y/o de sus metabolitos con el objetivo de inhibir el desarrollo de microorganismos ya sea, alterantes o patógenos en los alimentos. La finalidad es obtener alimentos con óptimas condiciones higiénico-sanitarias y que tengan un menor procesamiento, lo que los consumidores perciben como “más natural” (Sáez Orviz, 2016).

La aplicación de estrategias de biopreservación puede ser llevada a cabo de diferentes maneras (Heredia-Castro *et al.*, 2017):

- Mediante la adición de cepas en el producto alimenticio y favoreciendo la velocidad de crecimiento, de modo que actúen en competencia y eviten el desarrollo de microorganismos autóctonos potencialmente alterantes o patógenos.

- Mediante la aplicación de las sustancias antimicrobianas purificadas, producidas previamente por bacterias lácticas en un medio de cultivo específico.

- Mediante la adición de un cultivo concentrado de células con características protectoras.

- Mediante el agregado de bacterias lácticas mesófilas, de modo que sirvan como un “sistema de seguridad” cuando se produce una exposición del alimento a un aumento de temperatura no previsto.

Es importante hacer una distinción entre un cultivo protector o biopreservador y un cultivo *starter*. En este último, la producción de determinados compuestos y enzimas tienen una finalidad meramente tecnológica. Si bien las sustancias producidas pueden servir para aumentar la vida útil del alimento, sólo representa un efecto secundario. En cambio, en el caso de los cultivos protectores la aplicación de los microorganismos tiene como objetivo principal el efecto conservante (Medina, 2017).

3. Bacterias ácido lácticas (BAL) biopreservadoras

El empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) o sus metabolitos son un ejemplo de biopreservación o bioconservación. Este tratamiento se basa en la prolongación de la vida útil de los alimentos por medio de la producción de compuestos antimicrobianos producidos por determinados microorganismos, fundamentalmente BAL, ya sea por adición directa de estas o por medio de la aplicación de sus metabolitos. Se trata de un proceso natural o mediante la aplicación de compuestos naturales, con un enorme potencial de aplicación en gran variedad de productos alimentarios (Vuan Lanusse, 2018).

Las BAL resultan sumamente atractivas para ser utilizadas como herramientas para controlar el crecimiento de patógenos en una gran variedad de alimentos, debido a que son consideradas seguras y se utilizan hace cientos de años a nivel mundial en la producción de alimentos fermentados (Harris *et al.*, 1992).

Además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, las BAL mejoran las características sensoriales de los alimentos, como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. Muchas de las BAL son utilizadas por la industria alimentaria en la elaboración de alimentos probióticos, ya sea productos fermentados o complementos alimenticios con la finalidad de promover la salud. Estos se producen a partir de cultivos puros o mezcla de microorganismos vivos, que, al ser consumidos por el hombre o los animales en cantidades adecuadas, le generan un efecto beneficioso (Parra Huertas, 2010).

3.1. Evolución del término BAL

El término de bacterias lácticas engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya característica principal ~~definitoria~~ es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares (García Ibarra, 2007).

Durante miles de años las bacterias lácticas se han utilizado inadvertidamente para la producción de subproductos lácteos tales como queso y yogur. Sin embargo, Louis Pasteur demostró que la producción de ácido láctico en fermentaciones se debía a la acción de microorganismos (fermentos lácticos) recién a mediados del siglo XIX (Gorbeña, 2008, Agudo Toscano, 2016).

Más tarde, Joseph Lister fue quien dio inicio al estudio microbiológico de las BAL mediante el aislamiento y la obtención de un cultivo puro de *Bacterium lactis* (Bedón León, 2018).

Hacia 1900, Henry Tissier aisló un organismo Gram positivo y productor de ácido láctico de las heces de un lactante. Fue considerada la primera bifidobacteria a la que llamó *Bacillus bifidus* y fue incluida en la clasificación de las BAL (Hernández Pérez, 2016).

Winslow propuso en 1917 la familia *Lactobacillaceae* para agrupar bacterias con los siguientes rasgos: bacilos Gram positivos, a menudo largos y delgados, inmóviles, no esporulados, generalmente productores de ácido láctico a partir de azúcares, posiblemente productores de gas (CO₂), no productores de hidrógeno, ocasionalmente termófilos, difícilmente cultivables en medio gelificado incubado en atmósfera microaerófila (Bedón León, 2018).

Tanto los lactobacilos como las bifidobacterias fueron agrupados en el mismo esquema de clasificación durante gran parte del siglo XX. Es por este motivo que el nombre de BAL se ha utilizado para hacer referencia a ambos grupos de microorganismos que presentan la capacidad de producir ácido láctico a partir de carbohidratos (Castro y De Rovetto, 2006).

A comienzos de los años 30 ya empezaron a obtenerse datos que demostraban que las bifidobacterias presentaban mayor similitud a *Actinomyces* que a los lactobacilos. De todos modos, estos estudios no modificaron el esquema de clasificación.

En la década del '60 los estudios moleculares mostraron que más allá de las similitudes fenotípicas, las bifidobacterias presentaban diferencias muy importantes respecto a las bases nitrogenadas de las restantes BAL. El contenido en guanina y citocina de las bifidobacterias es superior al 50% y en el caso de los lactobacilos este contenido es inferior al 50%. Otra característica que permitía distanciar a las bifidobacterias del resto de las BAL es la pared celular; el análisis de su composición determinó la presencia de características particulares (Poupard *et al.*, 1973).

La controversia respecto a la clasificación de las bifidobacterias persistió debido a que las evidencias obtenidas no fueron consideradas suficientes para separarlas del grupo de los lactobacilos (López *et al.*, 2007).

Finalmente, el análisis filogenético de las secuencias de ARN ribosómico permitió establecer convincentemente la clasificación de las bifidobacterias como un orden separado dentro de la clase *Actinobacteria* (Arias, 2012).

En la actualidad lo que se conoce como BAL agrupa a bacterias del orden *Lactobacillales* y bacterias del orden *Bifidobacteriales*. Este proceso de clasificación dio lugar a que actualmente el término BAL tenga un significado ambiguo. Es posible hacer referencia tanto a las bacterias del orden *Lactobacillales* exclusivamente, como al conjunto de lactobacilos y bifidobacterias (García Peris, 2007).

3.2. Características generales de las BAL

BAL son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. La mayoría de las BAL presentan morfología de coco o bacilo, son Gram positivos, no esporulados y no móviles. Pueden presentar metabolismo respiratorio anaerobio o microaerofílicos o aerotolerante. Son oxidasa y catalasa negativas, carecen de citocromos, no reducen nitratos a nitritos y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Vásquez *et al.*, 2009).

Las BAL son consideradas ácido tolerantes debido a que algunas presentan la capacidad de crecer a valores de pH bajos como 3,2, otras a valores altos como 9,6, mientras la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5. De esta forma pueden sobrevivir en medios donde otras bacterias no soportarían el aumento de la concentración de ácidos orgánicos (Carr *et al.*, 2002).

Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, como así también del tracto digestivo y vagina de mamíferos, entre otras fuentes (Azadnia *et al.*, 2011).

El metabolismo reproductivo de las BAL se basa en la utilización de azúcares como la glucosa y lactosa. Además, requieren aminoácidos vitaminas y otros factores de crecimiento. Los alimentos representan una buena fuente de estos nutrientes, siendo la leche el medio típico y óptimo para la proliferación de las BAL. Sin embargo, existen otros alimentos tales como la masa de cereales, los vegetales y la carne, que representan un excelente medio de crecimiento y producción de metabolitos (Vásquez *et al.*, 2009).

3.3. Clasificación de las BAL

Las BAL constituyen un grupo de géneros que presentan características similares respecto a su morfología, metabolismo, fisiología, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración de ácido láctico producido, capacidad de crecer a elevadas concentraciones de sal y en la tolerancia ácido-base.

Se clasifican en diferentes géneros en función de las características específicas antes mencionadas, al modo de fermentación de la glucosa y al producto final obtenido (Doyle *et al.*, 2013).

La clasificación en base al producto final de la fermentación permite distinguir a las BAL homofermentadoras de las heterofermentadoras:

- Las homofermentadoras poseen la enzima aldolasa y generan ácido láctico como producto final de la fermentación de la glucosa, utilizando la vía de glucólisis Embden-Meyerhof. Los géneros representativos de este tipo de bacterias son: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunas especies de *Lactobacillus* spp. (Ramírez *et al.*, 2011).
- Las heterofermentadoras se caracterizan por convertir hexosas a pentosas mediante la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, generando a través del proceso, además de ácido láctico, cantidades significativas de otros productos tales como acetato, etanol y CO₂. Los géneros que representan a esta clase de bacterias son: *Leuconestoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunas especies de *Lactobacillus* spp. (Carr *et al.*, 2002).

En función de las características buscadas, se utilizarán unas u otras. En la industria alimentaria generalmente son utilizadas las BAL heterofermentadoras debido a su aplicación tecnológica en la formación de compuestos aromáticos e intensificadores de sabor como diacetilos y acetaldehídos.

3.4. BAL probióticas

El conocimiento sobre probióticos, aunque es ya antiguo, se ha diversificado en el transcurso del nuevo milenio. Las múltiples investigaciones científicas y su aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica resultan, cada día, de mayor relevancia para el desarrollo de alimentos funcionales y compuestos medicinales que promueven la salud humana (Castañeda Guillot, 2018).

Los probióticos pueden conferir sus beneficios para la salud por varios mecanismos: participan en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas agudas digestivas al contribuir a la resistencia a la colonización, enfermedades crónicas intestinales reforzando la barrera intestinal y hepática, actúan sobre la función inmune del huésped y la homeostasis intestinal, y pueden modular el sistema inmunitario e influir en la composición y actividad de la microbiota intestinal (Guillot, 2017, Ramírez *et al.*, 2011).

La eficacia de la administración de probióticos depende del tipo de cepa y la dosis administrada. Aunque los probióticos en general son bien tolerados, en ocasiones se han reportado raros efectos adversos en sujetos inmunocomprometidos, pacientes con catéteres endovenosos centrales y en estado crítico (Valdovinos *et al.*, 2017, Floch *et al.*, 2015).

El hombre consume hace cientos de años “productos fermentados” para transformar materias primas perecederas en alimentos agradables, estables microbiológicamente y con elevado valor nutricional, tales como vino, cerveza, yogur, entre otros. Estos alimentos además son fácilmente digestibles, ya que el proceso de fermentación transforma las sustancias en compuestos asimilables por medio de la intervención de levaduras, mohos y bacterias lácticas. Sin embargo, las modernas tecnologías de producción han eliminado en gran parte el contenido microbiano beneficioso de los alimentos, disminuyendo sus defensas naturales. En 1877 Pasteur y Joubert observaron la interacción antagónica entre cepas bacterianas. Esto dio lugar años después al desarrollo de bacterioterapia como

método para prevenir infecciones y tratar enfermedades. En 1989 Fuller define el término probiótico por primera vez, como “un complemento alimenticio a base de microorganismos vivos y vitales que produce efectos beneficiosos sobre el organismo animal, mejorando el equilibrio microbiano intestinal”. Algunos investigadores, ya hablaban en la década del sesenta, contraponiendo el término probiótico al de antibiótico. El antibiótico cura una infección matando las bacterias responsables, el probiótico previene el problema ya que induce una microbiota intestinal benéfica (Álvarez Calatayud y Azpiroz, 2015).

La teoría de que el consumo regular de BAL en alimentos fermentados puede reducir los problemas intestinales y mejorar la higiene digestiva, con la finalidad de aumentar la esperanza de vida fue desarrollada originalmente por el inmunólogo ruso y Premio Nobel de Medicina Elie Metchnikoff y se presentó en su libro "La prolongación de la vida", publicado en 1907 (Casado, 2017).

En los últimos años, la demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado una nueva línea de alimentos funcionales: los probióticos, cuyo número de alimentos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor. Hoy en día, los probióticos representan una sección clave de rápido crecimiento de la industria alimentaria y se agregan a una serie de productos en el mercado, incluidos yogures, quesos, helados y otros postres (Granato *et al.*, 2010).

Además de su valor nutritivo intrínseco, los probióticos ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo (Pía Taranto *et al.*, 2005).

Según la definición actual, establecida en 2001 por un documento publicado por la OMS titulado *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in food* un probiótico es todo aquel microorganismo vivo que, administrado en la cantidad adecuada, proporciona beneficios saludables al receptor. La FAO (*Food and Agriculture Administration*), en tanto, define a los probióticos como “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas” (FAO, 2006).

Otra definición posible es: “alimentos susceptibles de producir un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas del organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, de mejorar el estado de salud y de bienestar y/o de reducir el riesgo de una enfermedad”. Y desde otro punto de vista, se puede definir como: “microorganismos vivos que forman parte de la microbiota del tracto

gastrointestinal de mamíferos y aves, productos lácteos y plantas en descomposición” (Cheng *et al.*, 2014).

Como se puede apreciar, a lo largo del tiempo, se han formulado distintas propuestas de definición para el término de probiótico. Es de interés resaltar los siguientes aspectos (Hill *et al.*, 2014, Castañeda Guillot, 2018):

- mostrar propiedades no patógenas.
- capacidad de supervivencia a través del tracto digestivo.
- adherencia al epitelio intestinal.
- colonización en el tracto intestinal.
- producción de sustancias antimicrobianas.
- adecuada supervivencia (estabilidad) en forma de polvo, líquido o en alimentos.

En la actualidad, los suplementos alimenticios que contienen bacterias probióticas viables son cada vez más reconocidos por los beneficios que estos pueden aportar a la salud (Rodríguez-Guerrero, 2010). Las principales propiedades funcionales de los probióticos incluyen la tolerancia al ácido y a la bilis, la adherencia a las superficies epiteliales y la actividad antagonista hacia patógenos intestinales. Estos organismos tienen que resistir las condiciones adversas encontradas en el tracto gastrointestinal superior del huésped. Sin embargo, muchas bacterias probióticas carecen de la habilidad de sobrevivir a condiciones extremas de acidez y a condiciones de sales biliares. Por esta razón, se han estudiado mecanismos físicos de protección evitando la exposición de las bacterias a esas condiciones tales como la microencapsulación con materiales de naturaleza polimérica (Ferrer, 2001).

En contradicción a lo postulado, existen en el mercado algunos probióticos de microorganismos muertos o fracciones celulares, que son considerados como tales. Algunos expertos han planteado, basado en estudios científicos, que no todos tienen que contener microorganismos vivos para actuar en el huésped y ejercer efectos fisiológicos y potencialmente beneficiosos, en especial, sobre el sistema inmune, aunque otros evalúan que no pueden ser considerados (Lammers *et al.*, 2003).

La selección de probióticos no es sencilla, es necesario considerar una serie de aspectos (Rodríguez-Guerrero, 2010):

- estado fisiológico del microorganismo probiótico adicionado (fase de crecimiento) al sistema biológico;
- condiciones de almacenamiento del producto, tales como temperatura y humedad relativa;
- composición química del sistema en el cual se añade el probiótico (acidez, carbohidratos disponibles, fuentes de nitrógeno, contenido de minerales, actividad de agua, oxígeno);
- posibles interacciones del probiótico con otros cultivos iniciadores (producción de bacteriocinas, antagonismo, sinergismo).

3.4.a. Efecto probiótico potencial

La ingesta de BAL se considera segura para la salud, pero para poder ser utilizadas como cultivos protectores o *starters*, deben superar un protocolo de cumplimiento de estatus legal de “*Generally Recognised as Safe*” (GRAS) según la *Food and Drug Administration* (FDA) de EE. UU., o de “*Qualified Presumption of Safety*” (QPS) por la *European Food Safety Authority* (EFSA). Esto se debe a que no todas las BAL cumplen con los criterios de inclusión tales como taxonomía, familiaridad, patogenicidad y destino de uso (Cleveland, 2001, Ammor, 2007).

La aplicación de BAL en la industria alimentaria como cultivo probiótico se realiza con un objetivo nutricional o funcional. Para ello, este cultivo debe cumplir con una serie de requisitos:

- caracterización *in vitro* para determinar estabilidad fenotípica y genotípica y patrones de utilización de carbohidratos y proteínas;
- resistencia a la acidez gástrica;
- resistencia a la bilis;
- adhesión al epitelio intestinal;
- resistencia a lisozima (opcional);

- capacidad de utilizar prebióticos (opcional);
- ensayos *in vivo* e *in vitro* que demuestren el (los) efecto(s) probiótico(s) adjudicado(s);
- carácter GRAS: reconocido como seguro para la salud;
- no presentar resistencia a antibióticos ni determinantes de patogenicidad (Liong, 2011, Páez, 2014, Leal, 2018).

3.5. Actividad inhibitoria de BAL

Entre la diversidad de microorganismos que se encuentran en los alimentos naturales o procesados, las BAL conforman un grupo especial. Estas bacterias pueden localizarse en los alimentos como hábitat de forma natural, o bien añadidas intencionalmente con fines de conservación. Por lo general, las cepas empleadas para el desarrollo de alimentos probióticos son aisladas de humanos ya que poseen mayor posibilidad de adherirse y colonizar el epitelio intestinal. Sin embargo, estudios han demostrado que cepas de origen animal también poseen efecto benéfico en el organismo humano (Bylund, 2003).

En los inicios se consideraba que los microorganismos que se emplearían como probióticos, debían formar parte de la microbiota del intestino de la especie animal a la que se suministraran, sin embargo, posteriormente esta condición no se consideró indispensable siendo más importante los efectos beneficiosos que ocasionaban en el huésped, así como su inocuidad (Alvarado Rivas y Díaz Rivero, 2009).

El principal mecanismo de inhibición del crecimiento de otros organismos en cultivos mixtos de las BAL consiste en la utilización de los carbohidratos disponibles e inducción a pH inferior a 4 debido a la producción de ácido láctico. Esta capacidad inhibitoria se denomina antagonismo láctico.

A su vez, algunos lactobacilos nativos desarrollan otros mecanismos de inhibición de los microorganismos patógenos dependiendo del medio de crecimiento y de la cepa. Algunos de estos mecanismos son la competencia por los sitios de adhesión y colonización, disminución de la permeabilidad intestinal, aumento de la actividad de la lactasa, incremento en la producción de los

linfocitos T *helper*, aumento del componente secretor de la inmunoglobulina A, competencia por nutrientes y oxígeno y la capacidad de producir compuestos tóxicos. Estos procesos no son mutuamente excluyentes, y la inhibición puede comprender uno, varios o todos los mecanismos referidos (Juárez Estrada *et al.*, 2010, Tormo Carnicé, 2006).

La acción conservadora de las BAL se debe a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y deteriorantes mediante la obtención de varios productos finales de la fermentación. Existen varios componentes antimicrobianos: ácidos tales como láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Shirai *et al.*, 1996).

Las bacteriocinas son moléculas que tienen estructura de tipo peptídica o proteínas biológicamente activas, que presentan acción bactericida ante receptores específicos de las células. Su composición química es variada y por consecuencia el modo de acción es específico (Vásquez *et al.*, 2009).

Debido a la actividad antibacteriana frente a *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, las bacteriocinas producidas por las BAL han sido intensamente estudiadas (Camacho Sánchez, 2018).

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por las BAL generan una reducción de pH del ambiente produciendo un efecto inhibitorio de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. En ese sentido, la forma no disociada del ácido láctico puede penetrar en la pared celular de la bacteria patógena con mayor facilidad donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente. De esta forma ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Vásquez *et al.*, 2009).

Las BAL tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno a partir del oxígeno presente en el ambiente. Esta sustancia obtenida, genera radicales hidroxilo que causan la peroxidación de los lípidos de la membrana y por consecuencia la acción bactericida sobre gran cantidad de microorganismos patógenos (Ouweland y Vesterlund, 2004).

Las BAL tienen la capacidad de producir CO₂ como producto final de la fermentación heterofermentadora y a menudo se obtiene por descarboxilación de aminoácidos. El CO₂ presenta la

capacidad de promover un ambiente anaerobio, reduce el pH y favorece la destrucción de la integridad de la pared celular microbiana (Sanchez Alzuria, 2015).

La producción de diacetilo por las BAL permite la fermentación de citrato y es sintetizado en el metabolismo intermediario del piruvato. La obtención de este compuesto tiene un objetivo tecnológico en la producción de aroma a manteca que le confiere a ciertos productos lácticos cultivados. La acción antimicrobiana del diacetilo se ha demostrado con 200 $\mu\text{g/ml}$ para levaduras y 300 $\mu\text{g/ml}$ para bacterias Gram positivas no lácticas (Ramírez *et al.*, 2011).

3.5.a. Producción de bacteriocinas

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares. Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora (Sablon *et al.*, 2000).

Las bacteriocinas producidas por BAL (péptidos antimicrobianos sintetizados en los ribosomas) matan las bacterias en concentraciones mucho más bajas que los péptidos antimicrobianos eucarióticos, probablemente porque interactúan con un receptor específico presente en las células diana (Cotter *et al.*, 2005, Drider *et al.*, 2006).

Las bacteriocinas generalmente son clasificadas con base en sus características bioquímicas y genéticas en:

Clase I.- Lantibióticos: son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos esenciales como lantionina, β -metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo es la nisina.

Clase II.- No lantibióticos: son bacteriocinas de peso molecular variable, que contienen aminoácidos regulares. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

Clase IIa: son péptidos activos contra *Listeria* y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

Clase IIb: son formadores de complejos de poración que consisten en dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antibacteriana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.

Clase IIc: son péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III: son péptidos grandes mayores de 30 kDa, en esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B.

La bacteriocina utilizada generalmente en la industria alimentaria es la nisina. Es sintetizada de forma natural por *Lactococcus lactis* subsp *lactis* y ya se ha utilizado en más de 50 países como un aditivo antagonico para reducir el uso de aditivos químicos como los conservantes químicos. La nisina ya se ha aplicado a productos alimenticios (por ejemplo, productos lácteos) para inhibir la contaminación por patógenos, pero se limita a los patógenos grampositivos, principalmente *Listeria monocytogenes* (Cosentino *et al.*, 2012).

3.6. Géneros representativos de BAL

Los géneros que integran el grupo de las BAL son *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconestoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella*. Sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Leuconestoc*.

El género *Lactobacillus* spp. es el que presenta mayor número de especies. Fue propuesto por Beijerinck en 1901 y es un grupo muy heterogéneo (Schleifer y Ludwig, 1995). Collins *et al.* (1991), en función de la secuencia de ARN ribosomal 16S propusieron la clasificación de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconestoc* en tres grupos filogenéticamente distintos:

- Grupo I o de *L. delbrueckii*: incluye a *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* y otras especies de *Lactobacillus* homofermentadores estrictos y tres especies heterofermentadoras facultativas: *L. acetotolerans*, *L. hamsteri* y *L. intestinalis*.
- Grupo II o de *L. casei-Pediococcus*: es el grupo más grande, con numerosas especies de lactobacilos y de pediococos. Comprende homofermentadores estrictos (*L. aviarius*, *L. salivarius*), heterofermentadores facultativos (*L. agilis*, *L. bifementans*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*) y heterofermentadores estrictos (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*).
- Grupo III o de *Leuconestoc*: contiene todos los miembros del género *Leuconestoc* y algunos *Lactobacillus* heterofermentadores estrictos.

3.6.a. *Lactobacillus* spp.

Dentro del grupo de las BAL, el género del que se describen mayor cantidad de especies con características probióticas es *Lactobacillus* spp. Es un género diverso que incluye más de 200 especies. Algunas de las especies son altamente especializadas y están adaptadas a un nicho ecológico específico, como los sustratos lácteos, mientras que otras se encuentran en el tracto gastrointestinal de los mamíferos (Van de Guchte *et al.*, 2006). En general, representan el grupo de BAL más difundido ya que pueden crecer en todos los hábitats que contengan azúcares fermentables, productos hidrolizados de proteínas, vitaminas, factores de crecimiento y baja tensión de oxígeno (Sánchez, 2014).

Las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. pueden definirse como bacterias Grampositivas, catalasa negativas, no esporulantes, cocos o bacilos (Figura 6), que producen ácido láctico como principal producto final de la fermentación de carbohidratos (Meyer, 1987).

Estas bacterias crecen bajo condiciones microaerófilicas o anaeróbicas con una temperatura que oscila entre los 5 y 53°C y pueden multiplicarse en medios ligeramente ácidos, encontrándose en la microbiota del tracto gastrointestinal de animales (Frizzo *et al.*, 2006).

Los requerimientos nutricionales son complejos incluyendo: carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, los cuales se encuentran en el caldo comercial denominado MRS formulado por De Man *et al.* (1960). Desde entonces, es el medio preferencial utilizado para el crecimiento de las BAL en el laboratorio (Lahtinen *et al.*, 2011).

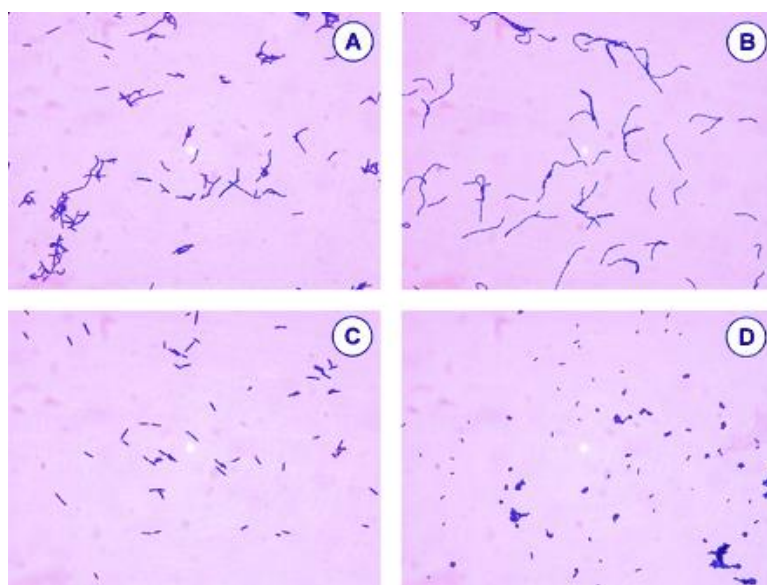


Figura 6: Distintas morfologías que presenta *Lactobacillus* spp. según especie. 1000X (Pena *et al.*, 2004)

3.6.a.1. Actividad antibacteriana de *Lactobacillus* spp.

El género *Lactobacillus* spp. genera día a día un creciente interés entre microbiólogos y tecnólogos dedicados a descubrir nuevas aplicaciones biotecnológicas y propiedades probióticas y

representa una alternativa para inactivar los patógenos de los alimentos mediante sus metabolitos activos con actividad inhibitoria y brindar así alimentos seguros a los consumidores.

Gran cantidad de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* spp. son consideradas seguras y con múltiples efectos beneficiosos sobre la salud animal y humana. Esta propiedad es atribuida principalmente a su capacidad para unirse a la pared intestinal y competir ante patógenos intestinales y a la producción de un heterogéneo grupo de sustancias de tipo peptídico, ácidos orgánicos tales como láctico, fórmico, acético, propiónico y butírico, peróxido de hidrógeno, radicales libres, diacetilo, propianato, fenil-lactato, hidroxifenil-lactato, dipéptidos cíclicos, CO₂, acetoína, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos, antibióticos y bacteriocinas de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas u otras sustancias antimicrobianas (Soriano *et al.*, 2014).

3.6.a.2. Relevancia de *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum (*L. plantarum*) es una BAL versátil ya que puede encontrarse en muchos nichos ecológicos diferentes, tales como verduras, carne y pescado, y productos lácteos, así como el tracto gastrointestinal (Bringel *et al.*, 2005). *L. plantarum* es una especie altamente heterogénea ampliamente utilizada en alimentos y salud, incluidos los cultivos iniciales en procesos de fermentación (Kostinek *et al.*, 2005). Varios estudios demostraron que ciertas cepas pueden tener efectos beneficiosos sobre la funcionalidad intestinal de los mamíferos y algunas se han desarrollado como cultivos probióticos (Galdeano, 2006). Se sabe que la secuencia completa del genoma (3,3 Mb) de la cepa WCFS1 de *L. plantarum* (aislado de saliva humana) es una de las más grandes dentro del grupo de BAL (Kleerebezem *et al.*, 2003). Este tamaño del genoma probablemente esté relacionado con la capacidad de esta bacteria para habitar diversos nichos ambientales, lo que le permite fermentar una amplia gama de carbohidratos. Las islas genómicas más variables dentro de las variedades llamadas subespecies de *L. plantarum*, son las que incluyen genes involucrados en el metabolismo del azúcar, biosíntesis de plantaricinas y exopolisacáridos, así como componentes de profagos, que sugieren la presencia de regiones de adaptación de "estilo de vida" en su genoma (Russo *et al.*, 2017, Molenaar *et al.*, 2005).

La notable adaptación de *L. plantarum* a diferentes nichos ecológicos refleja su capacidad para fermentar una amplia gama de carbohidratos, incluidos monosacáridos, disacáridos y polisacáridos y produce ácido láctico como el principal producto final (Bringel *et al.*, 2001). Además, puede fermentar azúcares para producir ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido succínico y ácido láctico, etanol o dióxido de carbono como metabolitos principales en condiciones específicas y sustratos selectivos. *L. plantarum* ha desarrollado comportamientos para reducir el estrés oxidativo al tener peroxidasas y reductasas.

L. plantarum tiene aplicaciones generalizadas en la industria farmacéutica y alimenticia al contribuir significativamente a la medicina humana sin causar efectos secundarios. Presenta facilidades para ser cultivado y se considera como una bacteria probiótica segura ya que puede suprimir la cantidad de microorganismos patógenos o enfermedades que pueden afectar negativamente a los seres humanos (Zago *et al.*, 2011).

Así como otras especies del género *Lactobacillus*, *L. plantarum* tiene un potencial notable como conservante biológico probiótico debido a su doble función como habitante indígena del intestino humano y la tradición respecto a su utilización como cultivo iniciador en la elaboración de alimentos fermentados. Resulta una especie particularmente importante, ya que se utiliza en fermentaciones lácteas, vegetales y de carne, en la conversión de pasto a ensilado y algunas cepas se comercializan como probióticos comerciales con propiedades que promueven la salud. Los beneficios potenciales de *L. plantarum* como probiótico para la salud humana incluyen la regulación del sistema inmunológico, la reducción del nivel de colesterol, el equilibrio estable de los microorganismos intestinales y la reducción del riesgo de tumores a nivel intestinal (De Vries *et al.*, 2006).

Las declaraciones de propiedades con características funcionales de *L. plantarum* permitieron el desarrollo de diferentes formulaciones de probióticos, y sus cualidades antibacterianas son interesantes para la seguridad de los alimentos en la tecnología de biopreservación.

Las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* se denominan plantaricinas, por ejemplo: plantaricina A (PlnA), plantaricina NC8, plantaricina JK (PlnJK) y plantaricina EF (PlnEF). Algunas de estas plantaricinas tienen actividad antibacteriana contra los principales patógenos transmitidos por los alimentos, bacterias grampositivas y gramnegativas tales como STEC, *Salmonella* spp., *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* que podrían contaminar los alimentos y causar enfermedades humanas extremas como endocarditis infecciosa, gastroenteritis, meningoencefalitis infecciones materno-

fetales, SUH, entre otras (Field *et al.*, 2016). Tanto PlnEF como PlnJK son bacteriocinas de dos péptidos que pertenecen al gran grupo de pequeños antibióticos no estables al calor, denominados bacteriocinas de clase II. Plantaricina E (PlnE), plantaricina F (PlnF), plantaricina J (PlnJ) y plantaricina K (PlnK) son péptidos catiónicos que consisten en 33, 34, 25 y 32 aminoácidos con pesos moleculares de 3703, 3545, 2929 y 3503 Dalton respectivamente. PlnE y PlnF son antimicrobianos eficientes cuando se presentan juntos (Amro *et al.*, 2018).

La producción de bacteriocinas generalmente ocurre durante la fase logarítmica tardía o la fase estacionaria temprana, y generalmente está influenciada por el mecanismo de detección de quórum (mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular) o por cualquier signo de estrés (Martinez *et al.*, 2013). Se diferencian de la mayoría de los antibióticos debido a su constitución proteica molecular que les permite degradarse rápidamente por las proteasas en el tracto digestivo humano (Parada *et al.*, 2007).

Entre todas estas bacteriocinas peptídicas producidas por las BAL, la subclase IIa resulta ser la interesante para el uso en la conservación de alimentos (inhibe el crecimiento de la degradación de alimentos grampositivos y bacterias patógenas como *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*), así como en medicina como complementos de antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas o como agentes antivirales (Drider *et al.*, 2006). Algunas bacteriocinas producidas por *L. plantarum* se han asignado a este grupo, incluida la plantaricina 423 producida por *L. plantarum* cepa 423, capaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en carne de avestruz (Dicks *et al.*, 2004). Otras plantaricinas, como EF, JK, NC8 y J51, se catalogaron en la subclase IIb y están constituidas por dos péptidos. Su actividad depende, por definición, de la acción complementaria de dos péptidos diferentes, donde su naturaleza catiónica es esencial, facilitando el contacto inicial entre las bacteriocinas y las membranas cargadas negativamente a través de interacciones electrostáticas. Finalmente, la plantaricina A, bacteriocina de un péptido sin modificaciones postraduccionales, se incluye en la subclase IIc (Diep *et al.*, 2009). El espectro antimicrobiano de la plantaricina A es relativamente estrecho y comprende principalmente diferentes especies de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. sakei*, *L. viridescens* y *L. plantarum*). Se ha demostrado que la actividad antimicrobiana de la plantaricina A es de 10 a 100 veces menor que la de las plantaricinas EF y JK (Anderssen *et al.*, 1998).

3.6.b. *Pediococcus* spp.

Pediococcus spp. es una BAL Gram positiva (Figura 7) perteneciente a la familia *Lactobacillaceae*. Presentan la capacidad de crecer en un amplio rango de pH, temperatura y presión osmótica, propiedades que le permite colonizar el tracto digestivo (Klaenhammer, 1993).

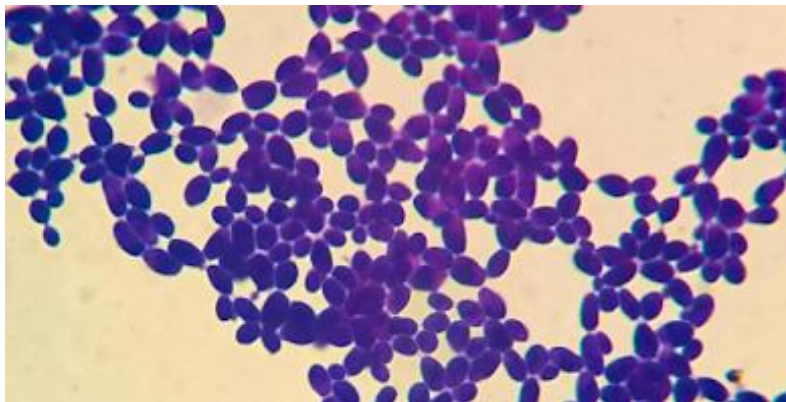


Figura 7: Morfología de *Pediococcus* spp. al microscopio óptico. 1000X (BioOne, 2015)

Las bacterias pertenecientes al género *Pediococcus* generalmente se encuentran dispuestos en pares o tétradas, siendo las únicas BAL con forma de coco que se dividen a lo largo de dos planos de simetría. Son anaerobios facultativos, crecen de forma óptima en MRS con un pH óptimo de 6,2. Suelen incubarse durante 24 h a temperaturas entre 37 y 45 °C, aunque también presenta desarrollo a temperaturas más altas hasta 65 °C (Lin y Busi, 2016).

Especies de *Pediococcus*, tales como *P. acidilactici* han presentado un potencial probiótico mediante resultados prometedores en experimentos con animales y humanos, aunque algunos de los resultados son limitados.

Suelen encontrarse en vegetales fermentados, productos lácteos fermentados y productos cárnicos (Barros *et al.*, 2001).

3.6.b.1. Actividad antibacteriana de *Pediococcus* spp.

Las bacterias pertenecientes al género *Pediococcus* ejercen antagonismo ante otros microorganismos, incluidos los patógenos entéricos. Esta capacidad antibacteriana es generada principalmente por la producción de ácido láctico y la secreción de bacteriocinas conocidas como pediocinas (Daeschel, 1985). La pediocina es una proteína peptídica listeria activa y es utilizada en productos vegetales y cárnicos como conservador debido a que tiene un alto potencial para ser utilizado como conservador en alimentos con fermentaciones lácteas.

Además de presentar actividad antibacteriana, las bacterias pertenecientes al género *Pediococcus*, son utilizadas en la industria alimentaria con objetivos tecnológicos. Ciertos *Pediococcus* producen diacetil, lo que proporciona un aroma a mantequilla o “*butterscotch*” a algunos vinos (tales como Chardonnay) y unos pocos tipos de cerveza. Las especies de *Pediococcus* a menudo se utilizan en el proceso de conservación del forraje denominado ensilado. Por otra parte, suelen ser consideradas contaminantes de la cerveza y vino aunque en algunas cervezas tales como la de tipo Lambic es deseable su presencia (Beristain-Bauza *et al.*, 2012).

CAPÍTULO II

Hipótesis

Objetivos

Teniendo en cuenta que:

- las ETA constituyen uno de los problemas sanitarios de mayor incidencia en la salud pública Argentina, afectando sobre todo a niños,
- los productos cárnicos representan una potencial vía de transmisión de enfermedades debido a que los animales de sangre caliente y el ambiente son el principal reservorio de patógenos,
- la formación de *biofilms* en las plantas procesadoras de alimentos es una seria amenaza para la salud pública,
- la producción y consumo de carne de cerdo y productos derivados en nuestro país ha incrementado en los últimos años y
- las BAL han sido utilizadas para inhibir patógenos en alimentos, se plantea la hipótesis de trabajo:

Hipótesis

Las bacterias ácido lácticas aisladas de productos cárnicos de origen porcino inhiben a patógenos implicados en enfermedades transmitidas por alimentos.

Objetivo general

Controlar la presencia de bacterias productoras de enfermedades transmitidas por alimentos mediante el empleo de bacterias ácido lácticas.

Objetivos particulares

A. Aislar BAL provenientes de medias reses, cortes de carne de cerdo y materia fecal de lechones.

B. Identificar los aislamientos mediante métodos moleculares y pruebas bioquímicas.

C. Evaluar la actividad inhibitoria de las BAL sobre cepas de STEC, *S. Typhimurium* y *S. aureus* y determinar la naturaleza química de la sustancia antibacteriana.

D. Concentrar los metabolitos producidos por las BAL y evaluar su actividad inhibitoria sobre los patógenos seleccionados.

E. Evaluar la interacción entre dos BAL frente a los patógenos seleccionados.

F. Evaluar la capacidad de las BAL de formar *biofilms* y de reducir *biofilms* de las bacterias patógenas.

G. Realizar ensayos de inhibición sobre matriz de carne porcina.

Capítulo III
DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Obtención de bacterias

Se seleccionaron las bacterias patógenas indicadoras del potencial efecto inhibitorio de las BAL y se realizó la toma muestras para el aislamiento de BAL.

A.1. Selección de patógenos indicadores

Se utilizaron como cepas indicadoras del efecto inhibitorio: STEC O157:H7 (*EDL933*) aislada de un caso clínico de SUH y *S. Typhimurium* y *S. aureus* aisladas previamente de criadero de cerdo y boca de expendio de carne de cerdo respectivamente, en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Colello, 2018). Las tres cepas se conservaron en medio Luria Bertani (LB), (Britania®), con 20% de glicerol a -70 °C (Colello *et al.*, 2016).

A.2. Toma de muestra y aislamiento de BAL

La toma de muestra se realizó en un establecimiento de producción porcina de ciclo completo del Partido de Tandil. Se realizaron 32 hisopados (Figura 8) en instalaciones, utensilios, cortes de carne fresca y productos finales en las distintas etapas de producción de carne de cerdo: criadero (categorías: gestación, maternidad, lechón, destete, recría y terminación), sala de recepción de reses, cámara de desposte, sala de elaboración de embutidos, boca de expendio. Las muestras fueron tomadas según el Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Diario Oficial de la Unión Europea L 338/1) y al Reglamento (UE) N° 209/2013 de la Comisión de 11 de marzo de 2013 que

modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005. Se seleccionó un área de 10 cm x 10 cm, se pasó el hisopo estéril sobre la superficie y se conservó en el medio de transporte Stuart, (Deltalab®) a temperatura ambiente hasta el momento de ser procesados.

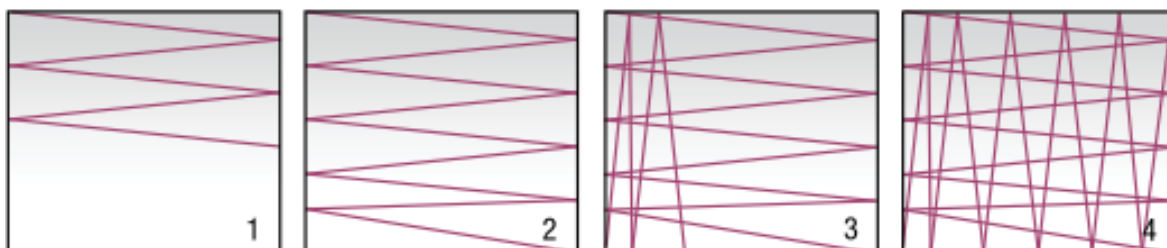


Figura 8: Toma de muestras mediante hisopado

Las muestras obtenidas en todas las etapas de producción de carne de cerdo fueron procesadas el mismo día de su recolección. El aislamiento de colonias presuntivas de BAL se realizó con base en la metodología descrita por De Angelis *et al.* (2006). Se suspendieron y homogeneizaron los hisopos en 90 ml de solución fisiológica estéril. A partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en superficie 100 μ l de cada dilución sobre placas de agar MRS (Britania®) con espátula de Drigalsky y se incubaron a 37 °C por 24 a 48 h en microaerofilia. Se seleccionaron 2 colonias características de cada placa que fueron cultivadas en tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de caldo MRS en las mismas condiciones, obteniéndose 63 aislamientos. Los cultivos puros fueron conservados con 20% de glicerol a -70 °C.

B. Identificación de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas y métodos moleculares

B.1. Pruebas bioquímicas

Las colonias individuales obtenidas fueron sometidas a un primer “*screening*” por morfología de colonia, tinción de Gram, movilidad y reacción de catalasa. Luego se conservaron para posterior identificación y caracterización.

B.1.1. Tinción Gram

Se realizó la tinción o coloración de Gram a los aislamientos obtenidos. El fundamento de esta tinción diferencial indica la distinción entre los grupos taxonómicos: bacterias Gram positivas (las buscadas) y Gram negativas. Mediante la observación microscópica se determinó la morfología celular bacteriana y se realizó una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas a las que se visualizan de color violeta, y bacterias Gram negativas a las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella.

B.1.2. Movilidad

La determinación de movilidad bacteriana se realizó mediante observación microscópica. Se realizó una suspensión en solución fisiológica estéril o “preparación en

fresco”. Se tomó una colonia con el ansa y se homogeneizó en la gota de solución fisiológica estéril depositada en el portaobjetos. Se cubrió la suspensión con un cubreobjetos. Se observó al microscopio óptico con objetivo seco y el condensador de campo oscuro.

B.1.3. Catalasa

Se realizó la prueba de catalasa de cada aislamiento. La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva.

B.2. Método genotípico de identificación: PCR

Los aislamientos presuntivos de BAL fueron identificados genéticamente mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) monoplex para determinación de género y PCR multiplex para especie.

B.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de 1 ml de cultivo de cada aislamiento individual en caldo MRS a 37 °C durante 24 h. De esta forma, se aseguró que las células se encuentren en la fase estacionaria de crecimiento. Luego, se utilizó el kit de extracción de

ADN para bacterias Gram positivas *Wizard Genomic DNA Purification*® (Promega). El procedimiento fue el siguiente:

- centrifugar el cultivo a 13.000 rpm por 2 min y remover el sobrenadante,
- resuspender el pellet en 480 µl de EDTA 50 mM (pH 8),
- adicionar 120 µl de lisozima (50 mg/ml) e incubar a 37 °C durante 60 min,
- centrifugar 2 min a 13.000 rpm y remover el sobrenadante,
- adicionar 600 µl de solución de lisis nuclear e incubar a 80 °C por 5 min y enfriar a temperatura ambiente,
- adicionar 3 µl de ARNsa e invertir los tubos 5 veces,
- incubar a 37 °C durante 60 min y enfriar a temperatura ambiente,
- adicionar 200 µl de solución de precipitación de proteínas y agitar en vórtex,
- colocar los tubos en hielo durante 5 min y centrifugar por 3 min,
- transferir el sobrenadante a un tubo con 600 µl de isopropanol,
- mezclar, centrifugar durante 2 min y descartar el sobrenadante,
- adicionar 600 µl de etanol 70% e invertir los tubos varias veces,
- centrifugar durante 2 min, aspirar el etanol y secar los tubos al aire,
- adicionar 100 µl de solución de rehidratación,
- medir la concentración de ADN (ng/ml) mediante un NanoDrop Lite® (Thermo Scientific).

B.2.2. Selección de iniciadores o *primers*

Se utilizaron *primers* para amplificar el ADN de regiones específicas del 16S ribosomal para identificar el género y la especie de los aislamientos. Se utilizaron cepas control positivo

del género *Lactobacillus* spp. y de las especies *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus*. Los *primers* para la identificación de género fueron seleccionados según Dubernet *et al.* (2002) (Tabla 1).

Tabla 1: Primers para determinación de género *Lactobacillus* spp.

Especie	Primer	Secuencia (5' a 3')	Sitio
<i>Lactobacillus</i> spp.	LbLMA1-rev	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	1400–1419
<i>Lactobacillus</i> spp.	R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CAA AGCC	1597–1617

La caracterización de especie se realizó en base al estudio de Kwon *et al.* (2004). Se seleccionaron los *primers* detallados en la Tabla 2.

Tabla 2: Primers para determinación de especies de *Lactobacillus*

Especie	Primer	Secuencia (5' a 3')	Sitio	Amplímero
All <i>Lactobacillus</i>	IDL03R	CCACCTTCCTCCGGTTTGTCA	1178– 1198	-
All <i>Lactobacillus</i>	IDL04F	AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC	1499– 1522	-
<i>L. casei</i> - group	IDL11F	TGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCG	472– 495	727 pb
<i>L. acidophilic</i>	IDL22R	AACTATCGCTTACGCTACCACTTTGC	2079– 2104	606 pb
<i>L. delbrueckii</i>	IDL31F	CTGTGCTACACCTAGAGATAGGTGG	1015– 1039	184 pb
<i>L. reuteri</i>	IDL52F	ACCTGATTGACGATGGATCACCAGT	94– 118	1105 pb
<i>L. plantarum</i>	IDL62R	CTAGTGGTAACAGTTGATTA AAACTGC	1900– 1926	428 pb
<i>L. rhamnosus</i>	IDL73R	GCCAACAAGCTATGTGTTCGCTTGC	1922– 1946	448 pb

B.2.3. Mezcla de reacción o cóctel

La mezcla de reacción de 25 µl de volumen final se realizó en una solución de KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1µM de cada *primer*, 1U de *Taq* DNA polimerasa (Highway®) y 5 µl de ADN.

B.2.4. Programa de amplificación

La amplificación se realizó en un termociclador con un programa específico que incluía:

- desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min,
- 30 ciclos: desnaturalización a 95 °C por 30 seg; *annealing* o alineamiento a 55 °C por 30 seg y extensión a 72 °C por 30 seg
- extensión final de 7 min a 72 °C y
- almacenamiento a 4 °C.

B.2.5. Electroforesis y lectura

Las muestras obtenidas como producto de reacción de la PCR fueron sembradas con 2 µl de colorante de corrida o *loading* en pocillos de un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

La corrida electroforética se realizó en una cuba de electroforesis a 100 V durante 20 min para la PCR *monoplex* y 30 min para la PCR *multiplex*. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante un transiluminador con luz UV.

B.3. Cinética de crecimiento

Se seleccionó *L. plantarum* como una de las BAL representativas de los aislamientos. Se utilizaron placas 3M® para detección de BAL y determinación del quimismo fermentativo.

La cinética de crecimiento se determinó relacionando la biomasa del cultivo y la medida de la absorbancia o densidad óptica (DO) a 600 nm del mismo cultivo. La biomasa se evaluó mediante el recuento en placa de MRS agar de células viables capaces de reproducirse (UFC/ml). La medición de la absorbancia que deriva del log del cociente entre la intensidad que incide en el cultivo (I_0) y la intensidad de la luz transmitida (I) por la suspensión ($A = \log I_0/I$), se realizó en un espectrofotómetro (Díaz, 2011, Gámez *et al.*, 2015).

Se realizó una adaptación de la metodología descrita por Gámez *et al.* (2015). Se inoculó una colonia de BAL en 5 ml de MRS caldo y se incubó a 37 °C en microaerofilia por 24 h. El cultivo se colocó en 45 ml de MRS caldo (10 % v/v) y se incubó en microaerofilia a 37 °C. A partir del momento 0, se iniciaron los muestreos:

- 0 h: 1 ml para medir D.O. y 0,1 ml se sembró en MRS puro y 10^{-1}
- 4 h: 1 ml para medir D.O. y 0,1 ml se sembró en MRS 10^{-1} y 10^{-2}
- 6 h: 1 ml para medir D.O. y 0,1 ml se sembró en MRS 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}
- 8 h: 1 ml para medir D.O. y 0,1 ml se sembró en MRS 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}
- 12 h: 1 ml para medir D.O. y 0,1 ml se sembró en MRS 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}
- 24 h: 1 ml para medir D.O. y 0,1 ml se sembró en MRS 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}
- 30 h: 1 ml para medir D.O. y 0,1 ml se sembró en MRS 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}

Los recuentos se realizaron considerando las placas que incluían entre 30 y 300 colonias de modo que el ensayo sea estadísticamente significativo. Y finalmente se realizó la curva de crecimiento comparando los valores de la biomasa y la DO.

C. Evaluación de actividad inhibitoria de las BAL

C.1. Selección de BAL

Los aislamientos de las etapas productivas de carne de cerdo que se utilizaron para analizar la actividad inhibitoria fueron aquellas identificadas mediante las pruebas bioquímicas y ensayos moleculares como BAL (*Lactobacillus* spp. y *Pediococcus* spp.).

Tanto las cepas patógenas como las BAL fueron almacenadas a -70 °C en LB y MRS, respectivamente y suplementadas con 20% de glicerol.

C.2. Ensayo de inhibición

El ensayo de inhibición se realizó siguiendo el procedimiento de inoculación por picadura propuesto por Schillinger (1989) con algunas modificaciones (Figura 9).

Se tomó una alícuota de cada aislamiento de BAL crio conservado a -70 °C y se cultivó en tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de caldo MRS durante 24 h a 37 °C en microaerofilia. A partir de estos cultivos se sumergió un ansa en punta en la suspensión y se sembró por puntura en el centro de una placa de agar MRS. Se utilizaron placas pequeñas (60x15 mm) de vidrio de modo que resistan la exposición al cloroformo. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h en microaerofilia. Paralelamente se tomó una alícuota de los cultivos de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* crio conservados y se colocaron en tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de caldo LB para ser cultivados durante 24 h a 37 °C.

Luego de 24 h, las placas de agar MRS fueron expuestas a vapores de cloroformo durante una hora para inactivar las bacterias crecidas. Se dejaron airear las placas por 15 min

manteniéndolas en la zona estéril. Se prepararon tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de top agar Tripticasa Soya (TSA) (Britania®) con 0,75% de agar. Se fundieron, atemperaron y se le adicionó a cada tubo 3 μ l de un cultivo de 10^7 UFC/ml de cada patógeno (STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*). Una vez eliminados los restos de vapores, se cubrieron las placas con los top conteniendo los microorganismos patógenos sobre los cuales se evaluó la actividad inhibitoria. Las placas se dejaron reposar unos minutos hasta que el agar hubiera solidificado totalmente y luego se incubaron a 37 °C durante 24 h en aerobiosis.

La lectura se realizó mediante la observación de zonas translúcidas indicativas de inhibición de crecimiento de las cepas patógenas por acción de las BAL. La presencia de halos de inhibición mayores de 2 mm alrededor de las picaduras se consideró como prueba positiva (Daeschel, 1985, Sánchez, 2014).

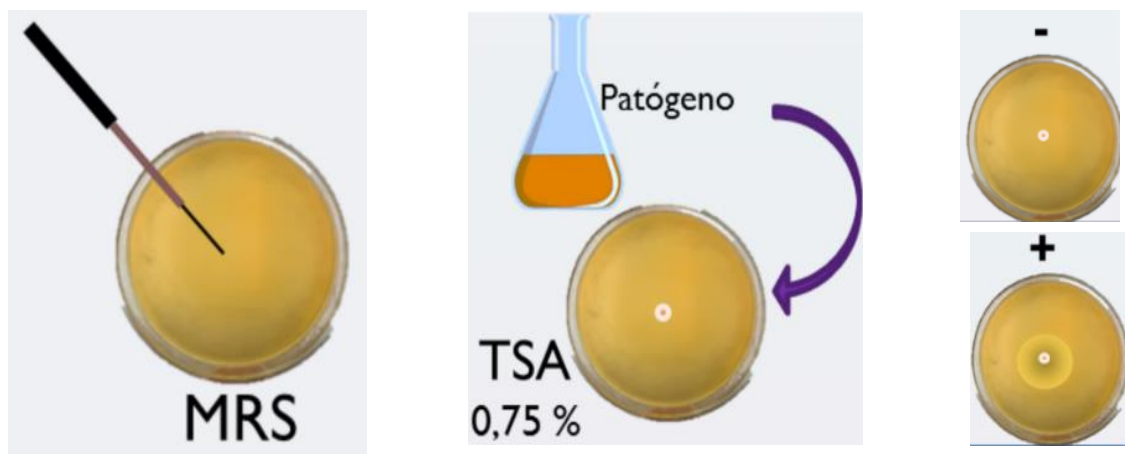


Figura 9: Ensayo de inhibición por picadura de BAL ante bacterias patógenas

C.3. Identificación genética: Secuenciación de Sanger

Se utilizó el método de Secuenciación de Sanger como segundo método genotípico de caracterización. Se seleccionaron los 8 aislamientos con mayor potencial inhibitorio.

C.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de 1 ml de cultivo en caldo MRS a 37 °C durante 24 h. Se utilizó el kit de extracción de ADN para bacterias Gram positivas *Higher Purity Bacterial Genomic DNA Isolation*® (Canvax). El procedimiento fue el siguiente:

- centrifugar el cultivo a 13.000 rpm por 1 min y remover el sobrenadante,
- resuspender el pellet células en 180 µl de Solución *Buffer* BR-1,
- adicionar 10 µl de lisozima e incubar a 37° durante 30 min,
- adicionar 20 µl de solución de ARNsa A, mezclar e incubar por 10 min a 37 °C,
- adicionar 25 µl de proteinasa K y 200 µl de buffer BLU y agitar en vórtex. No adicionar la proteinasa K directamente sobre el buffer BLU,
- incubar por 30 min a 70 °C,
- adicionar 200 µl de etanol (96-100%) y agitar en vórtex,
- transferir con pipeta la suspensión a la mini columna, centrifugar a 13.000 rpm por 1 min y descartar el filtrado,
- colocar la mini columna en el tubo de colección, adicionar 500 µl de buffer WB1, centrifugar a 13.000 rpm por 1 min y descartar el filtrado,
- colocar la mini columna en el tubo de colección, adicionar 500 µl de buffer WB2 y centrifugar a 13.000 rpm por 3 min y descartar el filtrado,

- colocar la mini columna en un tubo de 1,5 ml de microcentrífuga nuevo etiquetado, adicionar 25 μ l de agua precalentada en el centro de la membrana e incubar 1 min a temperatura ambiente,
- centrifugar a 13.000 rpm por 1 min para eluir el ADN.

Finalmente se midió la concentración de ADN (ng/ml) mediante un NanoDrop Lite® (Thermo Scientific) (Figura 10).



Figura 10: NanoDrop Lite® (Thermo Scientific)

C.3.2. Selección de iniciadores o *primers*

Se seleccionaron *primers* universales para amplificar el ADN de regiones específicas del 16S ribosomal por PCR (Tabla 3).

Tabla 3: *Primers* para Secuenciación de Sanger de BAL

	<i>Primer</i>	Secuencia (5' a 3')
BAL	16SFw	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	16SRv	GAAAGGAGGTGATCCAGCCG

C.3.3. Mezcla de reacción o cóctel

El cóctel de reacción con volumen final de 20 μ l se realizó en una solución de buffer de reacción 1x, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP's 100 μ M, 0,25 μ M de *Primer reverse* y 0,25 μ M de *Primer forward*, 1% de Dimetil Sulfóxido (DMSO), 1 U de *Taq* Polimerasa BioTaq (BioTools) y 25 ng de ADN bacteriano.

C.3.4. Programa de amplificación

La amplificación se realizó en un termociclador con un programa específico que incluye:

- desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min,
- 30 ciclos: desnaturalización a 95 °C por 1 min, *annealing* o alineamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min,
- extensión final de 7 min a 72 °C

C.3.5. Purificación de productos de PCR

Los productos de las reacciones de PCR se purificaron mediante precipitación con AcNa/EtOH y se resuspendieron en 15 μ l de H₂O Milli-Q® estéril. Se tomaron 6 μ l del ADN purificado por cada reacción de secuenciación, una por cada primer (16SFw y 16SRv).

C.3.6. Secuenciación de Sanger

Las secuencias obtenidas de cada aislamiento se alinearon para conseguir la secuencia completa del ADN 16S ribosomal (programa megalign de DNASTar) (Figura 11). Cada secuencia fue analizada mediante BLAST en la base de datos del GeneBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).



Figura 11: Secuenciador de Sanger

C.4. Selección de BAL con mayor potencial inhibitorio

Los ensayos que siguen a continuación se realizaron con *L. plantarum* que resultó ser la BAL con mayor potencial inhibitorio.

Se utilizó la metodología anteriormente descrita en los ensayos de inhibición para enfrentar *L. plantarum* ante 99 cepas de STEC. Estas cepas patógenas fueron aisladas de casos de diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta y SUH por el Instituto Nacional de Epidemiología Dr. H. Jara dependiente de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud Dr. Carlos G. Malbrán y por el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Chile. Las cepas utilizadas corresponden a los serotipos: O157:H7, no-O157:H7, O145: NM, O103:H2, O26:H21 y O121:H19.

C.5. Producción de la sustancia antibacteriana de *L. plantarum*

C.5.1. Cinética de producción de la sustancia antibacteriana

A lo largo del tiempo, se evaluó la cinética de producción de la sustancia antibacteriana con el objetivo de determinar en qué momento es producida. Para ello, a partir de un cultivo de *L. plantarum* se obtuvo el sobrenadante libre de células (SLC) desde la hora 0 hasta la hora 30 y se evaluó en distintos tiempos la actividad inhibitoria ante cada uno de los patógenos seleccionados.

Se inoculó *L. plantarum* en 5 ml de caldo MRS e incubó a 37 °C por 24 h en microaerofilia (se colocó una alícuota desde el freezer de O157:H7 en 3 ml de LB e incubó a 37 °C por 24 h). Luego se colocaron los 5 ml de cultivo en un Erlenmeyer con 45 ml de caldo MRS y se realizaron los muestreos a la hora 0, 4, 6, 8, 12, 24 y 30. En cada muestreo se tomó 1,5 ml de cultivo y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml estéril para obtener los SLC. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y a 13000 rpm por 10 min. Luego se filtró utilizando una membrana de 0,22 μ y se conservó en refrigeración a 4 °C hasta completar los muestreos.

Concluidos los muestreos se colocaron 500 μ l de cada SLC en pocillos de una placa de 24 pocillos y se agregó a cada uno 10 μ l de un cultivo de STEC O157:H7 de concentración 10^6 UFC/ml. Se utilizaron como controles positivos pocillos conteniendo 500 μ l de LB y 10 μ l de STEC O157:H7 de concentración 10^6 UFC/ml (Figura 12). La placa se incubó durante 24 h a 37 °C.

Luego de la incubación, se tomaron 100 μ l de cada pocillo y se realizaron diluciones seriadas con solución fisiológica disminuyendo 6 logaritmos la concentración obtenida. Se sembraron las diluciones -5 y -6 en placas de agar Mac Conkey y luego de 24 h de incubación a 37 °C se compararon los recuentos de UFC/ml de los tratados y los controles.



Figura 12: Microplaca con SLC de *L. plantarum* tratados y controles

C.5.2. Concentración de la sustancia antibacteriana

Los SLC obtenidos a la hora 0 y a la hora 12 fueron diluidos en solución fisiológica a una concentración 1/10 y 1/100 y enfrentados nuevamente a la bacteria patógena para estimar el rango de concentración de la sustancia inhibitoria.

Confirmado el rango de concentración, se estimó la concentración aproximada de la sustancia inhibitoria. Se inoculó una alícuota de *L. plantarum* en 5 ml de caldo MRS y se incubó en microaerofilia y por otra parte se colocó una alícuota de STEC O157:H7 en 3 ml de LB caldo. Ambos se incubaron a 37 °C durante 18 h.

El cultivo de *L. plantarum* se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min y a 10.000 rpm por 10 min y se filtró utilizando una membrana de 0,22 μ . Las alícuotas del SLC obtenido se inocularon en cada pocillo de la microplaca según el porcentaje correspondiente (Figura 13).

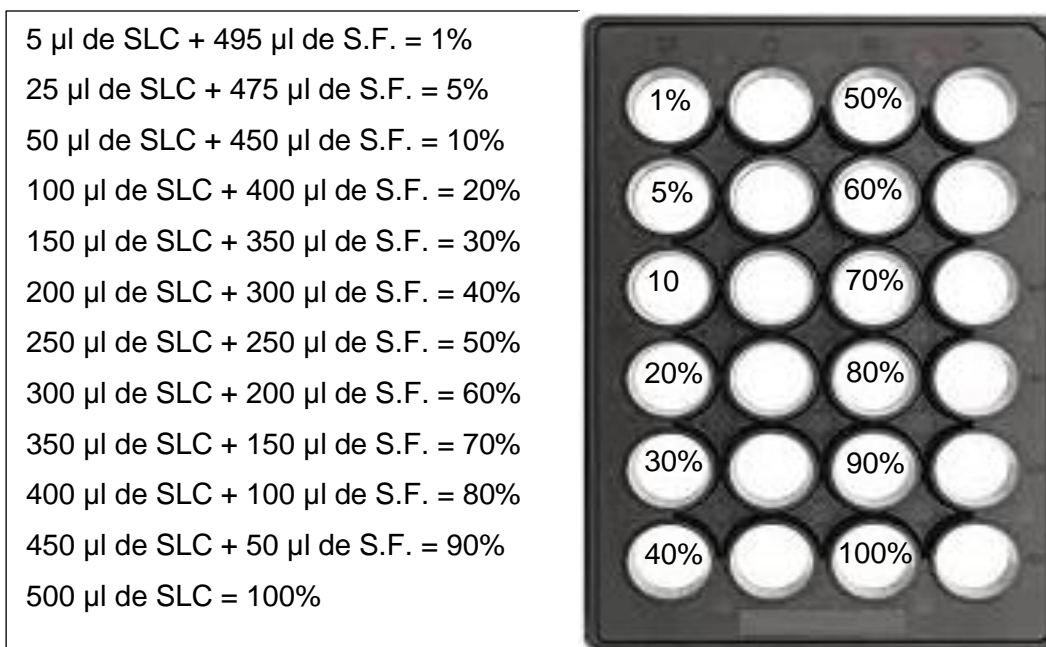


Figura 13: Diferentes concentraciones del SLC para la determinación de la dosis mínima inhibitoria

Se agregaron 10 µl de *E. coli* O157:H7 de 10^6 UFC/ml a cada pocillo y se incubó la microplaca a 37 °C durante 18 h.

Posteriormente, se tomaron 100 µl de cada pocillo, se sembraron en placas de Mac Conkey y se incubaron a 37 °C durante 24 h. El resultado se obtuvo por recuento de UFC/ml.

C.6. Determinación de la naturaleza química de la sustancia antibacteriana de *L. plantarum*

La naturaleza química de la sustancia antibacteriana de *L. plantarum* fue evaluada mediante dos ensayos bioquímicos.

C.6.1. Naturaleza química de la sustancia antibacteriana

C.6.1.a. Ensayo I

La determinación de la sustancia antibacteriana se realizó con base en la metodología descrita por Quillama (1998) y Moraes *et al.* (2010) (Figura 14). Se inoculó *L. plantarum* en 30 ml de caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 37 °C. El cultivo obtenido se centrifugó durante 15 min a 13.000 rpm a 4 °C y se obtuvo el SLC mediante un filtro de 0,22 µ. Se obtuvieron 4 fracciones de 500 µl. Una de ellas, fue neutralizada a pH7 (SLC7), otra tratada con 20 µl de catalasa de 1 mg/ml de concentración e incubación por 1 hora a 37 °C (SLCcat) y las dos últimas tratadas con distintas concentraciones de proteinasa K: 0,5 mg/ml de concentración final (SLCprK0,5) y 1 mg/ml de concentración final (SLCprK1) e incubación por 1 hora a 37 °C.

Posteriormente se colocó en una microplaca de 96 pocillos por octuplicado:

- 1: 200 µl de MRS
- 2: 200 µl de MRS + 4 µl de O157:H7
- 4: 200 µl de SLC
- 5: 200 µl de SLC + 4 µl de O157:H7
- 7: 200 µl de SLC7
- 8: 200 µl de SLC7 + 4 µl de O157:H7
- 10: 200 µl de SLC tratado con catalasa + 4 µl de O157:H7
- 11: 200 µl de SLC tratado con proteinasa K 0,5 mg/ml + 4 µl de O157:H7
- 12: 200 µl de SLC tratado con proteianasa K 1 mg/ml + 4 µl de O157:H7

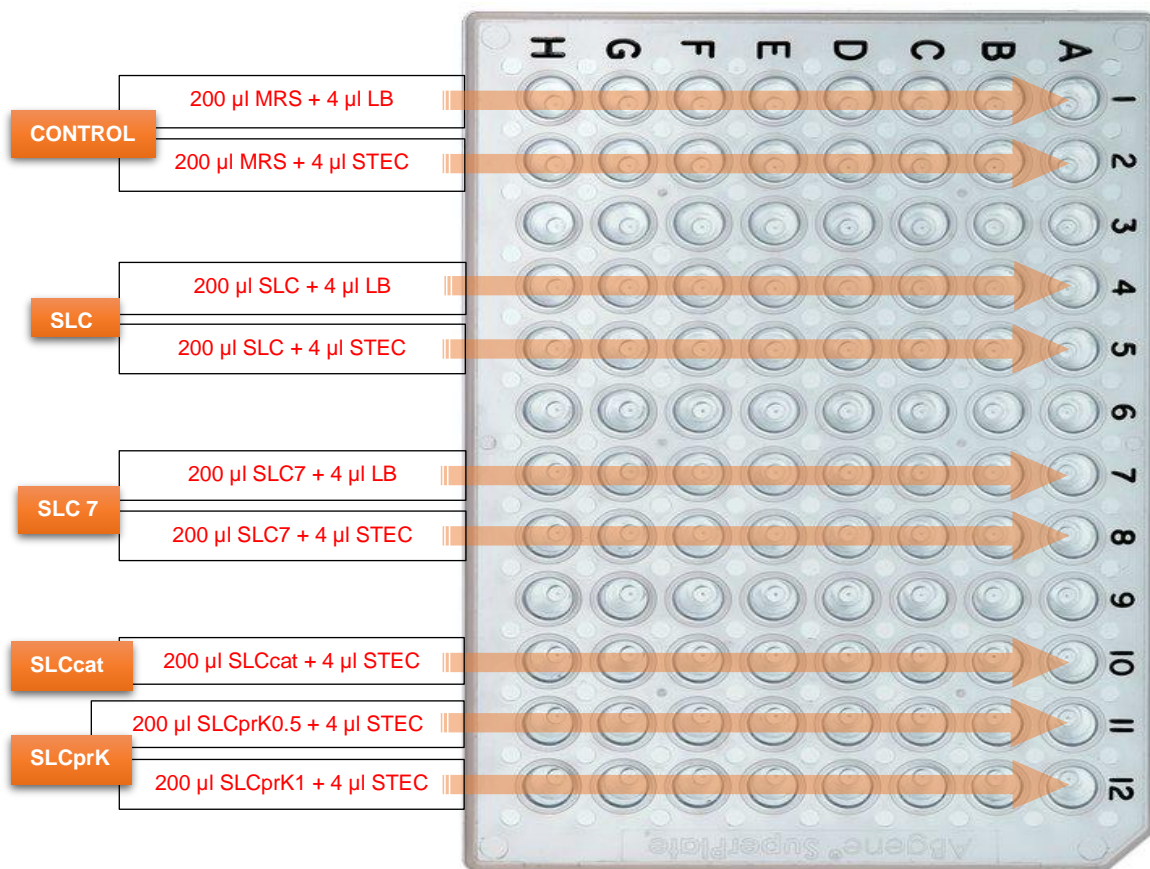


Figura 14: Esquema de los distintos tratamientos del SLC

La microplaca se incubó durante 24 h a 37 °C y posteriormente se midió la D.O. a 570 nm en un lector de ELISA. A modo confirmatorio, se tomaron 100 µl del primer pocillo de cada línea y se sembraron en placas de Mac Conkey para realizar los recuentos de UFC/ml luego de 24 h de incubación a 37 °C.

C.6.1.b. Ensayo II

El segundo ensayo realizado para confirmar la naturaleza química de la sustancia inhibitoria se realizó con base en la metodología descrita por Quillama (1998) y Hernandez

et al. (2005). Se realizó un cultivo *overnight* de *L. plantarum* en 3ml de caldo MRS y de STEC O157:H7 en 3 ml de caldo LB. Los cultivos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los SLC fueron transferidos a tubos estériles filtrando con una membrana de 0,22 µm y se separaron las siguientes fracciones en 4 tubos de 500 µl:

- TUBO 1: SLC sin tratar.
- TUBO 2: SLC neutralizado con NaOH 1N (pH 7)
- TUBO 3: SLC neutralizado y tratado con 20 µl de catalasa (1 mg/ml) e incubado 1 h a 37 °C.
- TUBO 4: SLC neutralizado y tratado con proteinasa K (1 mg/ml y 0,5 mg/ml finales) e incubado 1 h a 37 °C.

Luego, se inocularon 70 µl de STEC O157:H7 en 10 ml de top de LB agar blando (0,7% agar) y se colocaron sobre placas de LB agar (1,5%). Solidificado el medio, se colocaron gotas de cada tubo sobre la placa más una gota de medio sin inocular utilizado como control. Los SLC se dejaron difundir por 30 min y las placas se incubaron sin invertir por 24 h a 37 °C. La lectura se realizó mediante la observación de los halos de inhibición alrededor de cada gota.

C.6.2. Identificación genética de la sustancia antibacteriana

Analizada la naturaleza química de la sustancia antibacteriana, se evaluó la presencia de plantaricinas en el genoma bacteriano y se realizó la expresión de genes de plantaricinas.

C.6.2.a. Detección genética de plantaricinas

Se diseñaron *primers* a partir de genomas completos de *L. plantarum* cepas de referencia ST III y WCFS1 disponibles en NCBI utilizando el programa *Primer3Plus* (*online*) (Tabla 4).

Tabla 4: *Primers* para la detección genética de plantaricinas

<i>Nombre</i>	Secuencia (5'→3')	T _m (°C)	Amplificación (pb)
<i>Plantaricin E</i>	ACTTTTCAAATACCACGAATGC	59,4	150
	GAGAAGTTACAATATTCAGGTTGC	59,5	
<i>Plantaricin J</i>	TAACGACGGATTGCTCTGC	60	166
	TGACTGTGAACAAAATGATTAAGGA	59,9	
<i>Plantaricin N</i>	GATAAAATTGCCGGGTTAGG	58,4	153
	ACCTAAACCATGCCATGCAC	60,8	
<i>Plantaricin L</i>	CAATCGCAGTGACTTCCAGA	60	209
	AGTGCTCTTTGTGGCTGGTT	59,9	
<i>Plantaricin K</i>	TCACTTATTATAATCCCTTGAACCA	58,1	150
	AATGAATTTGAAGAATTAAGTCTGA	59,6	
<i>Plantaricin F</i>	ACAGCGCTAATGACCCAATC	60,1	125
	CTAGTTTTGCGTGACCGTGA	59,9	

El cóctel de volumen final de 25 µl utilizado para la PCR se realizó en una solución de buffer 67 mM Tris/HCl (pH 8,8), Tritón 0,45%, MgCl₂ 4 mM, Gelatina 0,2 mg, (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, dNTPs 0,2 mM, *Primer reverse* y *forward* 3 ng de cada uno, *Platinum Taq* (*Invitrogen*) 0,5U, 2,5 µl de ADN

El programa de amplificación utilizado para identificar las plantaricinas consta de los siguientes ciclos:

- paso inicial a 94 °C durante 2 min.
- 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg.
- paso final a 72 °C durante 3 min.

C.6.2.b. Expresión genética de plantaricinas

Una vez confirmada la presencia de plantaricinas en el *L. plantarum* seleccionado, se determinó la expresión de los genes correspondientes a las plantaricinas. Se realizó la extracción de RNA utilizando el Kit de extracción *SV Total RNA Isolation System*® (Promega) según las especificaciones del fabricante para bacterias Gram positivas. La concentración del RNA obtenido se midió en un Nanodrop Lite® (Thermo Scientific). Luego se realizó una retrotranscripción con el Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* para obtener el cDNA. Los productos de la retrotranscripción fueron utilizados para la PCR con los *primers* correspondientes a las plantaricinas.

D. Actividad de sustancias antibacterianas concentradas

Se utilizó la liofilización como técnica de concentración de los productos metabólicos inhibitorios de las BAL para determinar el potencial aumento de efecto antibacteriano. La liofilización es un proceso que tiene como objetivo separar el agua presente de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida. Mediante este método, los productos metabólicos de las bacterias se concentran evitando el pasaje por la fase líquida y en consecuencia los cambios enzimáticos, biológicos y químicos.

Se seleccionaron aquellas BAL que ejercían efecto antibacteriano ante los tres patógenos (STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*).

Las BAL fueron cultivadas a partir de una alícuota crio conservada en un tubo Falcon de 50 ml con 25 ml de caldo MRS e incubadas durante 24 h a 37 °C en microaerofilia. Una vez obtenidos los cultivos, se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 min a 4 °C y se filtraron con una membrana de 0,22 µm. El SLC obtenido se congeló a -70 °C y se introdujo en el liofilizador (Thermovac®) (Figura 15) durante 24 a 48 h.



Figura 15: Liofilizador del SLC

Una vez obtenido el liofilizado del SLC, se procedió al ensayo de inhibición ante las bacterias patógenas según la metodología descrita por Klaenhammer (1998) (Figura 16). En este caso, se preparó una dilución con solución fisiológica de los cultivos de las bacterias patógenas hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 3 de la escala de Mac Farland. Cada suspensión se sembró en placas de TSA mediante un hisopo. Las placas se dejaron secar y se realizaron pocillos de 7 mm de diámetro con un sacabocados. Posteriormente se sembró en cada pocillo 35 μ l del SLC liofilizado obtenido de los cultivos de las BAL. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en aerobiosis. Y finalmente se realizó la lectura mediante la determinación de la medida del diámetro del halo de inhibición de crecimiento de las cepas patógenas indicadoras.



Figura 16: Ensayo de difusión en agar del SLC ante las bacterias patógenas

E. Interacción de dos BAL ante bacterias patógenas

La interacción entre BAL se realizó mediante una adaptación del método descrito por Ruíz *et al.* (2012) (Figura 17). Se utilizaron las BAL que presentaron actividad antibacteriana ante los tres patógenos STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*.

Se tomó una alícuota de los cultivos de BAL crio conservados, se inoculó en caldo MRS y se incubó a 37 °C durante 24 h en microaerofilia. Obtenidos los cultivos, se sembraron en placas de agar MRS en estrías perpendiculares todas las combinaciones de pares de BAL. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en microaerofilia.

Paralelamente se tomó una alícuota de cada bacteria patógena y se cultivó en un tubo Falcon de 15 ml con 3 ml de LB a 37 °C durante 24 h.

Cumplido el tiempo de incubación, las placas de MRS se expusieron a vapores de cloroformo para inactivar las células durante una hora y se airearon durante 15 min. A partir de las suspensiones de los patógenos con una densidad óptica correspondiente al tubo 1 de la escala de Mac Farland se sumergió un hisopo para extender el microorganismo en varias direcciones en el espacio comprendido entre las dos estrías de las BAL. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en aerobiosis.



Figura 17: Ensayo de interacción de dos BAL

La observación de las zonas de difusión permitió interpretar los resultados en tres posibles escenarios (Figura 18):

Sinergismo

El sinergismo se produce cuando se observa en la zona donde difunden los metabolitos de ambas BAL, un halo de inhibición de mayor diámetro al producido en la zona donde difunden los metabolitos de cada BAL en forma independiente.

Antagonismo

El antagonismo se produce cuando se observa en la zona donde difunden los metabolitos de ambas BAL, un halo de inhibición de menor diámetro al producido en la zona donde difunden los metabolitos de cada BAL en forma independiente, se produce una cuña de crecimiento bacteriano.

Indiferencia

La indiferencia se produce cuando en la zona donde difunden los metabolitos de ambas BAL y en la zona donde difunden los metabolitos de cada BAL en forma independiente, se observan zonas de inhibición con igual diámetro.



Figura 18: Resultados posibles del ensayo de interacción de BAL

F. *Biofilms*: acción de BAL ante bacterias patógenas

F.1. Formación de *biofilms* de BAL

Se evaluó si las BAL presentaban capacidad de formación de *biofilms* a temperatura ambiente (25 °C) y a temperatura de refrigeración (4 °C).

Se seleccionaron las BAL que presentaron actividad antibacteriana ante los tres patógenos: STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*. Una alícuota de cada cultivo de BAL crio conservado fue inoculada en un tubo Falcon de 15 ml con 3 ml de caldo MRS e incubada a 37 °C durante 24 h en microaerofilia.

Para evaluar la formación de *biofilms* se utilizaron dos placas de 96 pocillos fondo en U. En cada pocillo se colocaron 180 µl de caldo MRS con 20 µl del cultivo de las BAL. Una de las placas fue incubada a temperatura ambiente (25 °C) durante 48 h y la otra a temperatura de refrigeración (4 °C) durante 7 días. Se removió el contenido de las dos placas y cada pocillo fue lavado tres veces mediante pipeta con 250 µl de solución fisiológica. De esta forma se eliminan aquellas células en estado planctónico, no adheridas.

Los pocillos se llenaron con 250 µl de metanol al 99%. Se dejó reposar el alcohol durante 15 min, se extrajo mediante pipeta y las placas se dejaron secar a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó la tinción con 200 µl de cristal violeta al 2%. Se dejó actuar al colorante durante 5 min. Se lavaron los pocillos con 250 µl de agua destilada. Y finalmente se adicionaron 160 µl de ácido acético glacial para resuspender el material adherido. La lectura de la absorbancia se realizó a 405 nm en un lector de microplacas de ELISA.

F.2. Reducción de *biofilms* de bacterias patógenas

La capacidad de las BAL de reducir *biofilms* de las bacterias patógenas se realizó con base en la técnica descrita por Woo (2013).

En primer lugar, se seleccionó la BAL con mayor capacidad antibacteriana y que formara *biofilms* ante los tres patógenos: STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*. Se tomó una alícuota del cultivo crio conservado, se inoculó en un tubo Falcon de 15 ml con 3 ml de caldo MRS e incubó a 37 °C durante 24 h en microaerofilia. Paralelamente se tomó una alícuota de los cultivos patógenos, se inocularon en un tubo Falcon de 15 ml con 3 ml de LB e incubaron a 37 °C durante 24 h. Se utilizaron placas de 12 pocillos de fondo plano donde se introdujeron cubreobjetos circulares capaces de ser removidos.

La capacidad inhibitoria de la formación de *biofilms* fue evaluada en tres ensayos:

Competencia

La BAL y las cepas patógenas fueron co-cultivadas en pocillos que contenían cubreobjetos en su interior. Se colocó una concentración de 10^5 UFC/ml de ambos cultivos (BAL + STEC, BAL + *S. Tiphymurium* y BAL + *S. aureus* en tres pocillos diferentes). De esta manera se permite la formación de un *biofilm* mixto en competencia.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 72 h en aerobiosis. Luego, se extrajo el cubreobjetos de cada combinación y se realizó el lavado mediante pipeta con PBS. Los cubreobjetos se colocaron en tubos Falcon de 50 ml con 5 ml de solución fisiológica y agitaron durante 2 h.

De cada tubo, se tomaron 100 μ l y se sembraron en placas de agar MRS para determinación de BAL y en agar Mac Conkey para STEC, agar *Salmonella-Shigella* (S-S) para *S. Tiphymurium* y Agar Manitol Salado (AMS) para *S. aureus*.

El recuento y la comparación entre las placas de BAL y STEC, BAL y *S. Tiphymurium* y BAL y *S. aureus*, se realizaron a las 24 h de incubación a 37 °C (Figura 19).

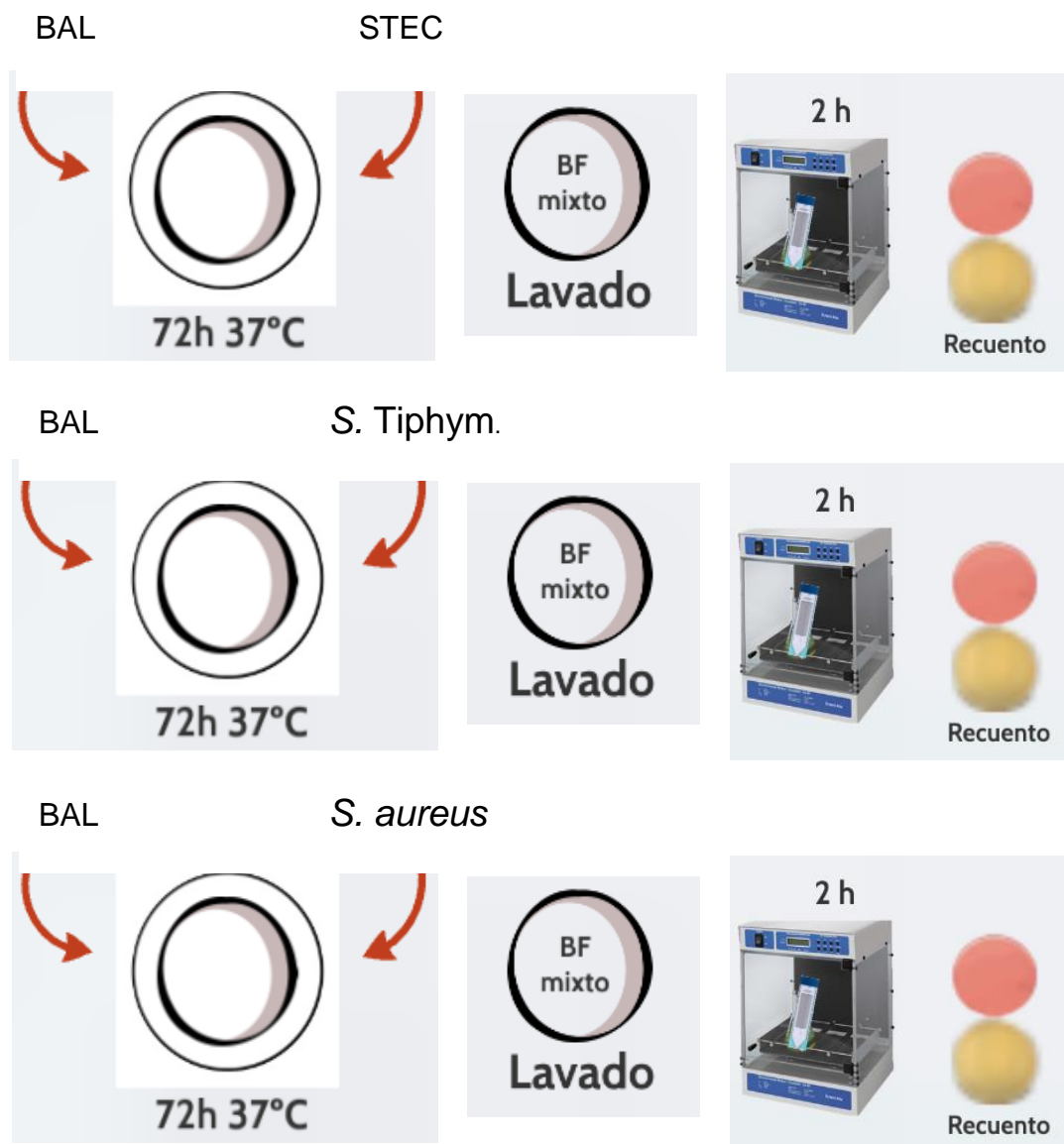


Figura 19: Ensayo de Competencia de BAL ante STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*

*BF: *Biofilm*

Exclusión

Se colocó en los pocillos con cubreobjetos una concentración de 10^5 UFC/ml de la BAL. De esta manera se permite la formación de un *biofilm* único de la BAL. Se incubó a 37°C durante 72 h.

Cumplido el tiempo, se extrajeron los cubreobjetos para realizar el lavado mediante pipeta con PBS y se colocaron en nuevos pocillos.

Las bacterias patógenas STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* en una concentración de 10^5 UFC/ml se sembraron sobre los pocillos que contenían *biofilms* de la BAL.

Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h en aerobiosis. Luego, se extrajo el cubreobjetos de cada combinación y se realizó el lavado mediante pipeta con PBS. Los cubreobjetos se colocaron en tubos Falcon de 50 ml con 5 ml de solución fisiológica y agitaron durante 2 h.

De cada tubo, se tomaron $100\ \mu\text{l}$ y se sembraron en placas de agar MRS para determinación de BAL y en agar Mac Conkey para STEC, agar S-S para *S. Tiphymurium* y AMS para *S. aureus*.

El recuento y la comparación entre las placas de BAL y STEC, BAL y *S. Tiphymurium* y BAL y *S. aureus*, se realizaron a las 24 h de incubación a 37°C (Figura 20).

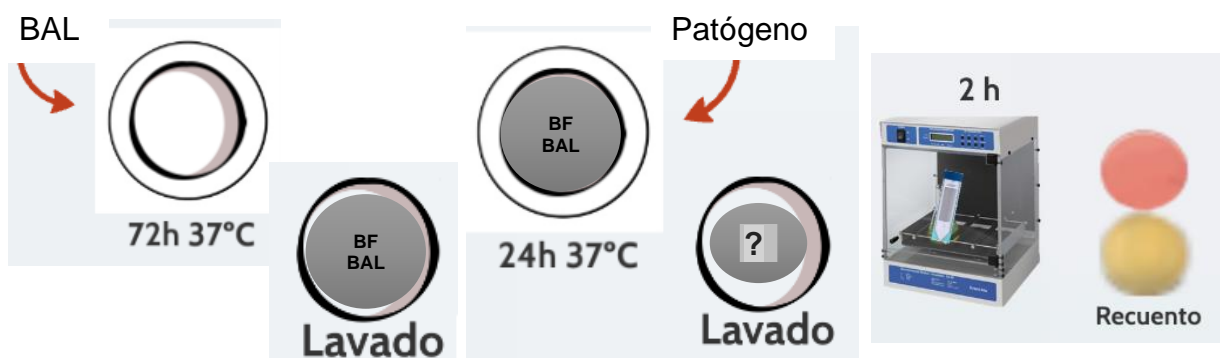


Figura 20: Ensayo de Exclusión ante STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*

Desplazamiento

Se colocó en los pocillos con cubreobjetos una concentración de 10^5 UFC/ml de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*. De esta manera se permite la formación de un *biofilm* único de cada bacteria patógena. Se incuban a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 h.

Cumplido el tiempo, se extrajeron los cubreobjetos para realizar el lavado mediante pipeta con PBS y se colocaron en nuevos pocillos.

La BAL en una concentración de 10^5 UFC/ml se sembró sobre los pocillos que contenían *biofilms* de los patógenos.

Las placas se incubaron a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h en aerobiosis. Luego, se extrajo el cubreobjetos de cada combinación y se realizó el lavado mediante pipeta con PBS. Los cubreobjetos se colocaron en tubos Falcon de 50 ml con 5 ml de solución fisiológica y agitaron durante 2 h.

De cada tubo, se tomaron $100\text{ }\mu\text{l}$ y se sembraron en placas de agar MRS para determinación de BAL y en agar Mac Conkey para STEC, agar S-S para *S. Tiphymurium* y AMS para *S. aureus*.

El recuento y la comparación entre las placas de BAL y STEC, BAL y *S. Tiphymurium* y BAL y *S. aureus*, se realizaron a las 24 h de incubación a $37\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 21).

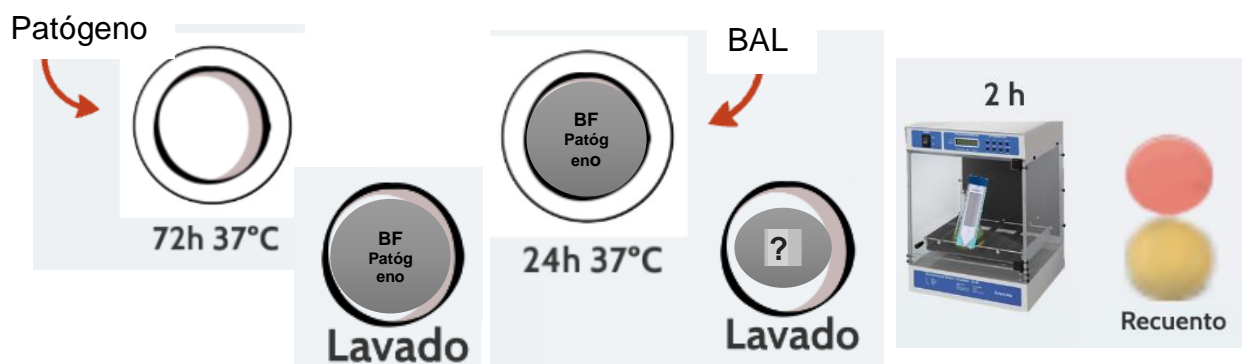


Figura 21: Ensayo de Desplazamiento ante STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*

G. Aplicación de *L. plantarum* en carne porcina

El ensayo sobre matrices de carne porcina se realizó con base a los procedimientos de Calderón *et al.* (2007) con modificaciones. Se realizó un primer ensayo en forma conjunta con INTA Castelar. Luego se hizo una adaptación en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología ajustando algunos parámetros.

G.1. Ensayo I

El ensayo I sobre la matriz cárnica se realizó en el Laboratorio de Microbiología de INTA Castelar.

G.1.1. Selección de BAL y bacterias patógenas

Se seleccionó *L. plantarum* como la BAL con mayor potencial inhibitorio ante las tres bacterias patógenas estudiadas para realizar el ensayo sobre la matriz cárnica.

Se utilizaron STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* como bacterias indicadoras de la actividad antibacteriana.

G.1.2. Preparación de cultivos

Se colocó una alícuota del cultivo crio conservado de *L. plantarum* en 10 ml de caldo MRS. Se incubó a 37 °C durante 24 h en microaerofilia. El cultivo obtenido se inoculó completamente en 1 l de caldo MRS. Se incubó nuevamente en las mismas condiciones. Paralelamente, los cultivos crioconservados de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*, se sembraron en estrías en placas de agar Mac Conkey, agar S-S y AMS, respectivamente. Se incubaron a 37 °C durante 24 h. A partir de cada placa, se introdujo con ansa en aro una alícuota de la zona de crecimiento confluyente en tubos con 10 ml de caldo LB.

G.1.3. Preparación de matriz cárnica

La matriz cárnica utilizada fue carré de cerdo deshuesado. Se cortaron fetas de 1 cm de espesor y 25 g de peso. Posteriormente se envasaron al vacío en bolsas plásticas y se conservaron a -4°C hasta ser utilizadas.

G.1.4. Lavado de los cultivos

G.1.4.1. Lavado de *L. plantarum*

El cultivo de *L. plantarum* se fraccionó en tubos Falcon de 50 ml con 35 ml y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 35 ml de PBS 1X (pH7). Se repitió el procedimiento y reunió todo el cultivo lavado en

dos frascos de 500 ml. Se conservó en refrigeración hasta ser aplicado a las fetas de carne. Se midió la D.O. a 600 nm en espectrofotómetro (Figura 22).



Figura 22: Cultivos de *L. plantarum* lavados y resuspendidos en PBS

G.1.4.2. Lavado de cultivos patógenos

Los cultivos de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* fueron distribuidos en 5 Eppendorf con 1 ml para ser centrifugados a 12.000 rpm durante 2 min. El pellet obtenido, se resuspendió con 0,1 ml de PBS. Se reunieron los cultivos en un solo tubo obteniendo un volumen de 0,5 ml de cada patógeno. Se conservaron en refrigeración hasta la inoculación sobre la matriz cárnica. Se midió la D.O. a 600 nm en espectrofotómetro.

G.1.5. Inoculación de patógenos y *L. plantarum* en matriz cárnica

Se trabajó por triplicado para cada patógeno (STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*) y cada análisis (24 h, 48 h, control), siendo un total de 27 fetas de carne (Tabla 5).

Tabla 5: Número de fetas de carne de cerdo a analizar

Patógeno	Tratadas 24h	Tratadas 48h	Control	Total
STEC	3	3	3	9
<i>S. Tiphymurium</i>	3	3	3	9
<i>S. aureus</i>	3	3	3	9
Total	9	9	9	27

Se colocaron las fetas de carne sobre bandejas estériles (Figura 23). Cada uno de los patógenos fue inoculado en 9 fetas con 50 µl mediante un tip y espátula, siendo un total de 27 fetas. Se dejaron reposar durante 15 min para permitir la adherencia del patógeno.

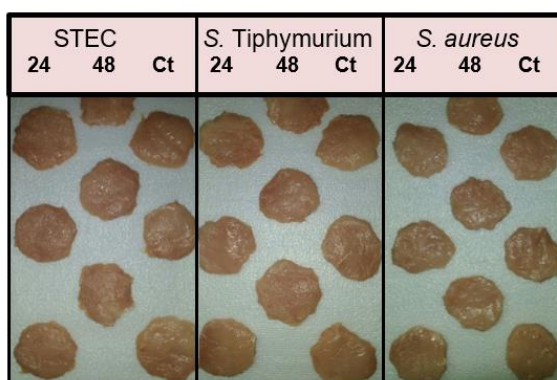


Figura 23: Preparación de fetas cárnicas a inocular

Posteriormente, se armó el dispositivo de aspersion (Figura 24). En primer lugar, se colocó 1 l de agua estéril para el tratamiento de las fetas control, quedando inoculadas sólo con el patógeno. Se dispuso la pistola a 17 cm de altura de la feta y se emitió el contenido durante 5 seg.



Figura 24: Aspersión automática de *L. plantarum* en solución

Cada feta se introdujo en bolsas plásticas, se envasaron al vacío y se conservaron en cámara frigorífica a 1 °C hasta el día siguiente (Figura 25). Igual metodología se realizó para aspersión de *L. plantarum*. Se introdujo en el equipo aspersor el cultivo lavado de *L. plantarum* y se trataron cada una de las fetas restantes (6 con STEC: 3 para 24 y 3 para 48 h, 6 con *S. Tiphymurium*: 3 para 24 y 3 para 48 h, y 6 con *S. aureus*: 3 para 24 y 3 para 48 h). Se envasan al vacío y se llevan a cámara de 1 °C.



Figura 25: Envasado al vacío de fetas de carne de cerdo inoculadas con bacterias patógenas y tratadas con *L. plantarum*

G.1.6. Análisis de muestras de 24 h

Cumplidas las 24 h en refrigeración, se procedió al análisis de las muestras correspondientes. Se tomó cada una de las fetas de carne y se introdujeron en bolsas de *Stomacher*. Se adicionaron 225 ml de agua de peptona 0,1% y se llevó a agitación en *Stomacher* durante 1 min.

Se conservaron en refrigeración hasta el momento de realizar las diluciones. En tubos con 9 ml de agua de peptona al 1%, se realizaron las diluciones hasta la concentración 10^{-2} UFC/ml y 10^{-3} UFC/ml (Figura 26).



Figura 26: Diluciones de las muestras tras el tratamiento de la matriz cárnica con bacterias patógenas y *L. plantarum*

Se tomaron 100 μ l de cada tubo y se sembraron en placas por duplicado. Se sembraron 36 placas: 12 de agar Mac Conkey para cuantificación de STEC, 12 de agar S-S para *S. Tiphymurium* y 12 de AMS para *S. aureus*. Se incubaron a 37 °C durante 24 h (Tabla 6).

Tabla 6: Preparación de placas específicas de cada patógeno para análisis de muestras de 24 h

	Muestras	Análisis 24 h		Análisis 48 h		Análisis Ct		Total
		10 ⁻² UFC/ml	10 ⁻³ UFC/ml	10 ⁻² UFC/ml	10 ⁻³ UFC/ml	10 ⁻² UFC/ml	10 ⁻³ UFC/ml	
STEC	1	●●	●●	●●	●●	●●	●●	12
	2	●●	●●	●●	●●	●●	●●	12
	3	●●	●●	●●	●●	●●	●●	12
<i>S. Tiphymurium</i>	1	●●	●●	●●	●●	●●	●●	12
	2	●●	●●	●●	●●	●●	●●	12
	3	●●	●●	●●	●●	●●	●●	12
<i>S. aureus</i>	1	●●	●●	●●	●●	●●	●●	12
	2	●●	●●	●●	●●	●●	●●	12
	3	●●	●●	●●	●●	●●	●●	12
Total		36		36		36		108

G.1.7. Análisis de muestras de 48 h

Cumplidas las 48 h de refrigeración, se procedió al análisis de las muestras de 48 h. Se utilizó la misma metodología que para las muestras analizadas a las 24 h.

Se sembraron 36 placas para las muestras de 48 h: 12 de agar Mac Conkey para cuantificación de STEC, 12 de agar S-S para *S. Tiphymurium* y 12 de AMS para *S. aureus*. Se incubaron a 37 °C durante 24 h (Tabla 7).

Tabla 7: Preparación de placas específicas de cada patógeno para análisis de muestras de 48 h

	Muestras	Análisis 24 h		Análisis 48 h		Análisis Ct		Total
		10 ⁻² UFC/ml	10 ⁻³ UFC/ml	10 ⁻² UFC/ml	10 ⁻³ UFC/ml	10 ⁻² UFC/ml	10 ⁻³ UFC/ml	
STEC	1	● ●	● ●	○ ○	○ ○	● ●	● ●	12
	2	● ●	● ●	○ ○	○ ○	● ●	● ●	12
	3	● ●	● ●	○ ○	○ ○	● ●	● ●	12
<i>S. Tiphymurium</i>	1	● ●	● ●	○ ○	○ ○	● ●	● ●	12
	2	● ●	● ●	○ ○	○ ○	● ●	● ●	12
	3	● ●	● ●	○ ○	○ ○	● ●	● ●	12
<i>S. aureus</i>	1	● ●	● ●	○ ○	○ ○	● ●	● ●	12
	2	● ●	● ●	○ ○	○ ○	● ●	● ●	12
	3	● ●	● ●	○ ○	○ ○	● ●	● ●	12
Total		36		36		36		108

G.1.8. Análisis de muestras control

Las muestras control fueron analizadas a las 48 h de refrigeración. Se utilizó la misma metodología que para las muestras analizadas a las 24 y 48 h.

Se sembraron 36 placas para las muestras control: 12 de agar Mac Conkey para cuantificación de STEC, 12 de agar S-S para *S. Tiphymurium* y 12 de AMS para *S. aureus*. Se incubaron a 37 °C durante 24 h (Tabla 8).

Tabla 8: Preparación de placas específicas de cada patógeno para análisis de muestras control

	Muestras	Análisis 24 h		Análisis 48 h		Análisis Ct		Total
		10 ⁻² UFC/ml	10 ⁻³ UFC/ml	10 ⁻² UFC/ml	10 ⁻³ UFC/ml	10 ⁻² UFC/ml	10 ⁻³ UFC/ml	
STEC	1	● ●	● ●	● ●	● ●	○ ○	○ ○	12
	2	● ●	● ●	● ●	● ●	○ ○	○ ○	12
	3	● ●	● ●	● ●	● ●	○ ○	○ ○	12
<i>S.</i> Tiphymurium	1	● ●	● ●	● ●	● ●	○ ○	○ ○	12
	2	● ●	● ●	● ●	● ●	○ ○	○ ○	12
	3	● ●	● ●	● ●	● ●	○ ○	○ ○	12
<i>S. aureus</i>	1	● ●	● ●	● ●	● ●	○ ○	○ ○	12
	2	● ●	● ●	● ●	● ●	○ ○	○ ○	12
	3	● ●	● ●	● ●	● ●	○ ○	○ ○	12
Total		36		36		36		108

G.1.9. Comparación de la cuantificación de bacterias viables

Una vez que se obtuvo la cuantificación de bacterias viables de las muestras de 24 h, 48 h y control, se compararon los resultados para determinar la reducción o no de los patógenos en la matriz cárnica (Figura 27).



Figura 27: Cuantificación de UFC/ml para analizar la reducción de patógenos en la matriz cárnica

G.2. Ensayo II

El ensayo II sobre la matriz cárnica se realizó en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, ajustando los siguientes parámetros:

- El análisis se realizó a las 48 h y 72 h.
- Los controles fueron analizados a las 72 h.
- El modo de aspersión fue reemplazado por gatillo manual, siendo el volumen aplicado de 0,5 ml por feta.
- Al igual que el ensayo anterior se realizaron 3 muestras para cada patógeno (STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*) y la siembra en placa se realizó por duplicado.

Capítulo IV
RESULTADOS

A. Toma de muestra y aislamiento de BAL

A partir de las 32 muestras obtenidas a lo largo de la cadena productiva de cerdo se aislaron 63 colonias individuales correspondientes al criadero, a la sala de recepción de reses (SRR), a la cámara de desposte (desposte), a la sala de elaboración de embutidos (SEE) y a la boca de expendio (expendio) (Tabla 9).

Tabla 9: Origen de los aislamientos obtenidos

Muestra		Origen	Muestra		Origen
1	1.1	Criadero	33	1.2	Criadero
2	2.1	Criadero	34	2.2	Criadero
3	3.1	Criadero	35	3.2	Criadero
4	4.1	Criadero	36	4.2	Criadero
5	5.1	Criadero	37	5.2	Criadero
6	6.1	Criadero	38	6.2	Criadero
7	7.1	SRR	39	7.2	SRR
8	8.1	SRR	40	8.2	SRR
9	9.1	SRR	41	9.2	SRR
10	10.1	SRR	42	10.2	SRR
11	11.1	SRR	43	12.2	Desposte
12	12.1	Desposte	44	13.2	Desposte
13	13.1	Desposte	45	14.2	Desposte
14	14.1	Desposte	46	15.2	Desposte
15	15.1	Desposte	47	16.2	Desposte
16	16.1	Desposte	48	17.2	SEE
17	17.1	SEE	49	19.2	SEE
18	19.1	SEE	50	20.2	SEE
19	20.1	SEE	51	21.2	SEE
20	21.1	SEE	52	22.2	SEE
21	22.1	SEE	53	23.2	SEE
22	23.1	SEE	54	25.2	SEE
23	25.1	SEE	55	26.2	SEE
24	26.1	SEE	56	27.2	SEE
25	27.1	SEE	57	28.2	Expendio
26	28.1	Expendio	58	29.2	Expendio
27	29.1	Expendio	59	30.2	Expendio
28	30.1	Expendio	60	31.2	Expendio
29	31.1	Expendio	61	32.2	Expendio
30	32.1	Expendio	62	33.2	Expendio
31	33.1	Expendio	63	34.2	Expendio
32	34.1	Expendio			

B. Identificación de los aislamientos mediante pruebas bioquímicas y métodos moleculares

B.1. Pruebas bioquímicas

Se seleccionaron colonias cultivadas en agar MRS de 1 a 3 mm de diámetro, color blanco cremoso, forma circular, puntiformes, elevación convexa y margen entero. Luego se realizó el “*screening*” por tinción de Gram, movilidad y reacción de catalasa.

B.1.1. Tinción Gram

Una vez realizada la tinción Gram a las colonias aisladas, 29 (42.85%) fueron examinadas al microscopio óptico con objetivo de inmersión y observadas como Gram positivas (color violeta) y de morfología bacilar o coco bacilar (Figura 28).

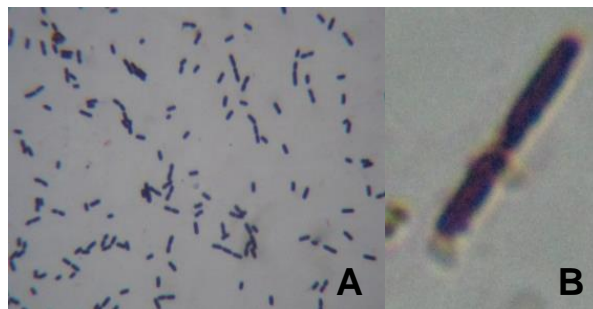


Figura 28: Coloración Gram de una colonia aislada presuntiva de BAL

A: Fotografía de BAL al microscopio óptico. 1000X

B: Imagen aumentada de la fotografía A.

B.1.2. Movilidad

La prueba de movilidad bacteriana mediante observación microscópica en fresco determinó que el 100 % no presentaron movilidad.

B.1.3. Catalasa

Las observaciones de los portaobjetos permitieron determinar que no hubo descomposición del peróxido de hidrógeno con la consecuente liberación de oxígeno (burbujas). Por lo tanto, se determinó que la totalidad de los aislamientos (100%), no presentaron la enzima catalasa, siendo considerados catalasa negativos.

Se realizó un control positivo con *E. coli* (catalasa positiva) para observar la diferencia entre ambas.

B.2. Identificación molecular: PCR

La extracción de ADN obtenida con el kit *Wizard Genomic DNA Purification*® (Promega) se mantuvo dentro de los estándares de buena calidad entre 1,8 y 2,0 con relación 260/280.

Los aislamientos presuntivos de BAL fueron identificados genéticamente por PCR. Respecto al género, 24 de ellos fueron confirmados como *Lactobacillus* spp. (Figura 29).

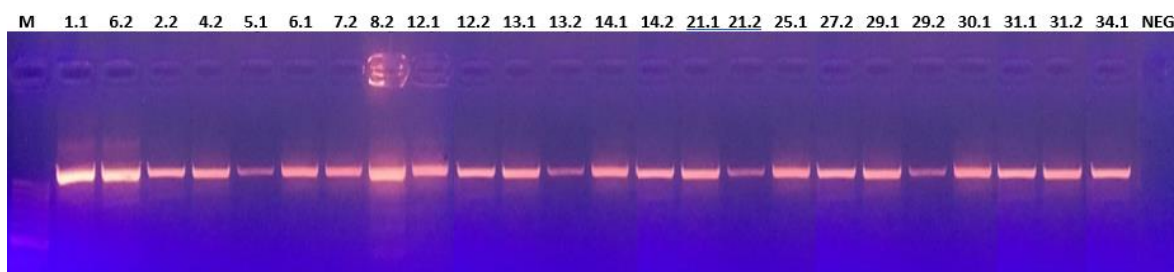


Figura 29: PCR monoplex de género *Lactobacillus* spp.

Posteriormente, se identificaron las especies de BAL mediante PCR monoplex con cepas de referencia. Se obtuvieron entonces, 8 aislamientos de *L. plantarum*, 2 *L. reuteri* y ninguna arrojó banda a la altura de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus* y *L. casei*. Por otra parte, 13 aislamientos mostraron banda con más de una cepa de referencia: 4 fueron positivas para *L. casei* y *L. reuteri* y 9 para *L. plantarum* y *L. reuteri*.

B.3. Cinética de crecimiento

Se seleccionó *L. plantarum* como la BAL representativa (por su mayor detección) para determinar la cinética de crecimiento en UFC/ml en función del tiempo (Figura 30). Mediante la observación de las placas de determinación de quimismo fermentativo fue posible incluir a *L. plantarum* en el grupo de BAL heterofermentadoras.

Partiendo de un cultivo inicial a la hora 0 de 30.000 UFC/ml, se obtuvo que la fase exponencial de crecimiento fue hasta las 12 h de cultivo, momento a partir del cual, la bacteria deja de reproducirse y aumenta el número de células muertas.

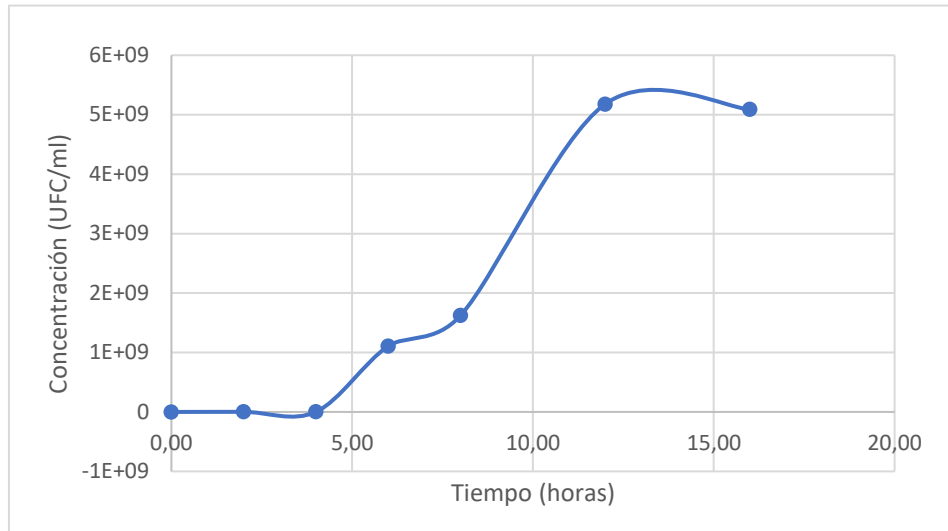


Figura 30: Cinética de crecimiento de *L. plantarum* por recuento de UFC/ml

Mediante el análisis de la D.O., los valores se mantuvieron en aumento hasta llegar a un período estacionario (Figura 31).

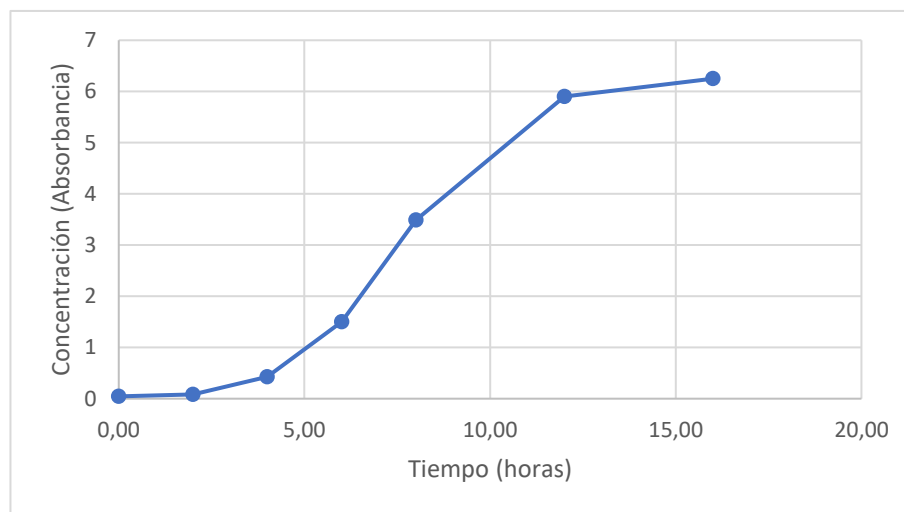


Figura 31: Cinética de crecimiento de *L. plantarum* por medida de D.O.

La relación entre ambas medidas de cinética de crecimiento de *L. plantarum* nos permitió formular una ecuación lineal para calcular el número de bacterias a determinada D.O. (Figura 32).

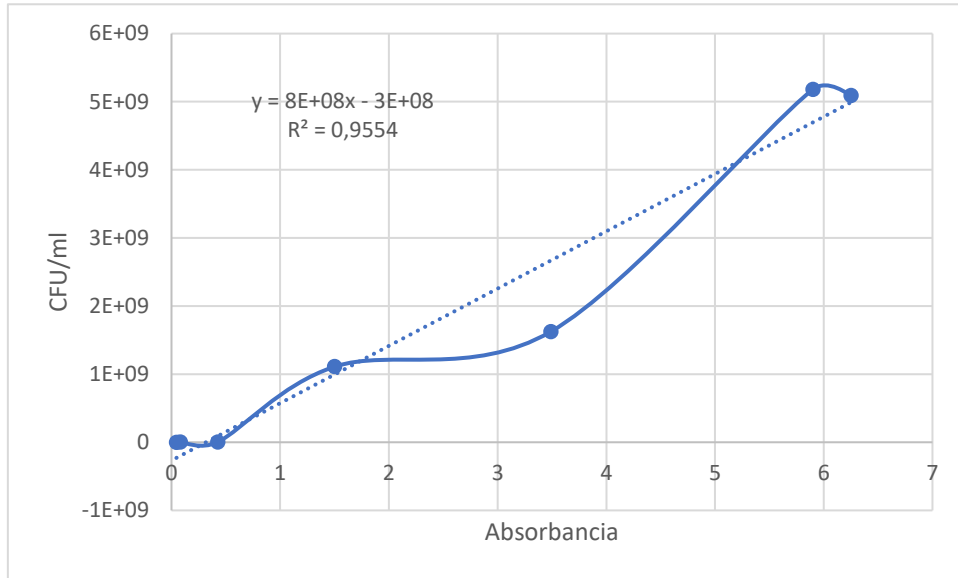


Figura 32: Cinética de crecimiento de *L. plantarum* relacionando UFC/ml y Absorbancia

C. Evaluación de la actividad inhibitoria de BAL

C.1. Selección de BAL y bacterias patógenas

La actividad inhibitoria fue evaluada en los 24 aislamientos de BAL identificados por PCR como *Lactobacillus* spp. Las cepas indicadoras patógenas para las pruebas de la actividad antibacteriana utilizadas fueron STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*.

C.2. Ensayo de inhibición

Los resultados indicaron que 23 aislamientos (95,83%) inhibieron al menos a uno de los patógenos (STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*). De ellos, 5 fueron obtenidos del criadero, 2 de la sala de recepción, 4 de la cámara de desposte, 5 de la sala de elaboración y 7 de la boca de expendio.

La actividad antibacteriana de los *Lactobacillus* spp. frente a STEC O157:H7 fueron 17 aislamientos (70,83%), frente a *S. Tiphymurium* 16 aislamientos (66,66%) y frente a *S. aureus* 12 aislamientos (50%).

Teniendo en cuenta la capacidad inhibitoria de los *Lactobacillus* spp. frente a los tres patógenos juntos, 8 aislamientos (33,33%) presentaron actividad antibacteriana (Figura 33).

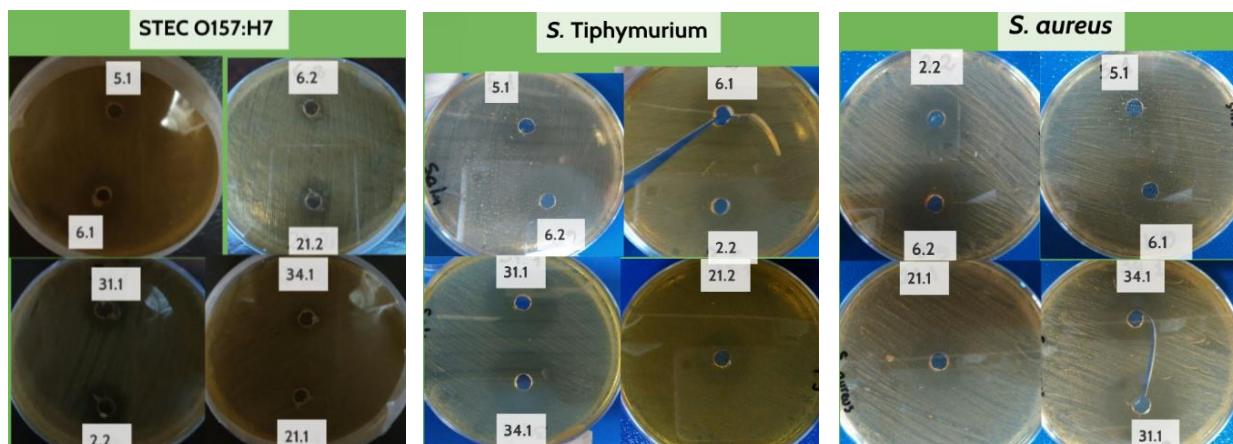


Figura 33: Ensayo de inhibición frente a STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*

C.3. Identificación genética: Secuenciación de Sanger

La extracción de ADN obtenida con el kit *Higher Purity Bacterial Genomic DNA Isolation*® (Canvax) se mantuvo dentro de los estándares de buena calidad entre 1,8 y 2,0 con relación 260/280.

Las secuencias obtenidas de cada aislamiento permitieron identificar a siete *Lactobacillus* spp. como *L. plantarum* y uno fue caracterizado como *Pediococcus acidilactiti* (*P. acidilactiti*) (Tabla 10). En todos los casos, presentaron una homología de 99 a 100%.

Tabla 10: Identificación y distribución de las BAL por pruebas bioquímicas, PCR y Secuenciación de Sanger

(N/a: No aplica)

Muestra	Origen	Bioquímicas (29)	PCR Género (24)	PCR Especie (10)	Secuenciación Especie	
1	1.1	Criadero	+	+	<i>L. casei-reuteri</i>	N/a
2	5.1	Criadero	+	+	<i>L. plant-reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>
3	6.1	Criadero	+	+	<i>L. plant-reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>
4	12.1	Desposte	+	+	<i>L. plant-reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>
5	13.1	Desposte	+	+	<i>L. plantarum</i>	N/a
6	14.1	Desposte	+	+	-	N/a
7	21.1	SEE	+	+	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
8	25.1	SEE	+	+	-	N/a
9	27.1	SEE	+	-	-	N/a
10	29.1	Expendio	+	+	-	N/a
11	30.1	Expendio	+	+	<i>L. plantarum</i>	N/a
12	31.1	Expendio	+	+	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
13	33.1	Expendio	+	-	-	N/a
14	34.1	Expendio	+	+	<i>L. plant-reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>
15	1.2	Criadero	+	-	-	N/a
16	2.2	Criadero	+	+	-	<i>P. acidilactiti</i>
17	4.2	Criadero	+	+	<i>L. reuteri</i>	N/a
18	6.2	Criadero	+	+	<i>L. plant-reuteri</i>	<i>L. plantarum</i>
19	7.2	SRR	+	+	<i>L. casei-plant-reut</i>	N/a
20	8.2	SRR	+	+	<i>L. casei-reuteri</i>	N/a
21	10.2	SRR	+	-	-	N/a
22	12.2	Desposte	+	+	<i>L. plant-reuteri</i>	N/a
23	13.2	Desposte	+	+	<i>L. reuteri</i>	N/a
24	14.2	Desposte	+	+	<i>L. casei-plant-reut</i>	N/a
25	21.2	SEE	+	+	<i>L. plantarum</i>	N/a
26	27.2	SEE	+	+	<i>L. plantarum</i>	N/a
27	29.2	Expendio	+	+	<i>L. plantarum</i>	N/a
28	31.2	Expendio	+	+	<i>L. plantarum</i>	N/a
29	33.2	Expendio	+	-	-	N/a

C.4. Selección de BAL con mayor potencial inhibitorio

Se seleccionó un aislamiento caracterizado por PCR y secuenciación como *L. plantarum* debido a su capacidad inhibitoria ante los tres patógenos probados para determinar su actividad antibacteriana frente a 99 cepas de STEC (Figura 34).

Se observaron halos de inhibición superiores a 10 mm en el 75,75% de las cepas de STEC, 5,05% fueron observadas con halos inferiores a 1 mm y 19,2% fueron negativas.

Debido al potencial inhibitorio que presentó *L. plantarum*, fue seleccionado para los ensayos realizados a continuación.



Figura 34: Halo de inhibición de *L. plantarum* ante STEC

C.5. Producción de la sustancia antibacteriana de *L. plantarum*

Los recuentos de UFC/ml de los pocillos muestreados indicaron que la sustancia inhibitoria está presente a partir del muestreo a la hora 0, siendo 0 UFC/ml el recuento de la totalidad de los pocillos tratados en las distintas horas (Figura 35).

Por otro lado, se observó como resultado que la concentración 1/10 inhibió a *E. coli* O157:H7 mientras que la concentración 1/100 si bien redujo tres logaritmos en el recuento de UFC/ml, no inhibió completamente la bacteria patógena (Tabla 11).

Tabla 11: Reducción de *E. coli* O157:H7 expresado en UFC/ml a lo largo del tiempo por acción de distintas concentraciones del SLC de *L. plantarum*

		Análisis	Control en LB	Control en MRS	SLC 1/10	SLC 1/100	Control en LB
0 h	(-6)	0	4,4x10 ⁸	2,2x10 ⁸	0	4,6x10 ⁸	1,06x10 ⁹
	(-5)	0	1,48x10 ⁸	8,2x10 ⁸	9x10 ⁶	6x10 ⁸	1,06x10 ⁹
4 h	(-6)	0	4,3x10 ⁸	8x10 ⁷			
	(-5)	0	2,62x10 ⁸	4,8x10 ⁷			
6 h	(-6)	0	1,31x10 ⁹	7x10 ⁸			
	(-5)	0	Incontable	Incontable			
8 h	(-6)	0	3,8x10 ⁹	5,6x10 ⁸			
	(-5)	0	Incontable	Incontable			
12 h	(-6)	0	3,9x10 ⁹	6,6x10 ⁸	0	2,2x10 ⁸	1,06x10 ⁹
	(-5)	0	Incontable	Incontable	0	4x10 ⁸	1,06x10 ⁹
24 h	(-6)	0	-	-			
	(-5)	0	5,9x10 ⁸	2x10 ⁷			
30 h	(-6)	0	-	1x10 ⁵			
	(-5)	0	1,7x10 ⁶	-			

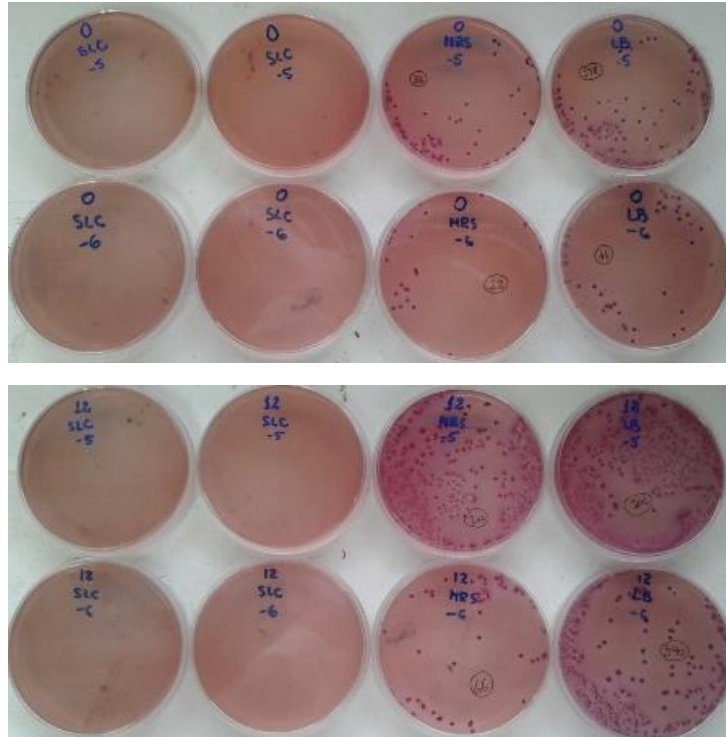


Figura 35: Recuento de STEC en placa a diferentes horas de obtención del SLC de *L. plantarum*

Se estimó entonces la concentración aproximada de SLC capaz de reducir la totalidad de bacterias patógenas (Figura 36).



Figura 36: Inoculación de las distintas concentraciones de SLC de *L. plantarum* a enfrentar con STEC O157:H7

Se obtuvo que el SLC al 1% permitía el crecimiento de la bacteria patógena y a partir del 5% hasta el 100% inhibe completamente a STEC O157:H7. Por lo tanto, la dosis inhibitoria de la sustancia presente en el SLC se encuentra entre el 1 y 5 % del SLC.

C.6. Determinación de la naturaleza química de la sustancia antibacteriana de *L. plantarum*

C.6.1. Naturaleza química de la sustancia antibacteriana

C.6.1.a. Ensayo I

El tratamiento de los SLC nos permitió determinar que, al neutralizar los ácidos con NaOH, las bacterias patógenas fueron inhibidas (Tabla 12) lo que indica que otra sustancia, distinta de ácido, presente en el SLC es la que tiene efecto inhibitorio.

El SLC tratado con catalasa permitió poco desarrollo de las bacterias patógenas, por lo que se puede decir que hay una pequeña producción de peróxido de hidrógeno con efecto bactericida. Y por último el SLC tratado con proteinasa K 0,5 y 1 mg/ml no inhibió el desarrollo bacteriano (Tabla 12). Esto indica que el tratamiento con proteinasa K (1 mg/ml), hidroliza la proteína antibacteriana. Por lo tanto, se podría decir que la sustancia inhibitoria producida por *L. plantarum* es de naturaleza proteica, posiblemente una plantaricina.

Tabla 12: Naturaleza química del SLC de *L. plantarum* con capacidad antibacteriana ante STEC

Tubo	Tratamiento del sobrenadante	Crecimiento (D.O.)	Sustancia antibacteriana
Control	Sólo MRS	0,556	Ninguna
1	SLC	0	Todas
2	Neutralizado	0	H ₂ O ₂ o bacteriocina
3	Neutralizado + Catalasa	0,034	Bacteriocina
4	Neutralizado + Proteinasa K 0,5 mg/ml	0,0825	Bacteriocina
	Neutralizado + Proteinasa K 1 mg/ml	0,144	Bacteriocina

Teniendo en cuenta los resultados, se realizó un ensayo en placas Mac Conkey tomando 100 µl del primer pocillo de cada muestra (Figura 44). Mediante el recuento en placa se obtuvo:

- Crecimiento confluyente con colonias indistinguibles en el Control (medio con MRS)
- Inhibición total de STEC O157:H7 en el SLC
- Crecimiento en el SLC neutralizado.
- Crecimiento con colonias distinguibles en el SLC neutralizado tratado con catalasa.
- Crecimiento confluyente con colonias distinguibles en el SLC neutralizado tratado con proteinasa K 0,5mg/ml.
- Crecimiento confluyente con colonias indistinguibles en el SLC neutralizado tratado con proteinasa K 1mg/ml.

Del mismo modo que en el ensayo de medición de D.O., se pudo determinar que, si bien hubo crecimiento en los SLC tratados (neutralizado, con catalasa y con proteinasa K), el mayor crecimiento de la bacteria patógena se obtuvo al hidrolizar la sustancia de naturaleza proteica.

C.6.1.b. Ensayo II

La actividad antibacteriana se determinó mediante la prueba de difusión en agar LB. Se usó STEC O157: H7 como cepa indicadora patógena. La medición de los diámetros de la zona de inhibición indicaron la naturaleza química de la sustancia antibacteriana (Figura 37). Los espectros de inhibición utilizando SLC, SLC neutralizado, SLC tratado con catalasa y SLC tratado con proteinasa K mostraron la ausencia de halo correspondiente al tratamiento con la proteinasa K. Esto muestra que la naturaleza de la sustancia inhibitoria es una proteína, posiblemente una plantaricina.

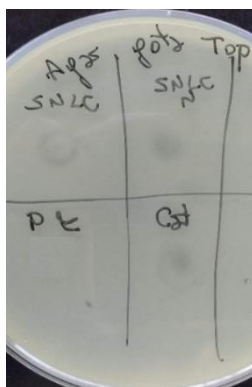


Figura 37: Prueba de difusión de sustancia antibacteriana de SLC de *L. plantarum* frente a STEC O157:H7

C.6.2. Identificación genética de la sustancia antibacteriana

C.6.2.a. Detección genética de plantaricinas

Mediante la utilización de la técnica de PCR fue posible visualizar los seis tipos de plantaricinas diseñadas: PlnE, PlnF, PlnJ, PlnK, PlnL y PlnN (Figura 38). Esto indica que estas bacteriocinas están presentes en el genoma de *L. plantarum*.

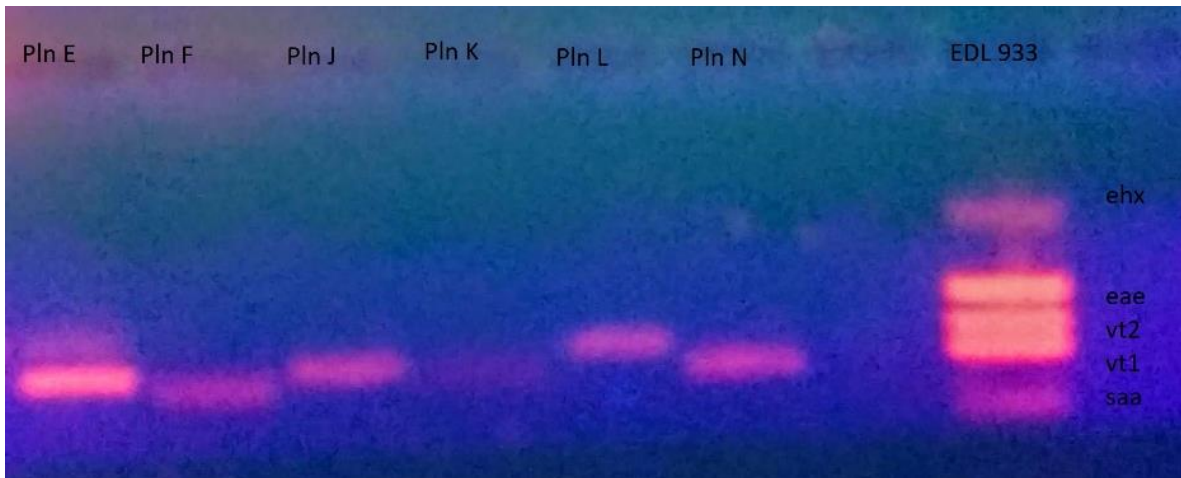


Figura 38: Visualización de PCR en gel de agarosa de distintas plantaricinas

C.6.2.b. Expresión genética de plantaricinas

Mediante la observación del gel se pudo detectar la expresión genómica de las plantaricinas expresadas en los ADN copia: PlnE, PlnF, PlnK, PlnL y PlnN (Figura 39). Como control positivo se utilizó ADN genómico.

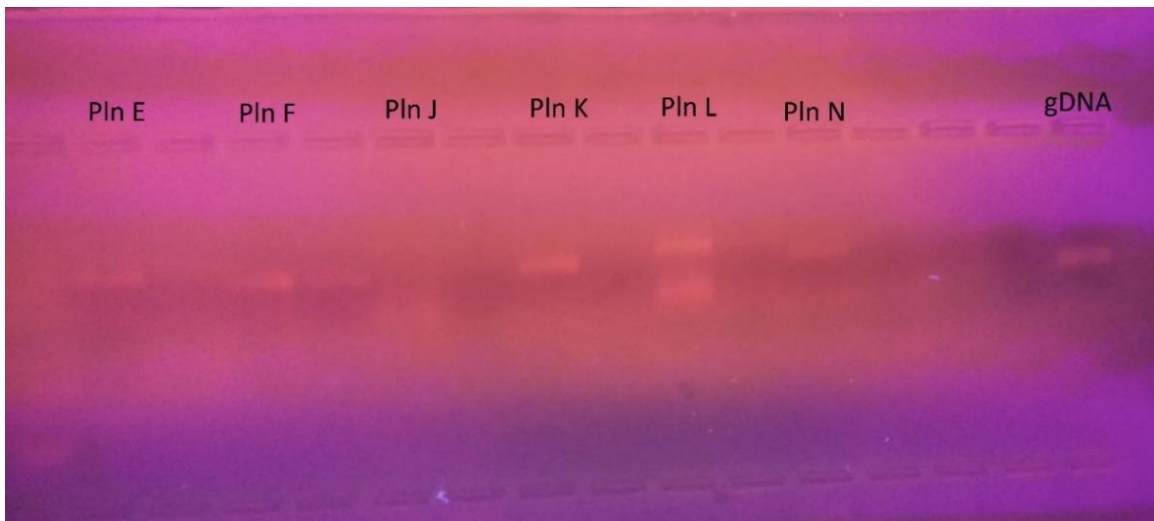


Figura 39: Visualización de expresión genética de plantaricinas

D. Actividad de sustancias antibacterianas concentradas

Se seleccionaron las 8 aislamientos de BAL con mejor potencial inhibitorio (siete *L. plantarum* y una *P. acidilactiti*) para concentrar los metabolitos con capacidad inhibitoria y evaluarlos posteriormente ante STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*.

El volumen de cada cultivo fue concentrado 10 veces aproximadamente (Figura 40). Mediante los ensayos de inhibición se pudo observar que los halos de inhibición ante STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* fueron claramente superiores a los obtenidos anteriormente con cultivos de BAL sin concentrar.

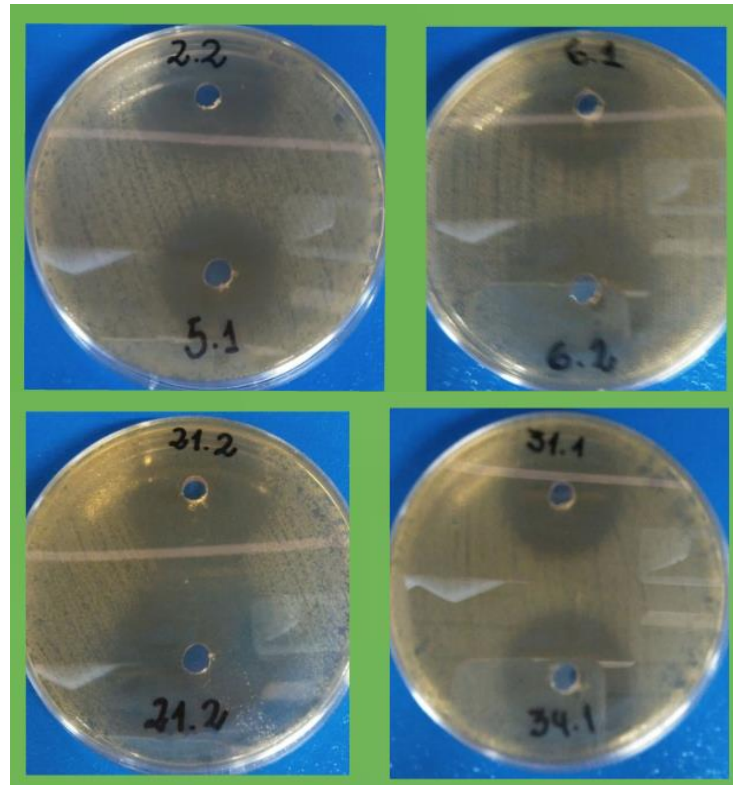


Figura 40: Halos de inhibición de SLC liofilizado de *L. plantarum* ante STEC

E. Interacción de dos BAL frente a bacterias patógenas

Se seleccionaron las 8 aislamientos de BAL con mejor capacidad inhibitoria ante los tres patógenos indicadores de actividad antibacteriana. Siete fueron identificados como *L. plantarum* y uno como *P. acidilactiti*.

Se pudo observar que la interacción entre los 7 *L. plantarum* presentaron sinergismo, es decir que la zona de inhibición de crecimiento del patógeno donde difundieron los dos aislamientos o sus metabolitos fue mayor que la inhibición del crecimiento bacteriano donde actuaron en forma independiente.

Una de las BAL, *P. acidilactiti*, presentó antagonismo con el resto de los aislamientos, ya que se observó la formación de una cuña de crecimiento bacteriano, es decir una reducción del efecto inhibitorio en la zona de difusión de ambas BAL.

F. *Biofilms*: acción de BAL frente a bacterias patógenas

F.1. Formación de *biofilms* de BAL

El estudio de formación de *biofilms* de BAL a temperatura ambiente y de refrigeración se realizó con las BAL que presentaron mayor potencial inhibitorio.

Los resultados fueron los siguientes:

Temperatura ambiente

- Dos de las BAL presentaron una absorbancia de 0,381 y 0,536.
- Las seis restantes BAL oscilaron entre 0,066 y 0,150.

Temperatura de refrigeración

- La totalidad de las BAL presentaron valores de absorbancia entre 0,009 y 0,031.

Para determinar la capacidad de formación de *biofilms* se definieron dos puntos de corte en la medición de la D.O. que permitieron separar a las BAL en: altamente formadoras (D.O.: 0,16-0,6), medianamente formadoras (D.O.: 0,06-0,15) y débilmente formadoras (D.O.: 0-0,05) de *biofilms*.

Por lo tanto, a temperatura ambiente dos de las BAL se consideraron altamente formadoras de *biofilms* y las seis restantes, medianamente formadoras de *biofilms* (0,066-0,150). Mientras que, a temperatura de refrigeración, la capacidad de formación de *biofilms* se ve reducida, siendo consideradas débilmente formadoras de *biofilms*.

F.2. Reducción de *biofilms* de patógenos

Se evaluó la capacidad de *L. plantarum* con óptima actividad antibacteriana de reducir *biofilms* de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*. Los resultados para cada uno de los ensayos fueron los siguientes:

Competencia

Se realizó el estudio en co-cultivo de *L. plantarum* y el patógeno.

Se observó mediante cuantificación de UFC/ml que *L. plantarum* redujo la totalidad de producción de *biofilms* de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* (Tabla 13).

Tabla 13: Inhibición de formación de *biofilms* patógeno por *L. plantarum* en ensayo de competencia

Competencia	Cuantificación de patógeno (UFC/ml)	Cuantificación de <i>L. plantarum</i> (UFC/ml)
STEC	0	115
<i>S. Tiphymurium</i>	0	22
<i>S. aureus</i>	0	4

Exclusión

Se realizó el estudio mediante la adición de cada patógeno al *biofilms* de *L. plantarum* formado.

Se observó mediante cuantificación de UFC/ml que *L. plantarum* redujo la totalidad del *biofilms* de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* (Tabla 14).

Tabla 14: Inhibición de formación de *biofilms* patógeno por *L. plantarum* en ensayo de exclusión

Exclusión	Cuantificación de patógeno (UFC/ml)	Cuantificación de <i>L. plantarum</i> (UFC/ml)
STEC	0	1
<i>S. Tiphymurium</i>	0	2
<i>S. aureus</i>	0	14

Desplazamiento

Se realizó el estudio mediante la adición de *L. plantarum* al *biofilms* de cada patógeno formado.

Se observó mediante cuantificación de UFC/ml que *L. plantarum* redujo la totalidad del *biofilms* de *S. Tiphymurium*, no redujo la totalidad de STEC y en el caso de *S. aureus*, fue mayor la cuantificación de bacterias viables formadoras de *biofilms* del patógeno (Tabla 15).

Tabla 15: Inhibición de formación de *biofilms* patógeno por *L. plantarum* en ensayo de desplazamiento

Desplazamiento	Cuantificación de patógeno (UFC/ml)	Cuantificación de <i>L. plantarum</i> (UFC/ml)
STEC	19	32
<i>S. Tiphymurium</i>	0	90
<i>S. aureus</i>	54	2

G. Aplicación de *L. plantarum* en carne porcina

G.1. Ensayo I

El primer ensayo en la matriz cárnica se realizó en el Laboratorio de Microbiología de INTA Castelar, Buenos Aires.

En los ensayos de inhibición sobre la matriz cárnica la concentración del inóculo inicial, tanto de las BAL como de los patógenos, se midió por espectrofotometría. La absorbancia obtenida fue de 1,35 a 1,4 a 600 nm.

La determinación del efecto inhibitorio en esta matriz se realizó comparando los recuentos de las muestras tratadas con *L. plantarum* y las bacterias patógenas STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* a las 24 h y 48 h con los controles sólo inoculados con el patógeno (Tabla 16).

- Las tres muestras inoculadas con STEC O157:H7 no fueron reducidas a las 24 h ni a las 48 h.
- Una de las muestras de *S. Tiphymurium* (1) fue reducida a las 48 h, mientras que los dos restantes no fueron reducidas.
- Dos de las muestras de *S. aureus* (1 y 3) fueron reducidas a las 24 h, mientras que la restante (2) no fue reducida.

Tabla 16: Cuantificación de patógenos en matriz cárnica tratada con *L. plantarum* obtenida del Ensayo I

*El sombreado corresponde a las muestras que fueron reducidas

Ensayo INTA	Tratadas 24h	Tratadas 48h	Control (48 h)	
STEC O157:H7	1	214	176	94
	2	234	211	103
	3	228	104	92
<i>S. Tiphymurium</i>	1	223	41	75
	2	111	124	49
	3	86	116	35
<i>S. aureus</i>	1	61	246	86
	2	76	72	42
	3	38	240	47

G.2. Ensayo II

El segundo ensayo en la matriz cárnica se realizó en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Tabla 17).

- Dos de las muestras inoculadas con STEC O157:H7 (1 y 3) fueron reducidas a las 48 h y a las 72 h. La muestra restante (2) no fue reducida a las 48 h pero si a las 72 h.
- Las tres muestras de *S. Tiphymurium* fueron reducidas tanto a las 48 h como a las 72 h.
- Las tres muestras de *S. aureus* fueron reducidas tanto a las 48 h como a las 72 h.

Tabla 17: Cuantificación de patógenos en matriz cárnica tratada con *L. plantarum* obtenida del Ensayo II

*El sombreado corresponde a las muestras que fueron reducidas

1er Ensayo Laboratorio	Tratadas 48h	Tratadas 72h	Control (72 h)	
STEC O157:H7	1	168	179	240
	2	214	134	117
	3	225	75	297
<i>S. Tiphymurium</i>	1	126	250	+300
	2	136	230	+300
	3	57	117	279
<i>S. aureus</i>	1	46	27	48
	2	16	31	136
	3	18	25	38

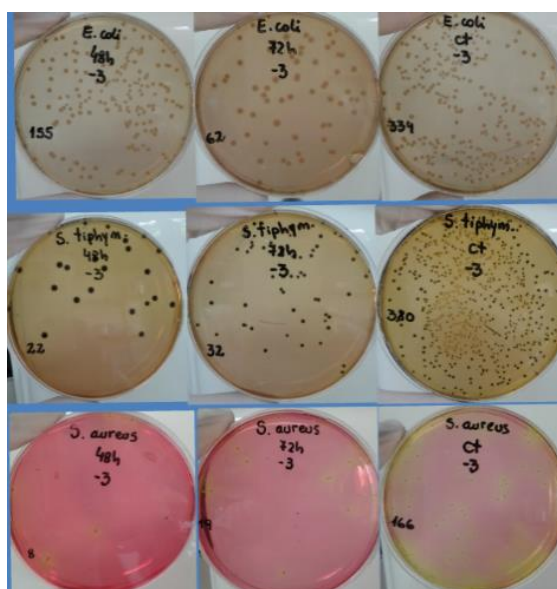


Figura 49: Cuantificación de patógenos en matriz cárnica tratada *L. plantarum*

Capítulo V
DISCUSIÓN

La investigación y el control de los casos y brotes de ETA son tareas multidisciplinarias pertenecientes a la medicina clínica, la epidemiología, la microbiología y la química de los alimentos, la inocuidad y el control de los alimentos, y la comunicación y la gestión de riesgos. Las responsabilidades de la investigación y el análisis de los brotes varían entre países y en función de varios factores, incluidos la naturaleza y el tamaño del brote, su importancia en relación con la salud de la población y sus repercusiones económicas (OMS, 2017). Cuando se sospeche o se confirme que la contaminación de los alimentos ha sido deliberada, normalmente la policía o las fuerzas nacionales de defensa asumirán el liderazgo en la gestión global del incidente. El éxito en la investigación y el control de los brotes de ETA depende de que se intervenga con rapidez y responsabilidad, utilizando procedimientos bien establecidos y validados (Baggini, 2017). Los brotes y casos de ETA registrados representan solo un pequeño porcentaje de la totalidad. La probabilidad de que un brote o caso se reconozca y notifique por las autoridades de salud depende, entre otros factores, de la comunicación de los consumidores, del relato de los médicos y de las actividades de vigilancia sanitaria de las secretarías municipales, departamentales y provinciales de salud (OMS, 2018). Los alimentos involucrados con más frecuencia en las epidemias y casos de ETA son aquellos de origen animal. Los factores de riesgo que a menudo causan las ETA son la contaminación cruzada entre alimentos crudos y cocidos, las materias primas contaminadas, las malas prácticas de higiene personal, el manipulador infectado, la pérdida de la cadena de frío de los alimentos perecederos y la cocción insuficiente de los alimentos (ANMAT, 2018). En este contexto de relevancia de las ETA, se ha desarrollado este trabajo de investigación a modo de búsqueda de una alternativa para controlar el desarrollo de las bacterias patógenas causante de enfermedades a lo largo de la cadena de producción de alimentos, específicamente cárnicos. El principal reservorio de las bacterias causantes de ETA se encuentra en los animales de sangre caliente y en el ambiente y su principal vía de transmisión son los alimentos contaminados (Colello, 2018).

El estudio de las características especiales de cada cadena productiva, en particular sus factores de riesgo potencial frente a los agentes causantes de ETA, resulta esencial para el desarrollo de estrategias de prevención y remediación sustentadas en el conocimiento científico. La utilización de las BAL resulta una alternativa para el control de los patógenos en gran cantidad de ambientes (Frizzo *et al.*, 2013).

Origen de las BAL

Las bacterias pertenecientes al grupo de BAL se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas, humanos y ambiente. En este estudio a partir de 32 muestras obtenidas de todas las etapas de producción porcina, incluyendo materia fecal en criadero, ambiente de frigorífico y boca de expendio (equipamiento, utensilios, mesadas), se aislaron 63 BAL. En varios estudios se han aislado BAL, particularmente *Lactobacillus* spp., del contenido del intestino grueso, mucosa de colon y calostro de origen porcino. Rodríguez-Membibre (1995) utilizó *L. acidophilus* aislado de mucosa de colon de cerdo para determinar los efectos de su administración en la producción animal. Gámez *et al.* (2009) en un estudio similar caracterizaron la actividad antibacteriana de *L. plantarum* del mismo origen y Verso *et al.* (2017) demostraron que las BAL intestinales de cerdo pueden producir sustancias antibacterianas capaces de inhibir el crecimiento de patógenos entéricos oportunistas y podrían tener potencial como aditivos probióticos para la prevención de enfermedades gastrointestinales como alternativa o complemento al uso de antibióticos. Jurado *et al.* (2009) y Zea *et al.* (2015) han aislado y caracterizado cepas del intestino grueso y calostro de cerdas respectivamente para determinar su actividad bactericida frente a *S. Typhimurium*. Dowarah *et al.* (2018) determinaron las propiedades probióticas de BAL aisladas de heces de lechones y concluyeron que *P. acidilactici* presenta características probióticas *in vitro* potenciales como así también capacidades potenciales de mejor digestibilidad de nutrientes y efecto antioxidante, estudio coincidente con Balasingham *et al.* (2017) que obtuvieron resultados similares con *L. plantarum* y *L. acidophilus*. En los animales de sangre caliente, incluido el humano, se han detectado BAL particularmente en la microbiota de la boca, los intestinos y el tracto genital femenino (Gamiño-Arroyo *et al.*, 2005). Por otra parte, los peces también han resultado ser una fuente de BAL, tal como lo demuestra Yamada *et al.* (2018) quien aisló *L. paracasei* de pescado fermentado. Sari (2018) analizó la actividad antibacteriana de BAL aisladas de bekasam contra *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella* spp. El bekasam es un alimento fermentado de Indonesia hecho de pescado que puede contener algunas bacterias beneficiosas, como las BAL, que generalmente tienen propiedades antibacterianas. El aislamiento de BAL se realizó en MRS y el ensayo antagónico se realizó en agar Muller-Hinton. Los resultados obtenidos demuestran que las bacteriocinas de los extractos crudos de las BAL inhibieron más a *S. aureus* que a *E. coli* y *Salmonella* spp. Las aves de corral también

representan una fuente de BAL. Rajoka *et al.* (2018) aislaron y evaluaron el potencial probiótico de BAL del intestino de las aves de corral. El estudio permitió afirmar que estas bacterias presentan notables propiedades funcionales y tecnológicas para su uso potencial en el desarrollo de productos probióticos. Asimismo, de las aves silvestres se han obtenido aislamientos de BAL. Las BAL aisladas a partir de alimentos fermentados se usan ampliamente para el consumo animal, pero las BAL de origen animal presentan una mejor colonización del hospedador y la activación inmune. En el estudio realizado por Jeong (2014) se evaluó el potencial probiótico de BAL aisladas de patos silvestres y se seleccionaron aquellas candidatas a probióticas como suplemento en animales, especialmente para aves de corral. Un estudio similar fue realizado recientemente por Grant *et al.* (2018) utilizando también BAL con actividad probiótica, alternativa a la administración de antibióticos en aves de corral. Los alimentos son también una importante fuente de BAL, especialmente los productos lácteos, las verduras y la carne. Ispirli (2017) han aislado BAL a partir de muestras de koumis y kurut tradicionales y su identificación reveló la presencia de *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* y especies de *Lactobacillus helveticus* y se observaron niveles importantes de actividad antibacteriana y antifúngica de estas cepas. Mirzaei *et al.* (2018) demostraron las propiedades antibacterianas de BAL aisladas de yogurt tradicional y leche ante cepas de *Shigella*. Rathore (2018) caracterizó el perfil probiótico de BAL aisladas de alimentos fermentados y productos lácteos y sugirió que *L. helveticus* aislado de pepino, *L. plantarum* aislado de leche de camello no fermentada y *P. pentosaceos* aislado de manteca mostraron un buen potencial probiótico. Muruzović *et al.* (2018) caracterizaron BAL aisladas de queso serbio de elaboración artesanal, evaluaron su potencial antagonista contra bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y concluyeron que las bacterias seleccionadas poseen potencial para la biopreservación de alimentos. En un estudio realizado por Dallal *et al.* (2017) se identificaron y caracterizaron BAL probióticas aisladas de conservas tradicionales de vegetales y mostraron que las BAL dominantes fueron *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. paracasei* y *Leuconostoc mesenteroides*.

Identificación de las BAL

La identificación en género y especie de las BAL aisladas es de creciente aplicación en la industria alimentaria, pues es uno de los primeros pasos para la caracterización de estas como bacterias probióticas para elaborar alimentos funcionales de gran demanda debido a sus propiedades benéficas tanto en animales como humanos.

Los métodos de identificación de microorganismos en sentido general se pueden hacer de diferentes formas. Específicamente en el caso de las BAL, muchos autores han empleado determinaciones bioquímicas tales como tinción Gram, catalasa, movilidad, crecimiento en medio específico, entre otras (Sánchez Suárez *et al.*, 2017, Avnİ Kırmacı *et al.*, 2016, Castañeda Guillot, 2018). De acuerdo con las características bioquímicas básicas analizadas en este estudio, un 46% de los aislamientos fueron incluidos dentro del grupo de las BAL. Posteriormente, mediante técnicas moleculares fue posible distinguir microorganismos a nivel de especie como en el estudio de Beldarraín *et al.* (2017). En el presente estudio mediante PCR convencional, un 38 % de las BAL fueron identificadas como *Lactobacillus* spp. Thomson (2018) caracterizó BAL mediante métodos moleculares clásicos y basados en PCR para identificar a nivel de especie. En mayor proporción aisló *P. acidilactici* y *Lactococcus lactis subsp lactis* y en menor medida caracterizó *L. murinus*, *L. casei* y *L. plantarum*. En el presente trabajo, también se utilizó PCR para identificar especies, siendo ocho aislamientos caracterizados como *L. plantarum* y dos como *L. reuteri*. Esta identificación fenotípica y molecular de los aislamientos en este trabajo de Tesis, permitieron hacer una selección presuntiva de aquellos consideradas potencialmente probióticos. Posteriormente al utilizar la metodología de Secuenciación de Sanger en ocho de las BAL seleccionadas por su alto potencial inhibitorio ante los patógenos STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*, siete fueron confirmadas como *L. plantarum* y una se identificó como *P. acidilactiti*. Vasiee *et al.* (2018) identificaron y analizaron la filogenia de las BAL aisladas de Tarkhineh, un producto de cereal fermentado iraní, mediante el Gen rRNA 16s con *primers* universales y la diferenciación usando rep-PCR. Los resultados de la secuencia mostraron que la mayoría de los aislamientos pertenecían al género *Lactobacillus* spp. y se dispersaron en cinco especies: *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. pentosus*, *L. brevis* y *L. diolivorans*. Por lo tanto, las pruebas bioquímicas básicas realizadas en este estudio nos permitieron realizar una primera aproximación al grupo taxonómico. Es importante aclarar,

que la caracterización fenotípica podría ser más específica si se utilizaran criterios bioquímicos basados en características macro y micro morfológicas, fisiológicas y bioquímicas completas. Pero teniendo la posibilidad de utilizar técnicas moleculares, se logró una identificación bacteriana a nivel especie confiable, precisa y en menor tiempo.

Capacidad antibacteriana de las BAL: producción de bacteriocinas

En algunos países desde hace un tiempo el suplemento de antibióticos en la alimentación animal ha sido completamente prohibido y como consecuencia, la necesidad de un agente probiótico con una capacidad superior de promover la actividad inmune ha estado creciendo rápidamente (Guevara, 2011). Nuestros resultados concuerdan con numerosos estudios respecto de la capacidad inhibitoria del género *Lactobacillus* spp. ante bacterias patógenas tales como STEC, *Salmonella* y *S. aureus*. El presente estudio permite afirmar que la mayoría de las BAL (95,83%) presentan efecto antagónico al menos con un patógeno y ocho de ellas (33,33%) inhiben a los tres patógenos utilizados, característica relevante para ser aplicadas en cualquier punto de la cadena productiva ya que fueron aisladas del criadero, de la sala de elaboración de embutidos y de la boca de expendio. Se pudo comprobar que el aislamiento seleccionado con mayor potencial inhibitorio presentó gran efecto antagónico ante STEC, dato de gran relevancia para su aplicación como potencial biopreservador de alimentos, en especial cárnicos. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros investigadores tales como Työppönen *et al.* (2003), Kociubinski *et al.* (1996), Carrasco *et al.* (2002), Vallejo *et al.* (2009) y con lo informado por Vinderola (2003) y por Lücke (2000), quienes proponen el uso de cepas de BAL productoras de sustancias antibacterianas para prevenir la contaminación de diferentes matrices. Vallejo *et al.* (2009) señala que las BAL tienen la capacidad de inhibir bacterias como STEC, siendo de suma importancia ya que tanto en Argentina como a nivel mundial la producción y la salubridad se ven afectadas por este patógeno y han causado la muerte de gran cantidad de individuos. Del mismo modo, Gámez *et al.* (2009) pudieron observar inhibición frente a *E. coli*, *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, a través de una investigación orientada a la caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos. González *et al.* (1993) estudiando el poder inhibitorio de diferentes lactobacilos frente a bacterias enteropatógenas, encontraron que *L.*

acidophilus y *L. casei* tenían un menor poder inhibitorio frente a *Salmonella* que a *E. coli*. Pérez *et al.* (2015) también demostraron la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus* spp. aislados del líquido ruminal bovino ante *S. aureus* y STEC, pero no así en *Salmonella*. Además, se ha determinado que *L. casei* presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 por medio de una combinación de sustancias de naturaleza peptídica junto a una acción parcial del peróxido de hidrógeno y de la acidez del medio (Roldán *et al.*, 2011).

En el desarrollo de los ensayos de inhibición se obtuvieron halos de inhibición superiores a dos mm, de forma que la prueba fue considerada positiva. En tanto, al repetir los ensayos mediante la utilización del SLC, no se observó inhibición. Este evento coincide con lo estudiado por del Campo *et al.* (2008), quien demostró que es necesaria la presencia de las BAL en crecimiento para inhibir a los patógenos ya que al probar el SLC de BAL, el efecto inhibitorio no se manifestó. Ante esta situación, se llevó a cabo una curva de crecimiento para determinar en qué momento del desarrollo microbiano, la bacteria ejerce el efecto inhibitorio frente a los patógenos seleccionados. De esta manera, fue posible establecer un tiempo de crecimiento óptimo para aplicar *L. plantarum* como bacteria biopreservadora. Fue posible determinar que la producción de la sustancia inhibitoria se genera en la primera etapa de desarrollo bacteriano. Por lo tanto, se podría afirmar que en la etapa logarítmica o exponencial ejerce el efecto antibacteriano. La capacidad antibacteriana de los SLC fue estimada realizando ensayos de inhibición con diluciones a distintos porcentajes, siendo a partir del 5% hasta el 100% capaz de inhibir la totalidad de las bacterias patógenas. En otro estudio se expresa la concentración de la sustancia antibacteriana mediante Unidades de Actividad por mililitro (UA/mL), la cual está definida como el recíproco de la máxima dilución (base 2) a la cual se obtiene un halo de inhibición igual o superior a 2 mm (Vanegas *et al.*, 2017). En nuestro estudio, no tuvimos buenos resultados con esta técnica por lo que se analizó la actividad por contacto directo entre diluciones del SLC y el cultivo patógeno. Una vez definida la capacidad inhibitoria y la concentración del SLC capaz de ejercer efecto inhibitorio, se estudió la naturaleza química de la sustancia antibacteriana. Para ello, se realizó una adaptación de las técnicas de difusión en agar con los SLC tratados con hidróxido de sodio, catalasa y proteinasa K. Se determinó que la sustancia que mayormente presentaba actividad antibacteriana era de naturaleza proteica, posiblemente una bacteriocina,

denominada para la especie *L. plantarum* como plantaricina pertenecientes al grupo IIb (Cheng *et al.*, 2014, Doulgeraki *et al.*, 2013). Para confirmar la producción de la bacteriocina, en una de nuestras BAL (*L. plantarum*), se realizó un estudio de detección en el genoma bacteriano y a modo confirmatorio de expresión genética de las mismas plantaricinas. Como resultado se obtuvo que las 6 plantaricinas buscadas estaban presentes en el genoma y 3 de ellas se expresaban. De acuerdo con los estudios de Atrih *et al.* (2001) y Soliman *et al.* (2011), la actividad de las plantaricinas depende de la acción sinérgica de dos péptidos de plantaricina diferentes que actúan en cantidades iguales, tales como plantaricina E con plantaricina F y plantaricina J con Plantaricina K, lo que conduce a un incremento de su acción. Este concepto coincide con lo analizado por Anderssen *et al.* (1998) que afirma que las plantaricinas tienen actividad antibacteriana cuando interactúan como un sistema de 2 péptidos. En nuestro estudio, fue posible detectar la expresión genómica de las plantaricinas E y F y su acción inhibitoria ante las bacterias patógenas. La síntesis de la plantaricina es sumamente compleja, está regulada por la acción de 5 operones con 21 genes diferentes. Los péptidos activos para la formación de poros en la membrana citoplasmática de las células blanco son PlnE y PlnF que conforman la plantaricina E/F y los péptidos PlnJ y PlnK constituyen la plantaricina J/K. Se ha encontrado que esos 4 péptidos catiónicos poseen de 25 a 34 aminoácidos y tienen actividad bactericida de manera independiente, la cual se potencia cuando se interactúan en pares formando los complejos de poración E/F y J/K. Los poros formados presentan diferente selectividad iónica, ya que la plantaricina E/F permite el paso de cationes monovalentes en contraste con la plantaricina J/K que es selectiva para compuestos aniónicos (González-Martínez *et al.*, 2003).

Concentración de las sustancias antibacterianas

La aplicación de un proceso de liofilización permite concentrar cultivos de *Lactobacillus* spp. y al mismo tiempo su efecto inhibitor representado por un halo de inhibición de mayor diámetro. Esto indica que su aplicación en la industria podría llevarse a cabo mediante concentrados para obtener un control más efectivo de patógenos implicados en ETA.

Sinergismo entre BAL

De acuerdo con lo establecido en ciertas investigaciones, se estima que *Lactobacillus* spp. aumenta su capacidad inhibitoria cuando interactúa con otra BAL del mismo género. Ruíz *et al.* (2012), han demostrado que la totalidad de *Lactobacillus* spp. evaluados en su estudio presentaron efecto sinérgico, dato similar al obtenido en este trabajo. Dias *et al.* (2015) realizaron en su estudio la prueba de actividad antibacteriana de aislados de BAL ante *E. coli*, *S. Typhi* y *L. monocytogenes* y detectaron interacción entre *Lactobacillus* spp. contra los patógenos probados, siendo *L. monocytogenes* el más sensible. Otro estudio realizado por Sabini *et al.* 2003, demostró que el 40 % de las BAL analizadas presentaron sinergismo y casi el 60% indiferencia. En este trabajo de Tesis se determinó que existe una relación positiva, sinérgica, entre la mayoría de los *Lactobacillus* spp. analizados y antagonica frente a STEC, *Salmonella* spp. y *S. aureus*. Particularmente, los siete aislamientos identificados como *L. plantarum* presentaron acción sinérgica al enfrentarse a las bacterias patógenas. Por lo contrario, *P. acidilactici* presentó efecto antagonico con los siete *L. plantarum*. Esto afirma que los *Lactobacillus* spp. no presentan efecto antagonico entre sí, pero si frente a bacterias pertenecientes a otros géneros y sobre todo ante patógenas. Un estudio similar, evaluó la interacción de tres BAL: *P. acidilactici*, *L. amylovorus* y *L. animalis* aisladas de carne lista para el consumo, para determinar la actividad bacteriostática hacia *L. monocytogenes* unidas a acero inoxidable. Se obtuvo como resultado que la interacción produjo efecto antilisterial (Ndahetuye *et al.*, 2012). Estos antecedentes, sugieren que la aplicación de *L. plantarum* en fórmulas combinadas en la industria alimentaria como potenciales agentes biopreservadores, presentaría una alternativa interesante para mejorar la calidad microbiológica de los alimentos limitando el número de bacterias patógenas en la cadena productiva. De esta manera, los alimentos llegarían de forma segura a los consumidores, promoviendo un beneficio para la salud pública.

Biofilms: acción de BAL ante patógenos

A lo largo del tiempo se ha demostrado que *Lactobacillus* spp. presenta acción antibacteriana natural sobre *biofilms* de ciertas bacterias adheridas a distintas superficies (Rivas, 2004). El uso de “*biofilms* probióticos” puede ser un enfoque alternativo para reducir

la formación de *biofilms* patógenos en las industrias alimentarias. Woo (2013) demostró la actividad inhibitoria de diferentes *Lactobacillus* spp. sobre la formación de *biofilms* a través de mecanismos de competición, exclusión y desplazamiento. Collado *et al.* (2007) han evaluado probióticos comerciales derivados de leche fermentada y fuentes relacionadas, para inhibir, competir y desplazar la adhesión de patógenos potenciales. Sus resultados reflejaron que es necesario evaluar cada BAL en particular para determinar si será seleccionada para inhibir o desplazar un patógeno específico. En un estudio realizado por Gómez *et al.* (2016) se informó que las BAL utilizadas presentaban características potenciales como alternativas para el control de la formación de *biofilms* por bacterias patógenas en la industria alimentaria, sin conferir un riesgo a los consumidores. Rivas (2004) mostró efecto inhibitor de una combinación de dos bacteriocinas lácticas sobre *biofilms* de *L. monocytogenes* adheridas a placas de acero inoxidable. Jalilsood *et al.* (2015) y Ndahetuye *et al.* (2012) evaluaron la capacidad de un aislado de *Lactobacillus* spp. para formar un *biofilms* fuerte, que proporcionaría el efecto inhibitor contra varias bacterias patógenas. Jones (2009) establece que *L. reuteri* puede promover la colonización y la formación de *biofilms* de lactobacilos comensales y la reuterina, bacteriocina producida por esta bacteria, podría prevenir oportunistas patógenos. En otro estudio, la determinación de la actividad de formación de *biofilms* se llevó a cabo mediante diluciones en serie de *biofilms* formados *in vitro* en dos materiales: cubierta de vidrio y placa de poliestireno. La actividad se analizó ante STEC, *S. aureus*, *Candida albicans* y *Serratia marcescens* y la mayor actividad antagónica se mostró contra *S. aureus* y STEC (Zinigul *et al.*, 2016). Kumar *et al.* (2017) ha destacado que los *biofilms* protectores de BAL también podrían ser una mejor alternativa para controlar la formación de *biofilms* por patógenos tales como *S. aureus* meticilino-resistente. Hassan (2015) ha demostrado que el sobrenadante producido por BAL aislado de miel tiene actividad antiadherente contra especies de *Candida*. Esto indica que el sobrenadante contiene compuestos que pueden usarse como antiadherente en dispositivos médicos y para prevenir infecciones fúngicas. En el presente estudio, se demuestra que la *L. plantarum*, disminuye en gran medida la colonización y formación de *biofilms* de bacterias patógenas implicadas en ETA. Es importante tener en cuenta que los *Lactobacillus* spp. cultivados a temperatura ambiente son altamente formadores de *biofilms*, mientras que aquellos mantenidas a temperatura de refrigeración se consideran débilmente formadores de *biofilms*. El desarrollo

a bajas temperaturas reduce el metabolismo y por lo tanto la formación de biopolímeros ya que todas las reacciones biológicas fundamentales dependen de la temperatura. Este dato resulta fundamental para evaluar como herramienta en el control de formación de *biofilms* patógeno en la industria frigorífica cárnica.

Aplicación de BAL en productos cárnicos

La globalización del comercio y el estilo de vida aseguran que los factores responsables de la aparición de enfermedades estén más presentes que nunca. A pesar de los avances en biotecnología, los alimentos a base de carne todavía están en estudio debido a la presencia de patógenos, lo que provoca una pérdida de confianza del consumidor y, en consecuencia, una caída en la demanda (Silva *et al.*, 2013). La aplicación de BAL en los alimentos tiene gran relevancia en el ámbito de los alimentos funcionales y la industria alimentaria está utilizando los cultivos probióticos para todo tipo de alimentos inclusive los cárnicos. En este contexto, las BAL como organismos GRAS ofrecen una alternativa para desarrollar alimentos libres de patógenos, con un procesamiento mínimo y menos aditivos, manteniendo al mismo tiempo las características sensoriales de los alimentos (Castellano *et al.*, 2017). Se sabe que la carne y derivados cárnicos constituyen un sustrato excelente para el aislamiento de *Lactobacillus* spp. productores de bacteriocinas, según los resultados obtenidos por Schillinger (1989) en Alemania y Sobrino *et al.* (1991) en España. Así estas bacteriocinas de origen cárnico podrían utilizarse como factores de seguridad higiénica en las carnes frescas refrigeradas y en otros derivados cárnicos. Goepfert (1970) observaron que disminuía la presencia de *Salmonella* durante la maduración de los embutidos cárnicos adicionados de cultivos iniciadores de *Lactobacillus* spp. Daly *et al.* (1972) observaron que los cultivos iniciadores comerciales no inhibían completamente el desarrollo de *S. aureus*, pero sí lo reducían considerablemente, de tal manera que se eliminaba la síntesis de enterotoxinas. Un reciente estudio realizado por Giello *et al.* (2018), también ha analizado el impacto positivo de *Lactobacillus* spp., específicamente *L. curvatus* sobre la composición de la microbiota y el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en salchichas fermentadas. Generalmente, en los alimentos fermentados cárnicos se utiliza nitrito como aditivo antimicrobiano particularmente ante el crecimiento de *Clostridium* spp. Di Gioia *et al.* (2016) mostraron

actividad anti-clostridios *in vitro* de *Lactobacillus* spp. en carne de cerdo molida. Esto señala que los cultivos bioprotectores pueden ser una alternativa factible para la reducción del contenido de nitritos en productos cárnicos fermentados. La mayoría de los brotes de ETA son producidos por la presencia de STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus* y se asocian con el consumo de productos cárnicos. La naturaleza proteica, la actividad de agua, el contenido de sal y las temperaturas de refrigeración contribuyen a la selección de estos patógenos. Desde un punto de vista protector, las BAL pueden mejorar la seguridad, prolongar la vida útil y preservar la calidad microbiana y/o sensorial de estos productos. La adición de BAL como cultivo bioprotector no tiene efectos secundarios en las características sensoriales debido al bajo contenido de carbohidratos y la fuerte capacidad de amortiguación de la carne. El antagonismo microbiano de BAL frente a microorganismos indeseables será atribuido a productos metabólicos como ácidos orgánicos o péptidos antimicrobianos; a cambios en el entorno fisicoquímico como el pH o producción de CO₂; o bien, una combinación de estos factores. Tanto la utilización de bacteriocinas como de cultivos protectores presentan ventajas y desventajas respecto a sus mecanismos de biopreservación. Las bacteriocinas, al no ser cultivos vivos, pueden adicionarse a los alimentos sin necesidad de realizar una modificación significativa en los métodos de elaboración. Y, además, se manipulan y almacenan fácilmente. La principal desventaja es que de igual modo que cualquier conservante químico, deben utilizarse en la concentración inhibitoria mínima (CIM) efectiva independientemente de las condiciones de almacenamiento futuras de un producto. Además, solo las bacteriocinas consideradas como GRAS pueden ser aplicadas a los productos alimenticios. De esta forma, su uso está restringido a pocos aditivos comercializados en todo el mundo. Por otro lado, la aplicación de cultivos protectores vivos no requiere de equipamientos especiales. La forma que generalmente se utiliza es por medio de un proceso de liofilización. Este mecanismo no afecta el desarrollo bacteriano y la producción de sus metabolitos (Rodgers, 2003). Cuando los cultivos protectores se utilizan para la conservación, el inóculo correcto y su viabilidad son parámetros que deben considerarse en la producción y deben estar monitoreados por un buen sistema de HACCP, siendo considerados como puntos críticos de control. Dos son las limitaciones de la aplicación de los cultivos vivos. En primer lugar, la no supervivencia en los alimentos que serán cocinados. Y la segunda se vincula al posible deterioro del producto durante su almacenamiento en

refrigeración. Sin duda los alimentos cárnicos con cultivos protectores tendrán diferencia con aquéllos sin adición de bacterias. Sin embargo, esta diferencia será un sabor amargo prácticamente insignificante. Para los consumidores, esta desviación sensorial puede ser un inconveniente irrelevante siendo de mayor importancia la seguridad microbiológica y sin conservantes químicos sumado a la extensión de la vida útil que el alimento ofrece (Kröckel, 2013). En este estudio se demostró el potencial inhibitorio de *L. plantarum* en la matriz cárnica ante los patógenos involucrados en ETA: STEC, *S. Tiphymurium* y *S. aureus*. Nuestros resultados indicaron que a las 48 h y a las 72 h el contenido de patógenos en cortes de carne almacenados a temperatura de refrigeración es reducido notablemente. Esto indica que *L. plantarum* podría ser potencialmente utilizado en cortes de carne fresca como cultivo bioprotector obteniéndose productos cárnicos seguros no sólo de origen porcino, sino también de otras especies tales como bovina y avícola que muchas veces son comercializadas en los mismos establecimientos. Está claro que la seguridad microbiológica de la carne requiere de alternativas para controlar el crecimiento de bacterias patógenas antes, durante y después de su procesamiento. De todos modos, se sabe que la biopreservación no proporciona una acción totalmente bactericida para los microorganismos deteriorantes y principalmente patógenos, se usa como un factor de estrés y de reducción de la carga microbiana indeseable (Sauceda, 2011), concepto que es demostrado en el presente estudio al disminuir los recuentos de las bacterias patógenas seleccionadas. Las preferencias alimentarias están evolucionando y existe una tendencia en los consumidores hacia alimentos libres de conservantes químicos, mientras que otros sólo aceptan los productos siempre que sean seguros y accesibles (Coral *et al.*, 2016). Por eso, la potencial aplicación de *L. plantarum* como cultivo bioprotector en cortes de carne fresca como aquí se plantean, puede resultar beneficioso para la salud de los consumidores especialmente cuando el procesamiento con alta tecnología no está disponible y la gestión de la cadena de frío y la manipulación y procesamiento de los alimentos son irregulares.

Capítulo VI
CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis Doctoral:

- en todas las etapas productivas de carne de cerdo, se aislaron e identificaron genéticamente BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* spp. y *Pediococcus* spp., tales como *L. plantarum* y *P. acidilactiti*;
- se determinó la capacidad antibacteriana del 95,83% de las BAL en al menos uno de los patógenos estudiados;
- se obtuvieron ocho BAL con alto potencial inhibitorio demostrado en la actividad antibacteriana frente a STEC, *S. Typhimurium* y *S. aureus*;
- se confirmó la producción y expresión de bacteriocinas en la etapa de crecimiento logarítmico de *L. plantarum*;
- se obtuvo mayor carácter inhibitorio al concentrar los metabolitos producidos por las BAL;
- se determinó efecto sinérgico entre BAL pertenecientes al mismo género;
- se confirmó la capacidad de *L. plantarum* de reducir *biofilms* de patógenos
- y se redujo la presencia de bacterias patógenas en una matriz cárnica de cerdo mediante la aplicación de *L. plantarum*.

Por lo tanto, se puede concluir que *L. plantarum* de origen porcino podría ser utilizado en la industria alimentaria, principalmente cárnica, como potencial biopreservador para el control de bacterias implicadas en enfermedades de transmisión alimentaria, permitiendo la obtención de alimentos seguros.

Capítulo VII
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- Agudo Toscano, J. (2016). *Pioneros de la Microbiología: Louis Pasteur*. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.
- Alvarado Rivas, C. C. & Díaz Rivero, C. G. (2009). Estudio preliminar del potencial probiótico lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 51, 8-14.
- Álvarez Calatayud, G. & Azpiroz, F. (2015). Empleo de probióticos y prebióticos en atención primaria. *Nutrición Hospitalaria*, 31.
- Ammor, M. S. M., Baltasar (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat science*, 76, 138-146.
- Amro, A., Heba, A., Zong-Tao, Z., Jia, F.-F., Rokayya, S., Abdel Rahman, A.-T., Xiang-Chen, M., Al-Tawaha, R. & Meng, C. (2018). Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Advances in Environmental Biology*, 12, 16-27.
- Anderssen, E. L., Diep, D. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. & Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2269-2272.
- Andres, V. M. & Davies, R. H. (2015). Biosecurity Measures to Control *Salmonella* and Other Infectious Agents in Pig Farms: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 317-335.
- ANMAT. (2018). Enfermedades transmitidas por alimentos. *Departamento de Vigilancia Alimentaria* [Online].
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C. & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2, 1751-1773.
- Arias, A. M., Núria (2012). Efecto de los probióticos en el control de la obesidad en humanos: hipótesis no demostradas. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 16, 100-107.
- Ashbolt, N. J. (2004). Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, 198, 229-238.
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A., Lebrihi, A. & Lefebvre, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 93-104.
- Avnı Kırmacı, H., Özer, B. H., Akçelik, M. & Akçelık, N. (2016). Identification and characterisation of lactic acid bacteria isolated from traditional Urfa cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 301-307.
- Azadnia, P., Zamani, M., Ghasemi, S. A., Babaki, A. K., Jashni, M. K. & Taarof, N. (2011). Isolation and identification of thermophilic *Lactobacilli* from traditional yoghurts of tribes of Kazerun. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 774-776.
- Baggini, S. P. (2017). *Epidemiología de las enfermedades transmitidas por los alimentos - Eta(s)* [Online]. Argentina: Engormix. [Accessed].
- Balasingham, K., Valli, C., Radhakrishnan, L. & Balasuramanyam, D. (2017). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from swine intestine. *Veterinary world*, 10, 825.

- Barros, R. R., Maria Da Glória, S. C., Peralta, J. M., Facklam, R. R. & Teixeira, L. M. (2001). Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pediococcus* Strains Isolated from Human Clinical Sources. *Journal of clinical microbiology*, 39, 1241-1246.
- Becker, K., Skov, R. L. & von Eiff, C. (2015). Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci. *Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition*. American Society of Microbiology.
- Bedón León, L. J. Q. L., María Eugenia. (2018). *Aislamiento, producción y comercialización de un consorcio de bacterias ácido-lácticas para fermentación y conservación de forrajes*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Maestría en Agricultura y Agro negocios Sostenibles.
- Beldarraín, T., González, A. & Kala, D. (2017). Métodos de identificación de cepas productoras de ácido láctico aisladas a partir de matrices alimentarias. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 21.
- Beristain-Bauza, S., Palou, E. & López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 6, 64-78.
- Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E. & Barrios, P. R. (2011). Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *The Canadian veterinary journal*, 52, 1095.
- Bonardi, S., Bassi, L., Brindani, F., D'Incau, M., Barco, L., Carra, E. & Pongolini, S. (2013). Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy. *International journal of food microbiology*, 163, 248-257.
- Bouvet, J., Montet, M., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Atrache, V. & Vernozy-Rozand, C. (2002). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157: H7 in French pork. *Journal of applied microbiology*, 93, 7-14.
- Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D. K., Felis, G. E., Torriani, S. & Dellaglio, F. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55, 1629-1634.
- Bringel, F., Quénee, P. & Tailliez, P. (2001). Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. *Systematic and applied microbiology*, 24, 561-571.
- Brunori, J. C. J., EIM (2013). Producción de cerdos en Argentina: situación, oportunidades, desafíos. *EEA INTA Marcos Juárez* 12.
- Bylund, G. (2003). *Dairy processing handbook*, Tetra Pak Processing Systems AB, Cornell University.
- Calderini, M., Sanabria, G., Taboada, A., Samaniego, S., Irala, J. & Benítez Estigarribia, G. (2015). Nasal colonization of *Staphylococcus aureus* and its relationship with systemic involvement in adult patients admitted to the Institute of Tropical Medicine. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 10, 13-16.
- Calderón, O., Padilla, C., Chaves, C., Villalobos, L. & Laura Arias, M. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 57, 51-56.

- Camacho Sánchez, T. G. (2018). *Secuenciación de la región 16S de cepas aisladas de BAL y determinación de su capacidad bactericida*. Universidad del Azuay.
- Carr, F. J., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, 28, 281-370.
- Carrasco, M., Scarinci, H. & Simonetta, A. (2002). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 15.
- Casado, J. M. R. (2017). Centenario de Elie Metchnikoff (1845-1916). *Educación Médica*, 18, 136-143.
- Casas, A. S., Bebert, Y. R., Romeu, R. Y. M. & Sierra, I. E. (2011). Resistencia antimicrobiana en bacterias potencialmente patógenas aisladas en nasofaringes de niños de círculos infantiles. *Archivo Médico de Camagüey*, 15, 513-524.
- Castañeda Guillot, C. (2018). Probióticos, puesta al día: an update. *Revista Cubana de Pediatría*, 90, 286-298.
- Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C. & Vignolo, G. M. (2017). Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: A focus on meat ecosystems and industrial environments. *Microorganisms*, 5, 38.
- Castro, L. A. & De Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37.
- Cheng, H.-L., Hu, C.-Y., Lin, S.-H., Wang, J.-Y., Liu, J.-R. & Chen, Y.-C. (2014). Characterization of two truncated forms of xylanase recombinantly expressed by *Lactobacillus reuteri* with an introduced rumen fungal xylanase gene. *Enzyme and microbial technology*, 64, 6-10.
- Chmielewski, R. & Frank, J. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2, 22-32.
- Chole, R. A. & Faddis, B. T. (2003). Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 129, 634-636.
- Cleveland, J. M., Thomas J; Nes, Ingolf F; Chikindas, Michael L (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71, 1-20.
- Coburn, B., Grassl, G. A. & Finlay, B. (2007). Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunology and cell biology*, 85, 112-118.
- Colello, R. (2018). *Detección y caracterización molecular de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos en la cadena productiva porcina*. UNCPBA.
- Colello, R., Cáceres, M. E., Ruiz, M. J., Sanz, M., Etcheverría, A. I. & Padola, N. L. (2016). From farm to table: follow-up of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* throughout the pork production chain in Argentina. *Frontiers in microbiology*, 7, 93.
- Colello, R., Ruiz, M. J., Padín, V. M., Rogé, A. D., Leotta, G., Padola, N. L. & Etcheverría, A. I. (2018). Detection and Characterization of *Salmonella* Serotypes in the Production Chain of Two Pig Farms in Buenos Aires Province, Argentina. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1370.
- Collado, M., Meriluoto, J. & Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in applied microbiology*, 45, 454-460.

- CONICET (2016). Informe de la República Argentina en respuesta a la solicitud de datos sobre *Escherichia coli* productor de verocitotoxina (VTEC)/*E. coli* productor de toxina de Shiga (STEC). Argentina: Red de Seguridad Alimentaria
- Coral, C. B. S., Carmen, G. C., Consuelo, L. N. & Bricia, L. P. (2016). *Manual de alimentación. Planificación alimentaria* Editorial UNED.
- Cornellá, A. S. (2018). Microbiología de los alimentos. *Microbiología*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Melis, R., Pomata, R. & Pisano, M. B. (2012). Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. *BioMed Research International*, 2012.
- Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. (2005). Food microbiology: bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777.
- da Silva, A. G., Baines, S. L., Carter, G. P., Heffernan, H., French, N. P., Ren, X., Seemann, T., Bulach, D., Kwong, J. & Stinear, T. P. (2017). A phylogenomic framework for assessing the global emergence and evolution of clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Genomics*, 3.
- Daeschel, M. A. y. K., Todd R (1985). Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 1538-1541.
- Dallal, M. S., Zamaniahari, S., Davoodabadi, A., Hosseini, M. & Rajabi, Z. (2017). Identification and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional persian pickled vegetables. *GMS hygiene and infection control*, 12.
- Daly, C., Sandine, W. & Elliker, P. (1972). Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: *Streptococcus diacetilactis* versus food pathogens. *Journal of Milk and Food Technology*, 35, 349-357.
- Davey, M. E. & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64, 847-867.
- De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A. & Gobbetti, M. (2006). Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Research in Microbiology*, 157, 792-801.
- De Man, J., Rogosa, d. & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23, 130-135.
- De Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M. & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018-1028.
- del Campo, M., I, C. & Gómez, H. E. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis*, 6.
- Desmarais, G. (2016). Analyse de la distribution d'*Escherichia coli*, utilisée comme un marqueur microbiologique, dans un réseau de production porcin.
- Di Gioia, D., Mazzola, G., Nikodinoska, I., Aloisio, I., Langerholc, T., Rossi, M., Raimondi, S., Melero, B. & Rovira, J. (2016). Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent *Clostridium* spp. growth. *International journal of food microbiology*, 235, 53-59.

- Dias, F., Santos, M. & Schwan, R. (2015). Enumeration, identification and safety proprieties of lactic acid bacteria isolated from pork sausage. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67, 918-926.
- Diaz, C. (2011). *Adherencia y colonización de Pseudomonas fluorescens sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie*. Facultad de Ciencias Exactas.
- Dicks, L., Mellett, F. & Hoffman, L. (2004). Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*, 66, 703-708.
- Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C. & Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30, 1562-1574.
- Doulgeraki, A. I., Paraskevopoulos, N., Nychas, G. J. E. & Panagou, E. Z. (2013). An in vitro study of *Lactobacillus plantarum* strains for the presence of plantaricin genes and their potential control of the table olive microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, 821-832.
- Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Singh, P. & Singh, B. R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PloS one*, 13, e0192978.
- Doyle, M. P., Steenson, L. R. & Meng, J. (2013). Bacteria in food and beverage production. *The prokaryotes*. Springer.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M. & Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70, 564-582.
- Dubernet, S., Desmasures, N. & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS microbiology letters*, 214, 271-275.
- Durán, L. (2001). Aditivos naturales. *Arbor*, 168, 87-107.
- Edwards, J. R. & Fung, D. Y. (2006). Prevention and decontamination of *Escherichia coli* O157: H7 on raw beef carcasses in commercial beef abattoirs. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 14, 1-95.
- EFSA (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13.
- Elder, R. O., Keen, J. E., Siragusa, G. R., Barkocy-Gallagher, G. A., Koohmaraie, M. & Laegreid, W. W. (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 2999-3003.
- FAO (2006). Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A. & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33, 438-450.
- Favier, G. I., Estrada, C. S. L., Otero, V. L. & Escudero, M. E. (2013). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. *Food Control*, 29, 49-54.
- FDA. (1998). *Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables* [Online]. Available: Food and Drug Administration (FDA). Department of Health and Human Services (DHHS). Center for Food Safety

- and Applied Nutrition (CFSAN). 26 de Octubre de 1998. Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, en el caso de frutas y vegetales frescos. [Accessed].
- Ferrer, B. D. (2001). J. 2001. Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediátrica Española*, 59, 49-54.
- Field, D., O'Connor, R., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. (2016). In vitro activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms. *Frontiers in microbiology*, 7, 508.
- Figueroa, G., Navarrete, P., Caro, M., Troncoso, M. & Faúndez, G. (2002). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista médica de Chile*, 130, 859-864.
- Figueroa Ochoa, I. M. & Verdugo Rodríguez, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47.
- Floch, M. H., Walker, W. A., Sanders, M. E., Nieuwdorp, M., Kim, A. S., Brenner, D. A., Qamar, A. A., Miloh, T. A., Guarino, A. & Guslandi, M. (2015). Recommendations for probiotic use—2015 update: proceedings and consensus opinion. *Journal of clinical gastroenterology*, 49, S69-S73.
- Frizzo, L. S., Astesana, D. M., Soto, L. P., Blajman, J., Zbrun, M. V., Signorini, M., Marti, L., Sequeira, G. J. & Rosmini, M. R. (2013). La seguridad en la cadena agroalimentaria de la carne: problemáticas, estrategias y posibles soluciones pre-faena. *Fave. Sección ciencias agrarias*, 12, 35-54.
- Frizzo, L. S., Soto, L. P., Bertozzi, E., Sequeira, G., Marti, L. E. & Rosmini, M. R. (2006). Evaluación in vitro de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 5, 69-80.
- Galdeano, C. M. P., G (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13, 219-226.
- Gámez, H. J., Aguirre, D. & Ramírez, C. (2009). Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. *Revista MVZ Córdoba*, 14, 1723-1735.
- Gámez, H. J., Jarrín, V. J. & Salas, J. P. (2015). Crecimiento de *L. plantarum* y efecto sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens* y *S. aureus*. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 13, 57-66.
- Gamiño-Arroyo, A. E., Barrios-Ceballos, M. P., Cárdenas de la Peña, L. P., Anaya-Velázquez, F. & Padilla-Vaca, F. (2005). Flora normal, probióticos y salud humana. *Acta universitaria*, 15.
- Gandhi, M. & Chikindas, M. L. (2007). Listeria: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International journal of food microbiology*, 113, 1-15.
- García Ibarra, J. A. (2007). Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación.
- García Peris, P. V. G., C (2007). Evolución en el conocimiento de la fibra. *Nutrición hospitalaria*, 22, 20-25.
- Giello, M., La Storia, A., De Filippis, F., Ercolini, D. & Villani, F. (2018). Impact of *Lactobacillus curvatus* 54M16 on microbiota composition and growth of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. *Food Microbiology*, 72, 1-15.

- Goepfert, J. C., KC (1970). Behavior of *Salmonella* during the manufacture and storage of a fermented sausage product. *Journal of Milk and Food Technology*, 33, 185-191.
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X. & de Melo Franco, B. D. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in microbiology*, 7, 863.
- González-Martínez, B. E., Gómez-Treviño, M. & Jiménez-Salas, Z. (2003). Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4.
- González, S. N., Apella, M. C., Romero, N. C., De Macías, M. E. N. & Oliver, G. (1993). Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. *Journal of food protection*, 56, 773-776.
- Gorbeña, J. C. R. S., Tomás Agurto (2008). Bacterias ácido lácticas. *Biotempo*, 8, 54-64.
- Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. d. A. F. & Shah, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 455-470.
- Grant, A. Q., Gay, C. G. & Lillehoj, H. S. (2018). Bacillus spp. as direct-fed microbial antibiotic alternatives to enhance growth, immunity, and gut health in poultry. *Avian Pathology*, 47, 339-351.
- Grimont, P. A. & Weill, F.-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 9, 1-166.
- Guevara, J. (2011). Probióticos en nutrición animal. *Revisión bibliográfica. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos (Sirivs). Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Guillot, C. C. (2017). Microbiota intestinal y salud infantil. *Revista Cubana de Pediatría*, 90.
- Gyles, C. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of animal science*, 85, E45-E62.
- Harris, L. J., Fleming, H. P. & Klaenhammer, T. R. (1992). Novel paired starter culture system for sauerkraut, consisting of a nisin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* strain and a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1484-1489.
- Hassan, Z. (2015). Anti-Adhesion Activity of Lactic Acid Bacteria Supernatant against Human Pathogenic *Candida* Species Biofilm. *Health Science Journal*, 9.
- Heredia-Castro, P. Y., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Cordova, A. F. & Vallejo-Cordova, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42.
- Hernandez, D., Cardell, E. & Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of applied microbiology*, 99, 77-84.
- Hernández Pérez, A. (2016). Los Probióticos como una alternativa de mejora y de reemplazo a los antibióticos promotores del crecimiento en la alimentación animal.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J. & Salminen, S. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11, 506.

- Ibar, M., Vigo, G., Piñeyro, P., Caffer, M., Quiroga, P., Perfumo, C., Centrón, D. & Giacoboni, G. (2009). Serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie enterica en porcinos de faena y su resistencia a los antimicrobianos. *Revista argentina de microbiología*, 41, 156-162.
- Imamovic, L., Ballesté, E., Jofre, J. & Muniesa, M. (2010). Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in wastewater and in fecal samples by real-time quantitative PCR. *Applied and environmental microbiology*, 76, 5693-5701.
- Ispirli, H. D., Enes (2017). Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from traditional koumiss and kurut. *International Journal of Food Properties*, 20, S2441-S2449.
- Jalilsood, T., Baradaran, A., Song, A. A.-L., Foo, H. L., Mustafa, S., Saad, W. Z., Yusoff, K. & Rahim, R. A. (2015). Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming *Lactobacillus* isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins. *Microbial cell factories*, 14, 96.
- Jeong, J. K., IH (2014). Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. *Poultry science*, 93, 3097-3103.
- Johannessen, G., Frøseth, R., Solemdal, L., Jarp, J., Wasteson, Y. & M Rørvik, L. (2004). Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic iceberg lettuce. *Journal of applied microbiology*, 96, 787-794.
- Jones, S. E. y. V., James (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC microbiology*, 9, 35.
- Juárez Estrada, M. A., Molina Hernández, J. A. & González Soto, L. (2010). Un probiótico definido aumenta la exclusión de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis durante la crianza de aves ligeras. *Veterinaria México*, 41, 25-43.
- Jurado, H., Aguirre, D. & Ramírez, C. (2009). Characterization of isolated probiotic bacteria of the large intestine of pigs as alternative to using antibiotics. *Revista MVZ Córdoba*, 14, 1723-1735.
- Kalule, J. B. (2017). *One Health-One City; the extent of Shiga-toxin producing Escherichia coli in Cape Town*. University of Cape Town.
- Kaper, J. (2014). *Escherich and Escherichia. Cellular and molecular biology of E. coli, Salmonella and the Enterobacteriaceae*. EcoSalPLus.
- Karmali, M., Petric, M., Steele, B. & Lim, C. (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *The Lancet*, 321, 619-620.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12, 39-85.
- Klaenhammer, T. R. (1998). Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. *International Dairy Journal*, 8, 497-505.
- Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S. A., Sandbrink, H. M. & Fiers, M. W. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 1990-1995.
- Kociubinski, G. L., Perez, P. F., Anon, M. C. & De Antoni, G. L. (1996). A method of screening for highly inhibitory lactic acid bacteria. *Journal of food protection*, 59, 739-745.

- Koláčková, I., Házová, K., Skočková, A. & Karpíšková, R. (2014). Occurrence of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* strains in pigs and cattle at slaughterhouses in the Czech Republic in 2013. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 20, 36-39.
- Kong, C., Neoh, H.-m. & Nathan, S. (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins*, 8, 72.
- Konowalchuk, J., Speirs, J. & Stavric, S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 18, 775-779.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V. A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W. H. & Franz, C. M. (2005). Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Systematic and applied microbiology*, 28, 527-540.
- Kröckel, L. (2013). *The role of lactic acid bacteria in safety and flavour development of meat and meat products*, INTECH Open Access Publisher.
- Kumar, L. M., Saad, W. Z., Mohamad, R. & Rahim, R. A. (2017). Influence of biofilm-forming lactic acid bacteria against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA S547). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 1107-1115.
- Kwon, H.-S., Yang, E.-H., Yeon, S.-W., Kang, B.-H. & Kim, T.-Y. (2004). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS microbiology letters*, 239, 267-275.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S. & von Wright, A. (2011). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, CRC Press.
- Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizzello, F., Caramelli, E., Matteuzzi, D. & Campieri, M. (2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38, 165-172.
- Lasa, I., Del Pozo, J., Penades, J. R. & Leiva, J. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 2005. Scielo España, 163-175.
- Le Loir, Y., Baron, F. & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2, 63-76.
- Le Minor, L. & Popoff, M. Y. (1987). Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37, 465-468.
- Leal, M. G., Miguel L.; Sanchez Rico, Adriana P. (2018). Estudio panorámico de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva: alimentos funcionales. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- LeJeune, J. & Wetzell, A. (2007). Preharvest control of O157 in cattle. *Journal of Animal Science*, 85, E73-E80.
- Leung, P., Yam, W., Ng, W. & Peiris, J. (2001). The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. *Epidemiology and infection*, 126, 173-179.
- Li, R., Lai, J., Wang, Y., Liu, S., Li, Y., Liu, K., Shen, J. & Wu, C. (2013). Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *International journal of food microbiology*, 163, 14-18.
- Lin, J.-J. & Busi, S. B. (2016). High temperature, resistant probiotics for food and feed preparations. Google Patents.

- Liong, M.-T. (2011). *Probiotics: biology, genetics and health aspects*, Springer Science & Business Media.
- López, M. M., Jiménez, S. P. & González, S. V. (2007). Probióticos: potencial para prevenir y curar. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1, 573.
- Lücke, F.-K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 56, 105-115.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A. & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in food science & technology*, 30, 70-83.
- Mead, G. (2000). Prospects for 'competitive exclusion'treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. *The Veterinary Journal*, 159, 111-123.
- Medina, M. (2017). Cultivos protectores e iniciadores en productos lácteos: situación actual y tendencias. *ACTA/CL: Revista de la Asociación de Científicos y Tecnólogos de Alimentos de Castilla y León*, 5-9.
- Mehrotra, M., Wang, G. & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of clinical microbiology*, 38, 1032-1035.
- Mendoza, M. T. H. & Esp, B. (2004). El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova*, 2, 71-80.
- Meyer, J. (1987). JG Holt Ed.-In-Chief, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 Ed.: PHA Sneath, NS Mair, HE Sharpe. *Journal of Basic Microbiology*, 27, 398-398.
- Mihaiu, L., Lapusan, A., Tanasuica, R., Sobolu, R., Mihaiu, R., Oniga, O. & Mihaiu, M. (2014). First study of *Salmonella* in meat in Romania. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8, 050-058.
- Mirzaei, E. Z., Lashani, E. & Davoodabadi, A. (2018). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt and milk against *Shigella* strains. *GMS hygiene and infection control*, 13.
- Molenaar, D., Bringel, F., Schuren, F. H., De Vos, W. M., Siezen, R. J. & Kleerebezem, M. (2005). Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *Journal of Bacteriology*, 187, 6119-6127.
- Moon, J. S., Lee, A. R., Jaw, S. H., Kang, H. M., Joo, Y. S., Park, Y. H., Kim, M. N. & Koo, H. C. (2007). Comparison of antibiogram, staphylococcal enterotoxin productivity, and coagulase genotypes among *Staphylococcus aureus* isolated from animal and vegetable sources in Korea. *Journal of Food Protection*®, 70, 2541-2548.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N. & Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT-Food Science and Technology*, 43, 1320-1324.
- Moredo, F. (2012). *Prevalencia de Escherichia coli enterotoxigénico y Escherichia coli productor de toxina Shiga en cerdos sin manifestación clínica de diarrea de la provincia de Buenos Aires*. UNLP.
- Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M. (2009). *Staphylococcus* y cocos grampositivos relacionados. *Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica*, 7, 175.
- Muruzović, M. Ž., Mladenović, K. G., Žugić-Petrović, T. D. & Čomić, L. R. (2018). Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian Cheese and evaluation of their antagonistic potential against *Enterobacteriaceae*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, e13577.

- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11, 142-201.
- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67, 161-172.
- Ndahetuye, J. B., Koo, O. K., O'Bryan, C. A., Ricke, S. C. & Crandall, P. G. (2012). Role of lactic acid bacteria as a biosanitizer to prevent attachment of *Listeria monocytogenes* F6900 on deli slicer contact surfaces. *Journal of food protection*, 75, 1429-1436.
- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J. & Scheutz, F. (2010). Food-borne diseases the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International journal of food microbiology*, 139, S3-S15.
- O'Brien, S. J., Adak, G. K. & Gilham, C. (2001). Contact with farming environment as a major risk factor for Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 infection in humans. *Emerging infectious diseases*, 7, 1049.
- OMS (2017). Informe programático y financiero de la OMS de mitad de periodo para 2016-2017, incluidos los estados financieros comprobados correspondientes a 2016. Asamblea Mundial de la Salud.
- Ortega Mafla, A. (2014). *Estudio de factibilidad para la elaboración de pollo ahumado empacado al vacío y su comercialización en la ciudad de Quito*. Universidad Nacional de Loja
- Ouwehand, A. C. & Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. *Food Science and Technology -New York- Marcel Dekker*, 139, 375-396.
- Páez, R. B. (2014). *Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para la aplicación en alimentos*. Facultad de Ciencias Exactas.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P. & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 512-542.
- Parma, A., Sanz, M., Viñas, M., Cicuta, M., Blanco, J., Boehringer, S., Vena, M., Roibon, W., Benitez, M. & Blanco, J. (2000). Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. *Veterinary microbiology*, 72, 269-276.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review lactic acid bacteria: functional role in the foods. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8, 93-105.
- Pena, J., Li, S., Wilson, P., Thibodeau, S., Szary, A. & Versalovic, J. (2004). Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: species differences in mice with and without colitis. *Applied and environmental microbiology*, 70, 558-568.
- Pérez, E., Aguiar, P., Salvatella, R., Ribetto, A. & Castro, A. (2004). Vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA): su importancia en la caracterización de riesgos. Asociación Argentina de Microbiología.
- Pérez, J., Rocha, E., Uzcategui, D., Aranguren, Y. & Machado, E. (2015). Aislamiento, selección y caracterización de cepas del género *Lactobacillus* aisladas de líquido ruminal vacuno en la zona Sur del Lago, Venezuela. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 7, 165-170.
- Pía Taranto, M., Médici, M. & Font Valdez, G. (2005). Alimentos funcionales probióticos. *Química viva*, 4.
- Pinchuk, I. V., Beswick, E. J. & Reyes, V. E. (2010). Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*, 2, 2177-2197.

- Popoff, M. Y. & Le Minor, L. E. (2005). *Salmonella. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Poupard, J. A., Husain, I. & Norris, R. F. (1973). Biology of the bifidobacteria. *Bacteriological reviews*, 37, 136.
- Quillama, E. (1998). Producción de bacteriocinas por cepas de *Lactobacillus* aisladas de chicha de jora. *Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru*.
- Rajic, A., Chow, E. Y., Wu, J. T., Deckert, A. E., Reid-Smith, R., Manninen, K., Dewey, C. E., Fleury, M. & McEwen, S. A. (2007). *Salmonella* infections in ninety Alberta swine finishing farms: serological prevalence, correlation between culture and serology, and risk factors for infection. *Foodborne pathogens and disease*, 4, 169-177.
- Rajoka, M. S. R., Hayat, H., Sarwar, S., Mehwish, H., Ahmad, F., Hussain, N., Shah, S., Khurshid, M., Siddiqui, M. & Shi, J. (2018). Isolation and evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from poultry intestine. *Microbiology*, 87, 116-126.
- Ramírez, J., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., González, J. A. U. & Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista fuente*, 2.
- Rathore, M. S., Kanika (2018). Probiotic Properties of Lipolytic Bacteria Isolated from Fermented Food and Dairy Products.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M. & Hargrett, N. T. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, 308, 681-685.
- Rivas, M., Padola, N. L., Lucchesi, P. M., Masana, M. & Torres, A. (2010). Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America, AG Torres (Ed.)*, 142-161.
- Rivas, R. N. S. (2004). *Acción antimicrobiana de dos bacteriocinas lácticas sobre Listeria monocytogenes adherida a una superficie de acero inoxidable*. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad
- Rodgers, S. (2003). Potential applications of protective cultures in cook-chill catering. *Food control*, 14, 35-42.
- Rodríguez-Guerrero, V. G.-B., J (2010). Probióticos: resistencia gastrointestinal y microencapsulación. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 4, 48-57.
- Rodríguez-Membibre, M. L. (1995). *Bacterias productoras de ácido láctico: Efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones*. Universidad Complutense de Madrid.
- Rodríguez, D. M. & Suárez, M. C. (2014). *Salmonella* spp. in the pork supply chain: a risk approach. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 27, 65-75.
- Roldán, M. L., Otero, J. L., Villarreal, F., Baroni, M. R., Carrasco, M. S., Álvarez, C., Russell-White, K., Méndez, E. d. l. Á. & Simonetta, A. C. (2011). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157: H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31, 37-41.
- Ruge Garzón, C. (2018). *La pobreza en el departamento del Huila y proyectos de seguridad alimentaria para mitigarla*. AEA. Pregrado de Economía, Universidad Católica de Colombia

- Ruíz, F. O., Gerbaldo, G., García, M. J., Giordano, W., Pascual, L. & Barberis, I. L. (2012). Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactobacilli strains with inhibitory activity for *Streptococcus agalactiae*. *Current microbiology*, 64, 349-356.
- Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D. & Spano, G. (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International journal of food microbiology*, 247, 48-54.
- Sáez Orviz, S. (2016). Estudio genómico de *Lactobacillus plantarum* LL441 y caracterización del locus de la plantaricina C.
- Salmon, D. & Smith, T. (1886). The bacterium of swine plague. *Am. Month. Microbiol. J*, 7, 204.
- Salto Solórzano, J. V., Márquez Bravo, Y. J., López Apolinario, A. I., Martínez Abreu, J. & Guerrero Proaño, D. G. (2018). La implementación de procedimientos estandarizados en la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos. Cuento microbiológico del *Staphylococcus aureus* en quesos frescos. *Revista Médica Electrónica*, 40, 371-382.
- Sanchez Alzuria, N. (2015). *Evaluación del efecto probiótico de las cepas Lactobacillus reuteri CECT7266 y Lactobacillus fermentum CECT7265 en perros sanos*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Sánchez, L. T., Jeannette (2014). Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Revista de Salud Animal*, 36, 124-129.
- Sánchez Suárez, H., Ochoa Mogollón, G., Rojas Mogollón, C., Peralta Ortiz, T. & Ordinola Zapata, A. (2017). Aislamiento de péptidos inhibidores de bacterias a partir de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo del lechón e identificación mediante prueba proteómica. *Scientia Agropecuaria*, 8, 437-443.
- Sari, M. S., Dwi. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from bekasam against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Salmonella* sp. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2018. IOP Publishing, 012011.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 7, 153-170.
- Scheutz, F. & Strockbine, N. A. (2005). *Escherichia*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.
- Schillinger, U. L., Friedrich Karl (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and environmental microbiology*, 55, 1901-1906.
- Serra, P. (2003). Estudio del biofilm: formación y consecuencia. Escola de Prevenció y Seguretat Integral.
- Shew, A. (2017). ¿Está usted seguro que no fue una intoxicación alimentaria? Estados Unidos: NHCOA Media.
- Shiloach, J., Reshamwala, S., Noronha, S. B. & Negrete, A. (2010). Analyzing metabolic variations in different bacterial strains, historical perspectives and current trends, example *E. coli*. *Current opinion in biotechnology*, 21, 21-26.
- Shirai, K., Guerrero, I. & Lara, P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*, 47, 125-137.

- Silva, C. A., Baker, D., Shepherd, A. W., Jenane, C. & Miranda da Cruz, S. (2013). Agroindustrias para el desarrollo Italia: FAO.
- Slauch, J. M., Mahan, M. J., Michetti, P., Neutra, M. R. & Mekalanos, J. J. (1995). Acetylation (O-factor 5) affects the structural and immunological properties of *Salmonella* Typhimurium lipopolysaccharide O antigen. *Infection and immunity*, 63, 437-441.
- Sobrino, O. J., Rodríguez, J. M., Moreira, W. L., Fernández, M. F., Sanz, B. & Hernández, P. E. (1991). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *International journal of food microbiology*, 13, 1-10.
- Sofos, J. N. (2008). Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat science*, 78, 3-13.
- Soliman, W., Wang, L., Bhattacharjee, S. & Kaur, K. (2011). Structure– activity relationships of an antimicrobial peptide plantaricin S from two-peptide class IIb bacteriocins. *Journal of medicinal chemistry*, 54, 2399-2408.
- Soriano, A. P., Mamuad, L. L., Kim, S.-H., Choi, Y. J., Jeong, C. D., Bae, G. S., Chang, M. B. & Lee, S. S. (2014). Effect of *Lactobacillus mucosae* on in vitro rumen fermentation characteristics of dried brewers grain, methane production and bacterial diversity. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27, 1562.
- Soto Varela, Z., Pérez Lavalle, L. & Estrada Alvarado, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en colombia. *Revista Salud Uninorte*, 32, 105-122.
- Strockbine, N. A., Marques, L., Newland, J. W., Smith, H. W., Holmes, R. K. & O'brien, A. D. (1986). Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157: H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infection and immunity*, 53, 135-140.
- Tauxe, R. V., Doyle, M. P., Kuchenmüller, T., Schlundt, J. & Stein, C. (2010). Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International journal of food microbiology*, 139, S16-S28.
- Thomson, I. (2018). Kawthar, M. Aseel, Hanan, B. Eltahir, Yousif, F. Hamed Elnil and Ahmed, E. Elfaki. *Pakistan Journal of Nutrition*, 17, 57-63.
- Tormo Carnicé, R. Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría*, 2006. 30-41.
- Torrens, H. R., Argilagos, G. B., Cabrera, M. S., Valdés, J. B., Sáez, S. M. & Viera, G. G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16, 1-27.
- Torres Rubio, M. (2018). *Implementación de buenas prácticas para la industria productora de carne*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Tuin, A., Huizinga-Van der Vlag, A., van Loenen-Weemaes, A.-M. M., Meijer, D. K. & Poelstra, K. (2006). On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290, G377-G385.
- Työppönen, S., Petäjä, E. & Mattila-Sandholm, T. (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 233-244.
- Valdovinos, M., Montijo, E., Abreu, A., Heller, S., González-Garay, A., Bacarreza, D., Bielsa-Fernández, M., Bojórquez-Ramos, M., Bosques-Padilla, F. & Burguete-García, A. (2017). Consenso mexicano sobre probióticos en Gastroenterología. *Revista de gastroenterología de Mexico*, 82, 156-178.

- Vallejo, M., Etchechoury, V., Horiszny, C. & Marguet, E. (2009). Inhibición de *Escherichia coli* O157: H7 por cepas *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. *Analecta Veterinaria*, 29.
- Van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S. & Couloux, A. (2006). The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 9274-9279.
- Vanegas, M. A. F., Londoño, A. F., Zuleta, M. M. D., Buriticá, M. A. G., Agudelo, S. O. & Valencia, J. U. S. (2017). Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 15, 45-55.
- Vasiee, A., Mortazavi, A., Tabatabaei-yazdi, F. & Dovom, M. (2018). Detection, identification and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh, Iranian fermented cereal product, by amplifying the 16s rRNA gene with universal primers and differentiation using rep-PCR. *International Food Research Journal*, 25.
- Vásquez, S. M., Suárez, H. & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36, 64-71.
- Verso, L. L., Lessard, M., Talbot, G., Fernandez, B. & Fliss, I. (2017). Isolation and Selection of Potential Probiotic Bacteria from the Pig Gastrointestinal Tract. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-14.
- Vico, J. P. (2014). *Estudio epidemiológico de la salmonelosis porcina en la provincia de Córdoba*. Universidad Católica de Córdoba.
- Villalobos, S., Parra Cota, F. I., Herrera Sepúlveda, A., Valenzuela Aragón, B. & Estrada Mora, J. C. (2018). Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9, 191-202.
- Vinderola, C. R., JA (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895-904.
- Vuan Lanusse, M. V. (2018). *Tendencias de producción de ácido láctico a partir de recursos renovables*. Universidad ORT Uruguay.
- Woo, J. A., J (2013). Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, 56, 307-313.
- Yamada, Y., Endou, M., Morikawa, S., Shima, J. & Komatshzaki, N. (2018). Lactic Acid Bacteria Isolated from Japanese Fermented Fish (Funa-Sushi) Inhibit Mesangial Proliferative Glomerulonephritis by Alcohol Intake with Stress. *Journal of nutrition and metabolism*, 2018.
- Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., Xi, M., Sheng, M., Zhi, S. & Meng, J. (2010). Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *International journal of food microbiology*, 141, 63-72.
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J. & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28, 1033-1040.

- Zargar, S. S., Doust, R. H. & Mobarez, A. M. (2014). *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A Gene Isolated From Raw Red Meat and Poultry in Tehran, Iran. *International Journal of Enteric Pathogens*, 2.
- Zea, J. M. V., Ramírez, L. A. G. & Campuzano, O. I. M. (2015). Evaluación de la actividad bactericida de bacterias ácido lácticas aisladas en calostro de cerdas frente a *Salmonella* Typhimurium. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 68, 7481-7486.
- Zhang, S., Kingsley, R. A., Santos, R. L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., Nunes, J., Tsois, R. M., Adams, L. G. & Bäumlér, A. J. (2003). Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infection and immunity*, 71, 1-12.
- Zinigul, S., Gulmira, B., Zakarya, K., Raikhan, D. & Akhan, A. (2016). Screening of lactic acid bacteria for antagonism toward pathogens and biofilm-forming activity. *European science review*.

Anexo I

Composición de medios de cultivo, soluciones y geles

- **Man Ragoza Sharpe**

Formula grs/l:

Proteosa peptona N°3	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2 g
Acetate de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Sulfato de magnesio	0,2 g
Sulfato de manganeso	0,05 g
Agar	13 g

Suspender 68.25 g del polvo en 1 litro de agua destilada. Autoclavar a 121°C, 15 min.

pH final 6,4 a 25°C.

- **Caldo LB**

Fórmula grs/l:

Tripteína	10 g
Extrato de levadura	5 g
NaCl	5 g

Ajustar el pH a 7,5 con NaOH y esterilizar por autoclave a 121°C, 15 min

- **Agar MacConkey**

Formula grs/l:

Peptona de caseína	17 g
Peptona de carne	3 g
NaCl	5 g

Lactosa	10 g
Mezcla de sales biliares	1,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar-agar	13,5 g

Disolver 50 g en 1 litro de agua desmineralizada calentando en baño de agua hirviendo o en corriente de vapor. Autoclavar a 121°C, 15 min. pH final 7,1 a 25°C.

- **Agar *Salmonella-Shigella***

Fórmula en grs/l

Pluripeptona	5 g
Extracto de carne	5 g
Lactosa	10 g
Mezcla de sales biliares	8,5 g
Citrato de sodio	8,5 g
Tiosulfato de sodio	8,5 g
Citrato férrico	1 g
Verde brillante	0,00033 g
Rojo neutro	0,025 g
Agar	13,5 g

Suspender 60 g de polvo por litro de agua destilada estéril. Homogeneizar y hervir por dos minutos. No autoclavar. pH final 7 a 25 °C

- **Agar Manitol Salado**

Fórmula en grs/l

Extracto de carne	1
Pluripeptona	10
d-manitol	10
Cloruro de sodio	75
Agar	15
Rojo de fenol	0,025

Suspender 111 g de polvo por litro de agua destilada. Autoclavar a 121°C, 15 min. pH final 7,4 a 25°C.

- **Tinción de Gram (solución concentrada 10X)**

Violeta de genciana (cristal violeta): solución concentrada 10X (2%).

Lugol: solución concentrada 10X

Decolorante: solución incolora

Safranina: solución concentrada 10X (2,5%)

Diluir las concentraciones 1/10, para 100 ml de cada solución.

- **Gel de agarosa al 2 %**

1,2 g de agarosa

65 ml de TBE 1x

0,8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de bromuro de etidio

- **Buffer de corrida (TBE)**

89 mM Tris

89 mM ácido bórico

1mM EDTA

pH 8

- **Proteinasa K**

A partir de un stock de proteinasa K de 20 mg/ml preparar una concentración de uso de 5 mg/ml.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$20\text{mg/ml} \times X = 5\text{mg/ml} \times 1 \text{ ml}$$

$$X = \frac{5 \text{ mg/ml} \times 1 \text{ ml}}{20 \text{ mg/ml}}$$

$$20 \text{ mg/ml}$$

$$X = 0,25 \text{ ml}$$

Entonces, colocar 250 μl de la Proteinasa K original (20 mg/ml) en 750 μl de agua bidestilada estéril para obtener una concentración final de 5 mg/ml.

- **Catalasa**

A partir de un stock de catalasa puro (2000 unidades) preparar una concentración de uso de 1mg/ml.

Colocar 10 mg de catalasa en 10 ml de agua bidestilada estéril para obtener una concentración final de 1mg/ml.

ANEXO II

Publicaciones y Comunicaciones a Congresos vinculadas al tema de Tesis

- Publicaciones en Revistas

2013 Ruiz MJ, Vega M, Etcheverría A, Colello R, Libonatti C. Caracterización de cepas de *Lactobacillus spp* mediante técnicas fenotípicas y genotípicas. Tecnología Láctea Latinoamericana. 2013. ISSN 0328-4158.

2016 R Colello, ME. Cáceres, MJ Ruiz, M Sanz, AI. Etcheverría* and NL. Padola. From Farm to Table: Follow-Up of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Throughout the Pork Production Chain in Argentina. *Frontiers in Microbiology*. February 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00093>

2017 Ruiz MJ, *et al.* Efecto inhibitorio de *Lactobacillus spp.* sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>

2018 Rocío Colello, María J. Ruiz, Valeria Padín, Ariel D. Rogé, Gerardo Leotta, Nora Lía Padola and Analía I. Etcheverría. Detection and characterization of Salmonella serotypes in the production chain of two pig farms in Buenos Aires province, Argentina. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2018.01370

Presentaciones en Eventos Científicos

2014 Ruiz MJ, Colello R, Padola NL, Etcheverría A. Evaluación de actividad inhibitoria de *Lactobacillus spp.* aislados de cerdo sobre *Escherichia coli* verocitotoxigénico. “X Congreso Argentino de Microbiología General” SAMIGE. Mar del Plata, Bs. As., Argentina. Asistencia y presentación de póster. 2-4 de Julio 2014.

2015 Colello R, Kruger A, RUIZ J, Sanso M, Bustamante A, Sanz M, Arroyo G, Fernández D, Cadona J, González J, Burgán J, Cáceres E, Lucchesi P, Etcheverría A, Padola N. Desde

la granja a la mesa: situación de *E coli* verotoxigénica en Argentina. 9nas J Internac.Veterinaria Práctica. Mar del Plata. 28-29 Agosto de 2015.

2015 Ruiz MJ, Colello R, Padola NL, Etcheverría AI. Evaluation of the inhibitory activity of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by *Lactobacillus* spp. isolated from pig. 9th Internacional Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing E coli Infections (VTEC 2015). Boston, Massachusetts, United States. 13-16 de septiembre. E. Posters_Tuesday Animal Reservoir, Food, Environment, Transmission. Pag. 19

2016 MJ Ruiz, NL Padola, AI Etcheverría. Evaluación de la capacidad de formación de biopelículas de *Lactobacillus* spp. de origen porcino a temperatura ambiente y de refrigeración. XXIII Congreso Latinoam. de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM 2016, IV CLAMME y SLAMTB. Rosario, Sta Fé. 26 al 30 de Septiembre de 2016.

2016 MJ Ruiz, M Indart, M García, NL Padola, AI Etcheverría. Evaluation of the interaction of lyophilized strains *Lactobacillus* spp. isolated from pig against *E. coli* O157:H7. V International symposium on lactic acid bacteria benefitting from lactic acid bacteria progress in health and food. Hilton Garden Inn. SM de Tucumán. Argentina. 19-21 de Octubre de 2016. Presentación de poster.

2016 M Indart, MJ Ruiz, MG de Yaniz, G Arroyo, AI Echeverría. In vitro evaluation of the presence and inhibitory activity of bacteriocins from *Lactobacillus* supernatant. V International symposium on lactic acid bacteria benefitting from lactic acid bacteria progress in health and food. Hilton Garden Inn. SM de Tucumán. Argentina. 19-21 de Octubre de 2016. Presentación de poster.

2017 Ruiz, MJ, Padola, NL; García, M; Montero D; Vidal, R; Etcheverría, AI. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre *Escherichia coli* O157:H7 aislados de niños con SUH. XVII JAM y JBS. Bahía Blanca. 7-9 Junio de 2017.

2017 RUIZ, M. JULIA; Colello, Rocío; Padola, Nora Lía; Etcheverría, Analía. Aislamiento y caracterización molecular de cepas de *Lactobacillus* spp. de origen porcino para su

potencial aplicación probiótica. XII Encuentro de Biólogos En Red. 13 y 14 de noviembre de 2017. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata.

2017 Colello R., Ruiz M.J., Etcheverría A., Padola N.L. Detección y caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* en boca de expendio de carne porcina. XII Encuentro de Biólogos En Red. 13 y 14 de noviembre de 2017. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata.

2018 AI Etcheverría, MJ Ruiz, NL Padola. Control of *Escherichia coli* O157:H7 by using *Lactobacillus reuteri* in environmental matrices. 10th International Symposium on Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. Congress Centre, Firenze, Italia. 6-9 de Mayo de 2018.

2018 Ruiz J, Cáceres E., Colello R., Etcheverria A, Padola NL. Control of *Escherichia coli* O157:H7 by using *Lactobacillus reuteri* in environmental matrices. 10th International Symposium on Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. Congress Centre, Firenze, Italia. 6-9 de Mayo de 2018.

2018 Ruiz MJ¹, García M¹, Colello R¹, Medina LM², Etcheverría AI¹. Efecto antimicrobiano de cepas de *Lactobacillus plantarum* ante *Salmonella* spp. aisladas de cerdo ibérico. VIII Jornadas de jóvenes investigadores. UBA, Buenos Aires. 6, 7 y 8 de Junio de 2018.

2018 Vega M. F., Libonatti. C., Ramos O., Ruiz M. J., Manno C, Basualdo M. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas provenientes de colonias de *Apis Mellifera*. XIII Congreso Latinoamericano de Apicultura Filapi 2018 – Montevideo, Uruguay. 2- 5 Agosto de 2018.