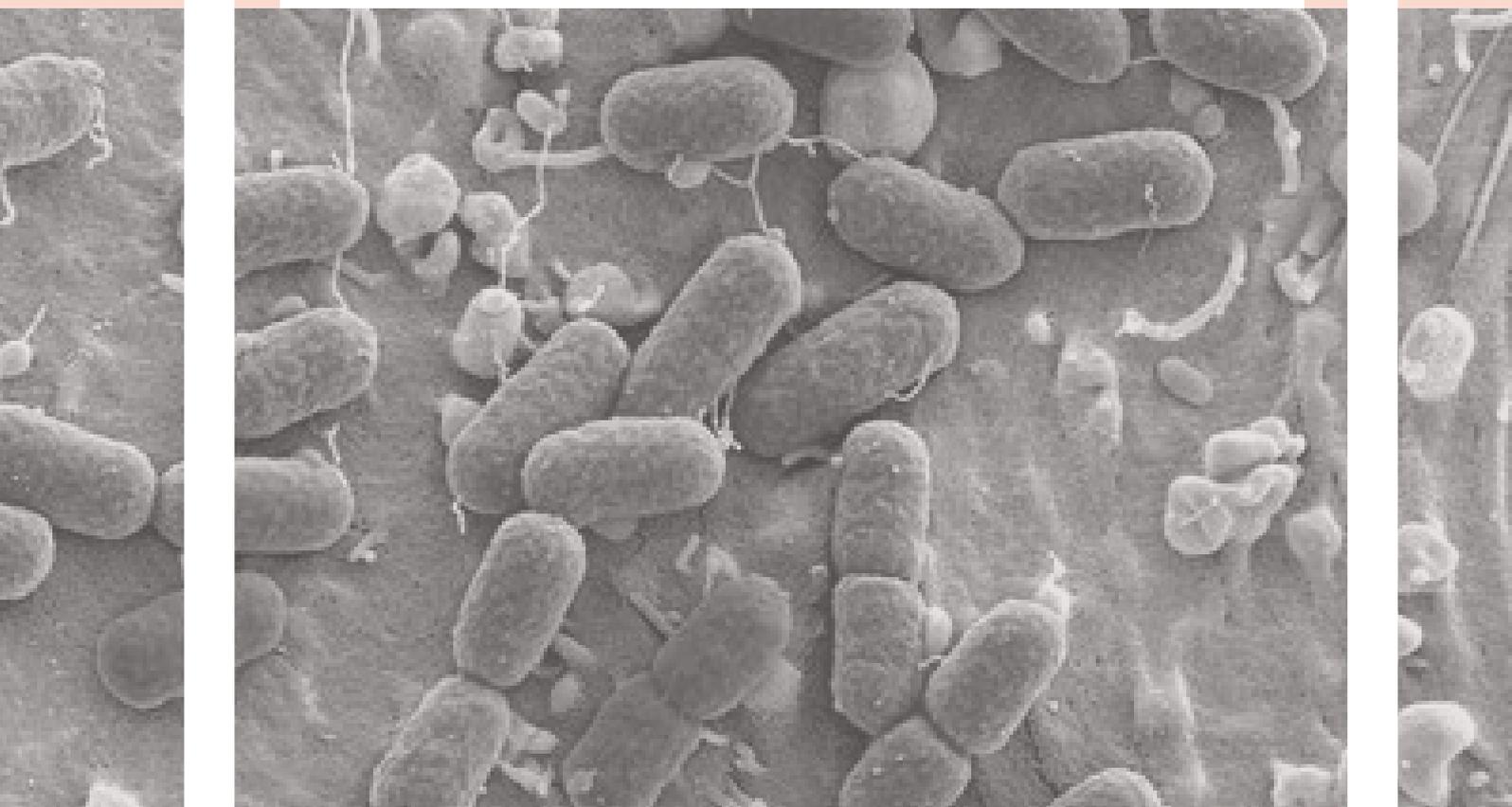


TESIS DOCTORAL

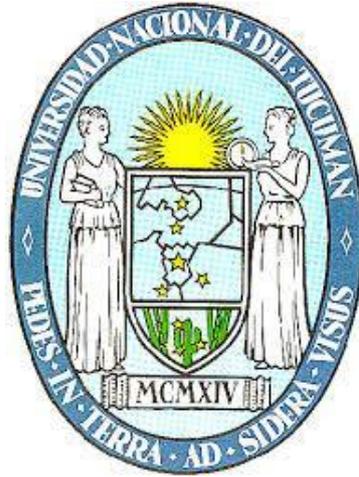
“ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS
DESTINADAS A COMBATIR
Escherichia coli ENTEROHEMORRÁGICA
EN CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS.
ESTUDIOS BIOQUÍMICOS
Y TECNOLÓGICOS”



Bioq. Alejandra Orihuel

2018 UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE TUCUMÁN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia



**“Estrategias biológicas destinadas a combatir
Escherichia coli enterohemorrágica en carne y
productos cárnicos. Estudios bioquímicos y
tecnológicos”**

Bioq. Alejandra Orihuel

Año 2018



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471- T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



AUTORIDADES

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos
Dr. Manuel Javier Aybar
Dra. Viviana Andrea Rapisarda
Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano
Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra
Dra. María Antonieta Gordillo
Lic. Rodrigo Hernán Tomas Grau
Sr. Mario Rodríguez
Sr. Joaquín Hernán Vargas
Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez
Srta. Karen Nahir Ríos

DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADÉMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE POSGRADO

Lic. Marta Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471- T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES

DIRECTOR

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR

Dra. Inés del Carmen Ramos
Dra. María Carolina Navarro
Dra. María Cristina Gaudioso
Dra. Paula Andrea Vincent
Dra. María Cristina Rubio

CONSEJO SUPLENTE

Dra. María Graciela Benzal
Dra. Clara del Valle Silvia de Ruíz
Dra. María Inés Nieva Moreno
Dra. Claudia Alejandra Crespo
Dra. María Angélica Véliz

REPRESENTANTE DE POSGRADO ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dr. Sergio Enrique Pasteris (Titular)
Dra. María Cristina Gaudioso de Allori (Suplente)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN - San Miguel de Tucumán - República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución N°: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: Resolución 750 - CONEAU-13

Director

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

Vice-Directora

Dra. Lucia Claps

Comité Académico

Dr. Alfredo Grau

Dr. Raúl Pedraza

Dra. Silvina Fadda



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471- T.E. 0054 381 4107215- FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS DESTINADAS A COMBATIR *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA EN CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y TECNOLÓGICOS

TESISTA

Bioq. Alejandra Orihuel

DIRECTOR

Dra. Silvina G. Fadda

CO-DIRECTOR

Dra. Lucila Saavedra

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN

Dra. Gabriela Zárate

Dra. Mónica Delgado

Esta Tesis Doctoral se desarrolló en el **Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)**, dependiente de CONICET, de la Fundación Miguel Lillo y de la Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC).



Este trabajo de Tesis Doctoral se financió a través de becas y subsidios otorgados por las siguientes instituciones: el **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)** y la **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT)**.

Quisiera agradecer también a CONICET por haberme otorgado la beca que posibilitó la realización de este trabajo de tesis y destacar la importancia que tiene la inversión del Estado Argentino en Ciencia y Tecnología, la cual permite la formación altamente calificada de profesionales en nuestro país.

Durante la realización de esta tesis doctoral fueron publicados los siguientes artículos en revistas científicas internacionales con referato:

- **Alejandra Orihuel**, Julieta Bonacina, María José Vildoza, Elena Bru, Graciela Vignolo, Lucila Saavedra, Silvina Fadda (2018). “*Biocontrol of Listeria monocytogenes in a meat model using a combination of a bacteriocinogenic strain with curing additives*”. Food Research International. Doi: 2018.02.043.
- **Alejandra Orihuel**, Lucrecia Terán, Jenny Renaut, Graciela M. Vignolo, André M. De Almeida, María L. Saavedra and Silvina Fadda (2018). “*Differential proteomic analysis of Lactic Acid Bacteria–Escherichia coli O157:H7 interaction and its contribution to bioprotection strategies in meat*”. Frontiers in Microbiology. Doi: 2018.01083.
- **Alejandra Orihuel**, Lucrecia Terán, Emilse Masías, Jenny Renaut, Carlos Minahk, André M. De Almeida, María Lucila Saavedra, Silvina Fadda. “*Proteomic and physiological appraisal of the interaction of Escherichia coli O157:H7 with a bioprotective lactic acid bacterium in a meat environment*”.
EN REDACCION

Y las siguientes presentaciones a congresos:

- 2015. **Orihuel, Alejandra**, Saavedra Lucila, Vignolo Graciela, Fadda Silvina. “*Interacción entre bacterias lácticas bioprotectoras y Escherichia coli O157:H7 durante el crecimiento como cultivos planctónicos en medio cárnico*”. XI Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. Ciudad de Córdoba. Modalidad póster.
- 2016. **Orihuel, Alejandra**, Saavedra Lucila, Fadda Silvina. “*Proteomic analysis of the Enterococcus mundtii CRL 35–Escherichia coli O157:H7 interaction during its growth in meat medium*”. V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL). Organizado por el Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA - CONICET). San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. Modalidad póster.

- 2016. Bonacina Julieta, **Orihuel Alejandra**, Fadda Silvina and Saavedra Lucila. "*Unraveling Enterococcus mundtii CRL35 behaviour in a chemically defined medium supplemented with meat proteins*". V Simposio Internacional de Bacterias Lácticas (SIBAL). Organizado por el Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA - CONICET). San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina. Modalidad póster.
- 2017. **Orihuel Alejandra**, Cisneros Lucía, Torres Carolina, Saavedra Lucila and Fadda Silvina. "*Biochemical and molecular characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli NCTC 12900 as atoxigenic model of study in meat*". Reunión conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires, Argentina. Comunicación oral.
- 2018. **Orihuel Alejandra**, Baillo Ayelén Antonella, Saavedra María Lucila, Fadda Silvina Graciela. "*Bacterias Lácticas bioprotectoras capaces de mitigar Escherichia coli O157:H7 en carne. Estudios in vitro e in situ*". IAFP VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria, III Simposio Argentino de Inocuidad Alimentaria. Buenos Aires, Argentina. Modalidad póster. **Mención de honor** otorgada por Publitez.

AGRADECIM

ENTOS

En primer lugar, siento una fuerte necesidad de agradecer a quién confió en mí, quien me motivó y caminó conmigo incondicionalmente durante estos 5 años, mi directora. Gracias **Sil F.**, gracias, gracias...por creerme capaz, por enseñarme siempre con una sonrisa, por tu generosidad, por hacerme tan bien y darme claridad con cada charla. Gracias por tus conocimientos, tu dedicación, tu profesionalismo, pero sobre todo hoy quiero agradecerte por tu lado humano, por tu empatía y buena energía diaria. Gracias por hacerme sentir que fuimos siempre un equipo tirando hacia el mismo lado. Tu excelencia académica junto a la gran persona que sos fueron la combinación perfecta que me permitió, como te dije siempre, DISFRUTAR de este trabajo. Gracias, muchas gracias de corazón.

A mi codirectora, gracias por tus valiosos aportes **Lulú S.**, por estar siempre presente cuando lo necesitamos, por tu compromiso, tu tiempo y generosidad. Gracias por tus consejos y sobre todo por tener siempre una sonrisa contagiosa para suavizar la rutina sin restar compromiso al trabajo. Gracias Lulú.

Al querido **Dr. Raúl R. Raya**, gracias por su interés genuino por el otro, por tener siempre una palabra de aliento, por su inagotable sabiduría y su capacidad única de transmitirla. Por tener para cada ocasión una anécdota para contar, a la cual todos escuchamos con una sonrisa y ansiosos de saber cómo termina. Gracias por robar sonrisas en cada pasillo de Cerela. Gracias por el café que ofrece a diario casi como un ritual de nuestros mediodías. Gracias Dr. por alegrar nuestros días de trabajo.

Gracias a todo el **personal de Cerela** que lleva a cabo sus funciones con una sonrisa y mucho cariño. Gracias Julito, Yoli, Mario, José Luis, Richard, Martita M., Mabeluchi, Pablito, Rocío, Sebas, Caro. A todos los **becarios**, que son el gran capital humano de la institución, en especial a los chicos del sum, con quién a diario compartimos el trabajo así como también los mates y charlas fundamentales para matizar el día.

A la Comisión de Supervisión, **Mónica Delgado** y **Gabriela Zárate**, por sus valiosos aportes en la escritura del manuscrito y por su acompañamiento durante el desarrollo de la tesis.

A la **Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia** que me brindó formación de excelencia para obtener este título y a la **sociedad argentina**, por ser quiénes anónimamente sostienen y permiten la actividad científica de nuestro país como herramienta esencial para trascender.

A mis primeros y por siempre amigos, **Mati R. y Gabi S.**, por tantos momentos que quedaron grabados en mí. Gracias Mati por tantas risas, por entendernos sobrando las palabras. Gracias Gabi querido por tantos cafés que significaban una intensa y renovadora charla juntos. Gracias por acordarte siempre de mí. Nuestra amistad es de lo más valioso que estos años me regaló.

A una gran amiga y persona, **Lucre T.** Gracias por este hermoso tiempo de trabajo compartido, hiciste grandes aportes a este trabajo de tesis, y me permitiste conocer la gran persona y excelente profesional que sos. Disfrute cada charla que tuvimos. Gracias Lucre querida.

A mi amiga, vecina, y gran compañera **Romi L.** Las casualidades nos acercaron este último tiempo y gracias a ellas conocí la gran persona que sos. Disfrute de cada recreo de las 11 am, cada almuerzo, mates y charlas necesarias para tomar aliento y seguir. Gracias por tu amistad Romi.

A alguien muy especial en esta última etapa, gracias **Anto R.**, por nuestras intensas conversaciones, por escucharnos, renegar, pero siempre al final concluir que tenemos un montón y esto recién empieza. Gracias por tu transparencia y generosidad, gracias Anto.

A mi gran amiga, gracias **Ale Co.** querida, gracias por cuidarme, por tu generosidad, por compartir conmigo esta última etapa de trabajo, por apoyarnos y hacerme sentir que juntas era más fácil. Gracias por preguntarme todos los días cómo estaba, porque sentía en esa pregunta tus ganas genuinas de saber si era un buen día para mí. Gracias amiga, te voy a extrañar.

Un gracias especial a personas con las que compartí mis primeros años de trabajo y dejaron hermosos recuerdos en mí: **Juli Bonacina**, gracias por tu generosidad y tus aportes a este trabajo. **Vicky Terán** y **Mariana Pérez I.** gracias por los momentos compartidos en aquel '128'.

A quién incondicionalmente me apoya, me impulsa y me sostiene... gracias **mamá**, por vivir mis logros como si fueran tuyos y por tu inagotable generosidad. Gracias por cuidar de lo más preciado que tengo, mi bebé, con un amor único y regalarme la tranquilidad de trabajar sabiendo q ella está en manos de quién la ama tanto como yo. Eterno gracias para vos, mi mamá.

Gracias a mis amadas hermanas, **Mari, Gabi y Virgi**, porque me apoyaron siempre, y estuvieron presentes en cada paso, en cada logro. Gracias Virgi por tu ayuda diaria en el cuidado de Cande, ella y yo somos felices que así sea.

Finalmente...a ellos, mi vida entera, mi familia...**Luis y Cande**...

Fue muy fácil este camino con un compañero como vos amor, fue muy fácil sintiéndote cerca, teniendo tu abrazo cuando llegaba a casa, teniendo tu mano cuando el cansancio me ganaba. Gracias por enseñarme a vivir todos los días. Te amo, te admiro y te quiero todos los días a mi lado. Gracias mi amor.

Y a ella, mi siempre bebé Cande, que me das vida todos los días. Gracias por enseñarme a optimizar cada minuto de mi tiempo, porque ya no hay minutos que sobren, son todos para vos que me esperas cada tarde para jugar y mimarte. Gracias por el efecto mágico de tus abrazos que me renuevan completamente como la mejor medicina ante cualquier mal día. Gracias por llegar a mi vida y hacerme una mejor persona.

RESUMEN

Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH) constituye una gran preocupación para la sostenibilidad de la industria de la carne y una grave amenaza para la salud pública a nivel mundial. La infección humana por ECEH ocurre a través de la ingestión de alimentos contaminados, principalmente carnes picadas. Además, el 5-10% de los pacientes infectados con ECEH (especialmente niños y adolescentes) desarrollan una grave patología, el Síndrome Urémico Hemolítico. Argentina es, a nivel mundial, el país con mayor incidencia de esta enfermedad.

En este contexto urge la necesidad de proporcionar a la industria de la carne soluciones sustentables para limitar y prevenir riesgos. Las bacterias lácticas (BL), presentes de forma natural en la carne, son de gran interés tecnológico debido a la capacidad de ciertas cepas para inhibir microorganismos patógenos y/o deteriorantes en alimentos. Además, las BL generalmente se consideran seguras (GRAS), de manera que su uso como bioprotectores en alimentos constituye una estrategia real. Sin embargo, hasta el momento no se dispone en el mercado de un cultivo láctico capaz de inhibir ECEH en carne. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar el potencial de cepas BL para inhibir a ECEH en carne y estudiar las bases moleculares subyacentes a la interacción entre BL-ECEH. Las cepas de BL estudiadas (*Lactobacillus curvatus* CRL705, *Lactobacillus plantarum* CRL681 y *Enterococcus mundtii* CRL35) fueron preseleccionadas por sus óptimas características bioquímicas y tecnológicas. Como patógeno modelo se utilizó la cepa atoxigénica *E. coli* O157:H7 NCTC12900. Cada cepa de BL fue cocultivada con ECEH en un medio experimental cárnico. *Ent. mundtii* CRL35 resultó seleccionada como candidato por su significativa capacidad anti ECEH. Este efecto demostró ser independiente de la acción de bacteriocina, del ácido u otro agente soluble producido por *Ent. mundtii*, sugiriendo la interacción célula-célula como uno de los mecanismos implicados en la inhibición. Mediante un enfoque proteómico comparativo se estudió las bases moleculares subyacentes a esta interacción bacteriana, pudiéndose correlacionar con éxito el perfil de proteínas sobreexpresadas con la fisiología de *Ent. mundtii* y una ventaja competitiva de la BL sobre el patógeno. Al estudiar el fenómeno de adhesión/colonización del alimento por ambos microorganismos, se observó una ventaja competitiva de *Ent. mundtii* con respecto a *E. coli*, en la unión a proteínas claves de la matriz extracelular cárnica. Finalmente, se diseñó un sistema experimental constituido por carne molida con el objetivo de evaluar la acción bioprotectora de *Ent. mundtii* *in situ*. Se observó un efecto bacteriostático de la BL sobre ECEH, aunque de menor magnitud que aquél

observado *in vitro*. Este resultado sugiere la necesidad de ensayos tecnológicos adicionales para optimizar la acción bioprotectora de esta cepa en un escenario real.

Este trabajo de tesis Doctoral, es pionero en los estudios de interacción entre una BL y un patógeno como ECEH, aplicando un enfoque multidisciplinario. Los resultados obtenidos contribuyen directamente a la tecnología de alimentos cárnicos, proponiéndose por primera vez un cultivo láctico contra ECEH, un patógeno alimentario que demanda soluciones urgentes en nuestro país.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a major concern for the sustainability of the meat industry and a serious threat to public health worldwide. Human EHEC outbreaks are linked to the consumption of contaminated food, mainly minced bovine meat. In addition, 5-10% of patients infected with EHEC (especially children and adolescents) develop a serious pathology, the hemolytic uremic syndrome. Argentina is the country with the highest incidence of this disease.

In this context, the need to provide the meat industry with sustainable solutions to limit and prevent risks is urgent. Lactic Acid Bacteria (LAB), naturally present in meat, are of high technological interest due to the ability of certain strains to inhibit pathogenic and/or spoilage microorganisms in foodstuffs. In addition, LABs are generally considered safe (GRAS), so their use as bioprotective cultures in food constitutes a real strategy. However, so far there is no available in the market a LAB culture active towards EHEC in meat. In this context, the objective of this work was to **determine the potential of LAB strains to inhibit EHEC in meat and to study the molecular bases underlying the interaction between LAB-EHEC.** The studied LAB strains (*Lactobacillus curvatus* CRL705, *Lactobacillus plantarum* CRL681 and *Enterococcus mundtii* CRL35) were preselected according to their optimal biochemical and technological characteristics. As pathogen model, the atoxigenic strain *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 was used. Each LAB strain was cocultivated with EHEC in an experimental meat medium. *Ent. mundtii* CRL35 was selected as a candidate for its significant anti-EHEC capacity. This effect proved to be independent of the action of antimicrobial (bacteriocin, acid, etc) or other soluble compounds produced by *Ent. mundtii*, suggesting cell-cell interaction as one of the mechanisms involved in inhibition. The molecular bases underlying this bacterial interaction was studied by means of a comparative proteomic approach, being able to correlate with success, the profile of overexpressed proteins with the physiology of *Ent. mundtii* as well as a competitive advantage of the LAB over the pathogen. When studying the phenomenon of food adhesion/colonization by both microorganisms, by assaying the binding to the key proteins of the extracellular meat matrix, a competitive advantage of *Ent. mundtii* was also observed. Finally, an experimental system consisting of ground beef was designed with the aim of evaluating *in situ* the bioprotective action of *Ent. mundtii*. A bacteriostatic effect of LAB on EHEC was observed, although of lesser magnitude than that observed *in vitro* studies. This result suggests that additional experiments are required to optimize the bioprotective action of this strain in meat under real technological conditions.

ABSTRACT

This work of doctoral thesis is the first research dealing in the interaction between a LAB and EHEC by applying a multidisciplinary approach. The obtained results will contribute directly to the meat technology and, for the first time, a LAB culture active against EHEC, a food pathogen that demands urgent solutions in our country is proposed.

INDICE

S

INTRODUCCIÓN
Y OBJETIVOS

O

2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
E. coli O157:H7 NCTC12900
Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
INHIBIDOR DE CEPAS LÁCTICAS
PRESELECCIONADAS

L

3 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
BL-ECEH *in vitro*

T

4 INTERACCIONES MICROBIANAS
EN CONDICIONES TECNOLÓGICAS

P

5 CONCLUSIÓN
Y PROYECCIONES

A

6 MATERIALES Y MÉTODOS

C

BIBLIOGRAFÍA

INDICE

CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	10
Introducción general.....	11
Problemática y relevancia del estudio.....	32
Hipótesis.....	32
Objetivo general	33
Objetivos específicos	33
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>E. coli</i> O 157:H7 NCTC 12900 Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBIDOR DE CEPAS LÁCTICAS PRESELECCIONADAS.....	34
Introducción.....	35
Caracterización de factores de virulencia de la cepa modelo <i>E. coli</i> O 157:H7 NCTC 12900 mediante PCR.....	37
Resultados.....	37
Discusión	39
Ensayos de inhibición en placa.....	41
Resultados.....	41
Discusión	42
Desempeño de BL y ECEH en ambientes cárnicos.....	44
Resultados.....	44
Discusión	47
Anexo Capítulo 2.....	49
CAPITULO 3 - ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN BL-ECEH <i>in vitro</i>	53
Introducción.....	54
Estudios proteómicos de la interacción BL-ECEH: análisis de expresión diferencial.....	56
Resultados.....	56
Discusión	57
A. Análisis proteómico para <i>Ent. mundtii</i> CRL35 durante su crecimiento en SCM.....	59
Resultados.....	59
Discusión	68
B. Análisis proteómico para ECEH.....	82

Resultados.....	82
Discusión	92
Estudios de adhesión a proteínas de la matriz extracelular cárnica (MEC)	107
Resultados.....	107
Discusión	109
Efecto de <i>Ent. mundtii</i> CRL35 sobre la inducción del fago W933.....	110
Resultados.....	110
Discusión	112
Evaluación de la actividad antilisteria de <i>Ent. mundtii</i> CRL35 durante el cocultivo con ECEH en ambiente cárnico	114
Resultados.....	114
Discusión	115
CAPITULO 4 - INTERACCIONES MICROBIANAS EN CONDICIONES TECNOLÓGICAS.....	117
Introducción.....	118
Desempeño de <i>Ent. mundtii</i> y ECEH en carne molida: estudios fisiológicos	119
Resultados.....	119
Discusión	123
CAPÍTULO 5 - CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES.....	126
Conclusión	127
Proyecciones.....	128
CAPITULO 6 - MATERIALES Y MÉTODOS	130
GENERALES.....	131
Conservación de cepas.....	132
Propagación	132
Medios de cultivo	132
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>E. coli</i> O157:H7 NCTC 12900 Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBIDOR DE CEPAS LÁCTICAS PRESELECCIONADAS.....	135
Caracterización de factores de virulencia de la cepa modelo <i>E. coli</i> O157:H7 NCTC 12900 mediante PCR	135
Selección de cepa BL con capacidad inhibitoria sobre ECEH.....	137
ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN BL-ECEH <i>in vitro</i>.....	139
Estudio proteómico.....	139
Análisis Funcional de Interacción de Proteínas sobreexpresadas	150

Ensayos de unión a Matriz Extracelular (MEC)	151
Evaluación del efecto inductor de <i>Ent. mundtii</i> CRL35 sobre el fago W933	152
Influencia del cocultivo con ECEH en la producción de bacteriocina por <i>Ent. mundtii</i> CRL35: titulación de enterocina CRL35.....	154
INTERACCIONES MICROBIANAS EN CONDICIONES TECNOLÓGICAS	156
Procesado y obtención de carne molida	156
Estudios fisiológicos en carne molida.....	157
CAPÍTULO 7 - BIBLIOGRAFÍA	158

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



CAPITULO

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Introducción general

Enfermedades Transmitidas por Alimentos, un desafío del siglo XXI

En el siglo XXI, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), lejos de erradicarse, siguen constituyendo una gran preocupación para la salud pública en nuestro país y el mundo. Las ETA se definen como un conjunto de síntomas y signos clásicos originados por el consumo de productos alimenticios e ingredientes, especias, bebidas y agua, que contienen agentes patógenos o sustancias tóxicas en cantidades tales que afectan la salud humana en forma aguda o crónica. En la actualidad se reconocen más de 250 ETA y las mismas se clasifican según el agente etiológico en **i) intoxicaciones alimentarias**, cuando son causadas por la ingestión de alimentos que contienen toxinas microbianas preformadas, productos químicos u otras sustancias abióticas, y en **ii) infecciones alimentarias**, cuando derivan del consumo de alimentos contaminados con agentes patógenos (parásitos, hongos, bacterias y/o virus). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETA, constituyen uno de los problemas de salud más relevantes tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Durruthy y col., 2018), siendo las más frecuentes aquellas ocasionadas por contaminación biológica. En los últimos años se registraron brotes ocasionados por patógenos emergentes y re-emergentes que pusieron de manifiesto la fragilidad de los programas de protección de alimentos para prevenir y controlar las ETA. Esto no solo significó un mayor riesgo para la población sino también un perjuicio para el comercio nacional e internacional de alimentos.

Los agentes causales más frecuentes son de origen bacteriano, entre ellos los géneros que pertenecen a la familia de las enterobacterias como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp. y *Escherichia coli* (*E. coli*), así como a especies Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, entre otros (Rojas-Herrera y González-Flores, 2006).

La aparición de estas enfermedades fue en incremento en los últimos años debido a factores como la modernización, la comercialización y la globalización de la industria alimentaria así también como a cambios demográficos y de hábitos alimenticios.

Las ETA pueden ser causadas por la falta de seguridad en cualquier etapa de la cadena productiva, por lo que resulta imprescindible implementar prácticas y sistemas que aseguren la producción de alimentos seguros en toda la cadena alimentaria, es decir, “desde el campo hasta la mesa” (Cortés-Sánchez y Salgado-Cruz, 2017).

Escherichia coli enterohemorrágico: un patógeno emergente

Los patógenos emergentes pueden definirse como agentes infecciosos que han aparecido recientemente en una población, o bien aquellos que ya son reconocidos pero cuya incidencia y/o rango geográfico se encuentran en rápido aumento, o bien tienen la probabilidad de aumentar en el futuro (Schlundt y col., 2004).

Entre los patógenos bacterianos considerados emergentes se destaca *Escherichia coli* productor de la toxina Shiga (STEC). STEC fue descrito por primera vez por Konowalchuk y col. en 1977, quien informó su capacidad de producir una toxina denominada Verotoxina, debido al efecto citotóxico en células Vero. Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O'Brien y col., 1982), por lo cual se la llamó “toxina tipo Shiga” (Stx).

Dentro del patotipo STEC, el subgrupo enterohemorrágico de *E. coli* (ECEH) se caracteriza por poseer factores de virulencia adicionales, y cuenta con más de 150 serotipos diferentes. Una característica fundamental que se encuentra en las cepas de ECEH, pero que no es exclusiva de estos organismos, es la capacidad de causar lesiones de adherencia/borrado (A/E del inglés “Attachment and Effacement”) en el epitelio intestinal humano (Branchu y col., 2014). Algunos de los genes cuyos productos están involucrados en la producción de las lesiones de A/E se pueden utilizar, junto con la presencia de verocitotoxina, para identificar a ECEH. La clasificación en serotipos, mediante antígenos O (lipopolisacáridos somáticos), H

(flagelares) y K (capsulares), no es suficiente para la identificación de ECEH; también deben estar presentes factores de virulencia característicos de dichos organismos.

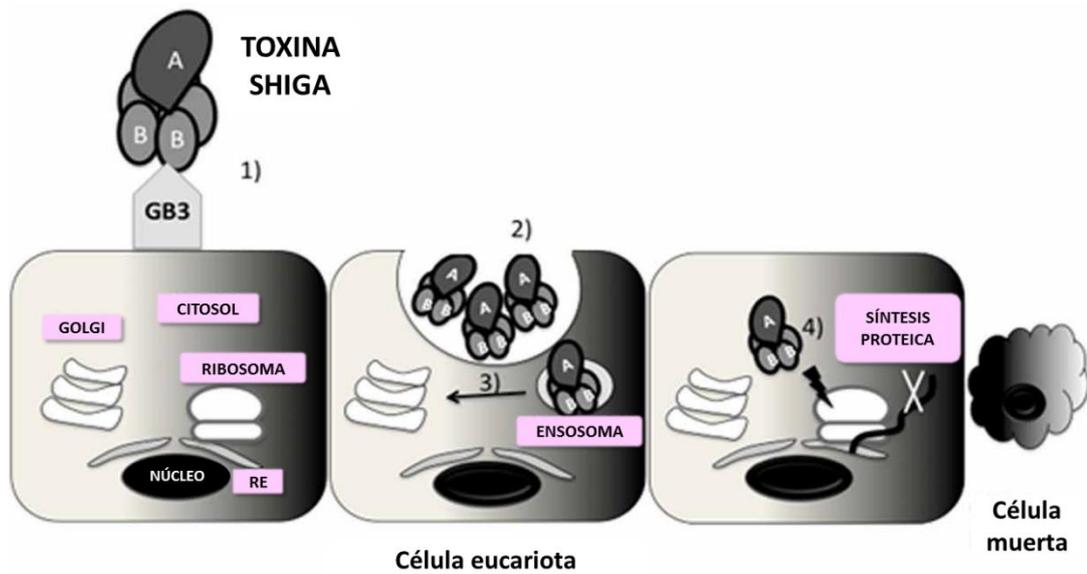
E. coli O157:H7 constituye el serotipo más frecuente, y por lo tanto el más estudiado, dentro de ECEH. Los miembros de otros serotipos pueden ser más heterogéneos, es decir, diferentes organismos pueden llevar distintos grupos de factores de virulencia. Sin embargo las cepas de *E. coli* O157:H7 son relativamente homogéneas, y cuentan con factores de virulencia bien caracterizados que pueden resumirse en tres grandes grupos de la siguiente manera (Figura 1.1):



Figura 1.1. Clasificación de los principales factores de virulencia de *E. coli* O157:H7.

- *Toxina Shiga (Stx)*: Stx fue descrita por primera vez en *Shigella dysenteriae* serotipo I por Kiyoshi Shiga y fue descubierta más tarde en ECEH (Sperandio y Pacheco, 2012), constituye una potente citotoxina capaz de inhibir la síntesis proteica e inducir apoptosis. Stx está constituida por una subunidad A enzimáticamente activa (A1) unida no covalentemente al pentámero de subunidades B de unión al receptor (B5) por lo que es una toxina AB₅. La subunidad B5 se une al receptor específico globotriosylceramida (Gb3) en la superficie de células eucariotas. Gb3 es expresado por las células de Paneth en la mucosa intestinal y por las células epiteliales renales (Tarr y col., 2005). Stx ingresa a la circulación sistémica a través de la absorción por el epitelio, permitiendo así su acceso a los riñones. El daño del epitelio gastrointestinal causado por ECEH probablemente ayuda en la absorción sistémica de Stx (Mukherjee y col., 2002). Tras la unión al receptor, Stx es endocitada por la célula eucariota (Römer y col., 2007) y allí, la subunidad A de Stx inhibe la síntesis de proteínas mediante la eliminación específica

de un único residuo de adenina del ARNr 28S de la subunidad ribosomal 60S (Figura 1.2).



Adaptado de Pacheco y Sperandio, 2012.

Figura 1.2. Mecanismo de acción de la toxina Shiga. Stx está constituido por un pentámero de subunidades B unidas a una subunidad A catalítica. Las subunidades B se unen a globotriaosilceramida (Gb3) expresada por algunas células eucarióticas (1). Stx se internaliza por endocitosis (2) y mediante transporte retrógrado llega a la red trans-Golgi (3) y luego al retículo endoplasmático rugoso (RE) (4). En el RE, Stx encuentra su objetivo, el ribosoma, inactivándolo (4). Como consecuencia, Stx inhibe la síntesis de proteínas y causa la muerte celular por apoptosis.

La familia Stx tiene dos principales grupos: Stx1 y Stx2. Aunque ambas comparten actividad enzimática y características estructurales, son inmunológicamente distintas, presentando solo el 55% de similitud en sus secuencias de aminoácidos (Fraser y col., 2004). Los aislados virulentos de *E. coli* O157: H7 pueden expresar solo Stx1, solo Stx2 o ambas toxinas, siendo Stx2 la de mayor toxicidad y asociado más comúnmente con infecciones humanas que las cepas Stx1.

En *E. coli* O157: H7 Stx está codificada por profagos (933W y 933J) (O'Brien y col., 1984) de la familia lambda que se encuentran integrados al cromosoma bacteriano en estado lisogénico (Johansen y col., 2001). La activación del ciclo lítico del fago lleva a la producción de Stx, la cual luego es liberada durante la lisis celular. El fago lambda permanece quiescente debido a la presencia de un represor que se encuentra inhibiendo la transcripción de los sitios promotores que regulan la expresión de los genes *stxA* y *stxB*. Para entrar en su ciclo lítico, el bacteriófago aprovecha la activación de la respuesta SOS (Graham, 1996) de la célula bacteriana. Al desencadenarse la respuesta SOS, se produce y activa RecA, una

proteína que promueve el clivaje del represor llevando a la expresión de genes fágicos, incluyendo stxAB. Finalmente se produce la lisis bacteriana liberándose Stx al medio ambiente. Múltiples señales ambientales regulan la expresión de Stx, entre ellas podemos destacar estrés por temperatura, fase de crecimiento, antibióticos, especies reactivas de oxígeno (ROS), señales de *quorum sensing*, concentración de hierro, etc. La expresión, regulación y mecanismo de acción de esta toxina es objeto de profundos estudios, ya que el conocimiento de este sistema permitirá el desarrollo de nuevas estrategias para contrarrestar su efecto y prevenir enfermedades (Sperandio y Pacheco, 2012).

- Isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement): *E. coli* O157: H7 coloniza la mucosa intestinal e induce la lesión histopatológica A/E característica. Dicha lesión se caracteriza por la adherencia bacteriana a la membrana de la célula epitelial y eliminación de las microvellosidades de los enterocitos. Las bacterias adheridas estimulan la polimerización de actina y su acumulación debajo de la membrana de la célula huésped, lo que da como resultado la formación de un pedestal de unión (Caprioli y col., 2005). Los estudios genéticos han demostrado que los genes responsables de las lesiones A/E se encuentran confinados a una región particular o isla de patogenicidad, designada como el locus del borrado de enterocitos (LEE: *Locus of Enterocyte Effacement*). El LEE está compuesto de al menos 41 genes diferentes organizados en tres grupos principales; (i) un sistema de secreción tipo III (TTSS) que exporta moléculas efectoras; (ii) una proteína de adhesión llamada intimina y su receptor translocado, Tir, que se traslada a la membrana de la célula huésped mediante el TTSS; y (iii) varias proteínas efectoras secretadas mediante el TTSS, que son importantes en la modificación de la transducción de señales de la célula huésped durante la formación de lesiones A/E (Delahay y col., 2001).

- Plásmido O157 (pO157): *E. coli* O157: H7 contiene un plásmido no conjugativo altamente conservado, denominado pO157. El pO157 muestra una estructura dinámica e incluye diferentes elementos genéticos móviles, como transposones, profagos, secuencias de inserción (IS) y partes de otros plásmidos. Esto indica que el actual plásmido pO157 se formó mediante la integración de fragmentos de especies de orígenes evolutivamente diferentes, y por lo tanto los factores de virulencia en los diferentes segmentos de pO157 pueden ser de distintos orígenes. Treinta y cinco proteínas codificadas por el plásmido están probablemente

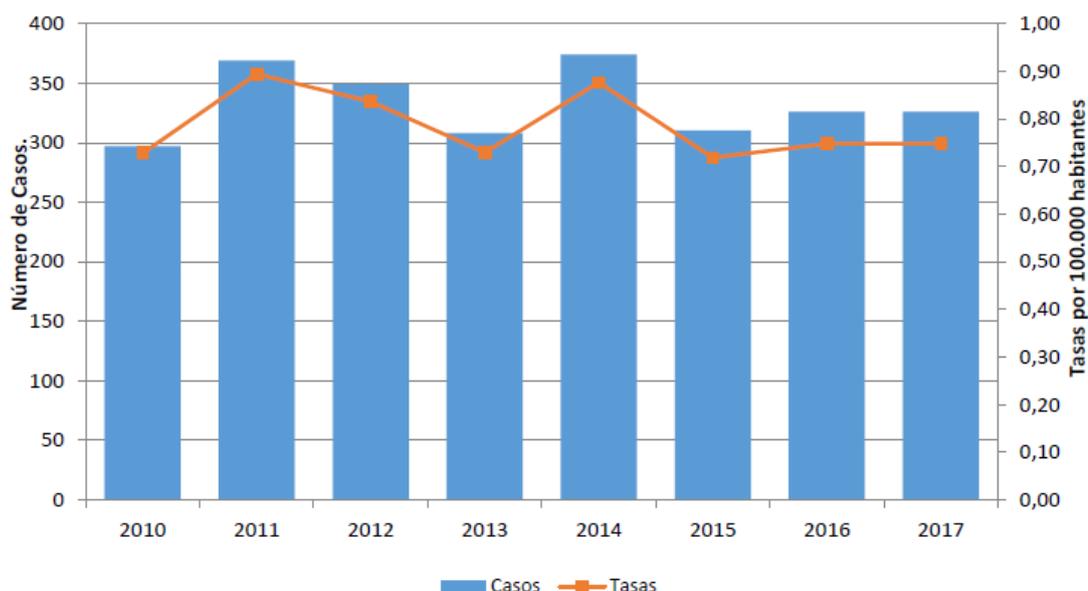
involucradas en la patogénesis de las infecciones por *E. coli* O157: H7, de las cuales solo 19 genes se han caracterizado previamente, entre ellos los que codifican para una hemolisina (*hlyA*), una catalasa-peroxidasa (*katP*), un sistema de secreción tipo II (*etp*), una serina proteasa (*espP*), una adhesina putativa (*toxB*), una metaloproteasa de zinc (*stcE*) y un fragmento conservado de *eae* (*ecf*). Sin embargo, la importancia biológica de la pO157 en la patogénesis no se comprende aún completamente (Lim y col., 2010).

Síndrome Urémico Hemolítico: Argentina encabezando las estadísticas

El 5-10% de los pacientes infectados con ECEH desarrollan síndrome urémico hemolítico (SUH). El SUH es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica, trombocitopenia (bajo recuento de plaquetas) y daño renal que se presenta generalmente a continuación de un episodio de diarrea con o sin sangre, principalmente en lactantes y niños en la primera infancia (Fernández-Brando y col., 2011). Además, puede afectar otros órganos como sistema nervioso central, pulmones, páncreas, corazón, y conducir a la muerte debido a complicaciones neurológicas, intestinales, cardíacas o a infecciones intercurrentes (Repetto, 2005).

Argentina presenta la mayor tasa de incidencia mundial de SUH en niños menores a 5 años de edad, constituyendo un problema crítico para la salud pública nacional. El SUH es la principal causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica, siendo además responsable del 20% de los trasplantes de riñón en niños y adolescentes en Argentina (Eymann y col., 2016).

El gráfico presentado en la Figura 1.3 fue confeccionado en base a datos del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS C2-SIVILA-UCSUH). Como puede observarse, durante el período comprendido entre los años 2010-2017, se registraron entre 300 y 360 casos de SUH por año, siendo 326 los casos notificados durante el último año (2017) de los cuales el 40,5% se presentó en niños de 2 a 4 años (Figura 1.3).



Fuente: Boletín Integrado de Vigilancia N° 395- SE 03 2018.

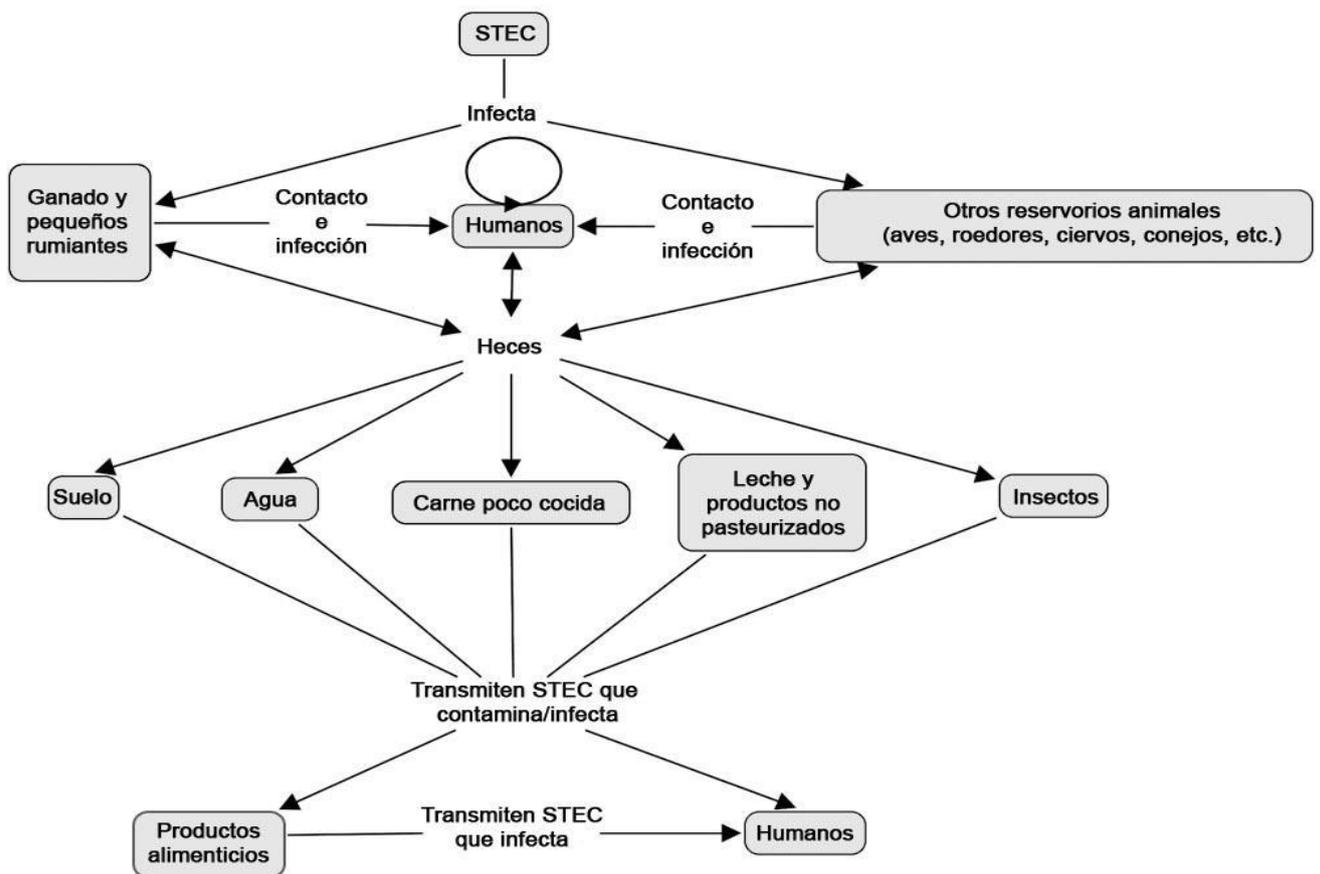
Figura 1.3. Casos y tasas (por 100.000 habitantes) notificados de SUH en Argentina en el período 2010-2017.

Las cepas de ECEH se encuentran altamente diseminadas en nuestro país, han sido aisladas en diferentes localidades. Estas cepas son capaces de sobrevivir, persistir a través del tiempo en diferentes nichos y diseminarse a distintos reservorios aumentando la probabilidad de transmisión a la población humana. El patógeno es de fácil transmisión por su baja dosis infectiva (10 a 100 bacterias por gramo de alimento) (Rivas y col., 2006b). Ocurre principalmente por vía fecal-oral, frecuentemente a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados, contacto directo con personas o animales infectados u objetos (García y col., 2010) (Figura 1.4). El reservorio natural más importante de ECEH incluye rumiantes y en particular el ganado bovino, con prevalencias muy variables pero que pueden alcanzar valores del 44%. También se han reportado infecciones en otros animales domésticos como ovejas, cabras, cerdos, búfalos, perros y gatos. La mayoría de los animales son portadores asintomáticos de ECEH. Además, ECEH tiene la capacidad de replicarse y sobrevivir prolongadamente en nichos ambientales, como ser fuentes de agua, y se ha postulado que la diseminación entre animales podría ocurrir a través de la transmisión por vectores, como moscas u otros insectos (García y col., 2010). Por otra parte, los individuos infectados resultan altamente contagiosos y la transmisión persona-persona podría tener un rol importante en la alta incidencia de SUH en nuestro país (Rivero y col., 2010).

La excreción de bacterias del serotipo O157:H7 por el ganado bovino y la prevalencia de contaminación de los productos derivados ocurre mayoritariamente

durante los meses cálidos, lo cual explicaría la mayor frecuencia de infección registrada durante esa época del año (Rivero y col., 2012).

Son numerosas las estrategias en estudio para combatir esta patología, muchas de ellas destinadas a bloquear la acción de Stx (Sperandio y Pacheco, 2012). Sin embargo, el único tratamiento disponible actualmente para los pacientes con SUH es de sostén a través del consumo de líquido y dieta blanda. El uso de drogas que inhiben la motilidad intestinal, o agentes anti-diarreicos que impiden la eliminación del patógeno están contraindicados así como también el tratamiento con antibióticos ya que su uso se ha asociado a la mayor probabilidad de desarrollo de SUH. Esto es debido a que aquellos antibióticos que dañan el DNA gatillan la respuesta SOS en ECEH y por lo tanto inducen la activación del ciclo lítico del fago codificador de la toxina Stx, generando por lo tanto mayor probabilidad de desarrollar SUH (Rivero y col., 2010; Fernández-Brando y col., 2011).



Fuente: Adaptado de García y col. 2010.

Figura 1.4. Mapa conceptual que ilustra las relaciones entre los factores involucrados en la transmisión de STEC.

La prevención es el camino: conservación de alimentos

Debido a la falta de tratamientos específicos para esta patología, actualmente la problemática es abordada principalmente desde un punto de vista preventivo. En este sentido, juegan un rol clave las estrategias aplicadas por la industria alimentaria para controlar la contaminación con el patógeno, específicamente por el sector cárnico industrial, quien también sufre el impacto de esta problemática, ya que constituye una de las principales causas de retiro de productos del mercado ocasionando grandes pérdidas económicas.

Es oportuno destacar que actualmente los consumidores asumieron un papel crucial en la cadena de consumo, exigiendo mayores estándares de calidad y seguridad alimentaria.

Por todo lo expuesto, se entiende que la presente situación constituye una seria amenaza para la salud pública y una gran preocupación para la sostenibilidad de la industria cárnica, así como para toda la cadena de producción, por lo que urge implementar estrategias efectivas de conservación para erradicar este patógeno.

La conservación de alimentos es un área ampliamente estudiada que fue perfeccionando sus estrategias utilizadas a través de los años. En términos generales, las distintas estrategias de conservación de alimentos implican someter a los microorganismos contaminantes y patógenos a un ambiente hostil, con el fin de inhibir su crecimiento, acortar su supervivencia o causar su muerte. Las distintas respuestas de los microorganismos a este ambiente adverso determinarán su sobrevivencia o muerte.

La tecnología de obstáculos, introducida por Leistner (1978) se basa en inhibir el crecimiento microbiano y en retardar o evitar las reacciones deteriorantes de alimentos combinando los efectos de varios factores de preservación, los que, utilizados en forma individual (como métodos de conservación), deben aplicarse a niveles extremos causando generalmente una alteración de las características físicas, químicas y/o sensoriales del alimento.

La estabilidad microbiológica y por lo tanto la inocuidad de la mayoría de los alimentos procesados (nuevos y tradicionales), está basada en la combinación de diversos factores (obstáculos). Estos obstáculos controlan el desarrollo microbiano previniéndolo, retardándolo y/o incluso inactivando a los microorganismos (Leistner, 1995). La tecnología de los obstáculos o factores combinados implica exponer a los microorganismos a un ambiente adverso y de esta manera inhibir su crecimiento al interferir, mediante la combinación de factores, con

su homeostasis. La homeostasis es la tendencia de los microorganismos a estabilizar su ambiente interno en respuesta a los factores externos. Si el equilibrio interno es modificado por los factores de preservación (actividad de agua, pH, temperatura, aditivos) utilizados en la formulación del alimento, los microorganismos dejarán de multiplicarse o lo harán a menor velocidad, canalizando su energía en reestablecer el equilibrio y en caso de no lograrlo incluso morirán. Los diversos obstáculos o factores de preservación tienen diferentes mecanismos de acción sobre los microorganismos; por lo tanto la estabilidad microbiológica puede lograrse con una inteligente combinación de los mismos (Leistner, 1995). El conocimiento de la influencia de cada uno de los obstáculos utilizados así como los efectos de la combinación de los mismos permitirá desarrollar procesos mínimos pero más efectivos para asegurar la estabilidad microbiológica de los alimentos.

Los principales agentes y/o condiciones utilizados como barreras u obstáculos para la conservación de alimentos son: la temperatura (alta o baja), la actividad del agua (a_w), la acidez (pH), el potencial redox (Eh), algunos aditivos químicos (por ejemplo, nitrito, sorbato, sulfito) y microorganismos competitivos (por ejemplo, microorganismos bioprotectores). Sin embargo, han sido descrito más de 60 obstáculos de uso potencial para conservación de alimentos (Leistner, 1999). La exposición de una población bacteriana a una sola intervención antimicrobiana, genera a menudo una respuesta heterogénea, dependiendo de la intensidad del tratamiento, así como muchos otros factores. Por el contrario, cuando se aplica una combinación de factores antimicrobianos, se producirán daños celulares múltiples, por lo que la célula incurre en costos de energía mucho más altos que llevan al agotamiento y muerte celular (Castellano y col., 2017). En este sentido, Leistner introdujo también el concepto de conservación multiobjetivo ("*multitarget*") de alimentos (Leistner, 1995), que consiste en el empleo de dosis menos drásticas de varios métodos de conservación que tendrían una mayor efectividad. Es decir, se podría lograr un efecto sinérgico si los obstáculos aplicados atacan simultáneamente diferentes objetivos (por ejemplo, membrana celular, material genético, sistemas enzimáticos, pH, a_w , Eh, etc) dentro de las células microbianas (Leistner, 1995), llevando a muy bajas probabilidades de supervivencia y proliferación de las células expuestas, lo que permitiría el uso de dosis de tratamiento más bajas en comparación con su aplicación individual. El concepto de conservación multiobjetivo atiende también a los aspectos de calidad alimentaria, ya que la intensidad de las técnicas de preservación individuales puede mantenerse comparativamente baja, minimizando la pérdida de calidad global, mientras que el

impacto en el crecimiento microbiano puede permanecer elevado, haciendo que los productos sean más aceptables que los obtenidos por métodos convencionales (Aguilera y Chirife, 1994).

En términos prácticos, esto significaría mayor efectividad al emplear diferentes obstáculos de pequeña intensidad que un factor conservador de mayor magnitud (Leistner, 1994), donde ningún obstáculo individual es único responsable de la inocuidad final del producto, por el contrario, ésta resulta del sinergismo obtenido por la combinación de los mismos (Aguilera y Chirife, 1994). El objetivo final es maximizar la actividad antimicrobiana, impidiendo la adaptación del patógeno, el desarrollo de resistencia o la protección cruzada al estrés aplicado (Sofos, 2008), sin afectar la calidad global del alimento. Sin embargo, esto solo podrá lograrse con éxito cuando se conozca totalmente la fisiología de los patógenos y los mecanismos de actividad antimicrobiana de diversos obstáculos.

Alimentos cárnicos: un sustrato ideal para el crecimiento microbiano

De acuerdo al *Codex Alimentarius*, se define como carne, a todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin. Cualquiera que sea la especie de mamífero, el tejido muscular esquelético está estructurado en tres niveles organizativos principales: células musculares (también llamadas fibras) agrupadas en fascículos, que se reagrupan para formar un músculo esquelético.

La composición química del músculo esquelético comprende aproximadamente un 75% de agua, 19% de proteínas, un bajo contenido de carbohidratos (0,5% - 1,2%), principalmente glucógeno y 2.5% de grasa. Además, el músculo contiene nitrógeno no proteico (aminoácidos, creatina, nucleósidos, vitaminas, etc.) y gran cantidad de compuestos inorgánicos (calcio, magnesio, potasio, sodio, hierro, etc.) que lo convierten en un excelente sustrato para el desarrollo de microorganismos (Fadda y col., 2012).

Las proteínas del músculo se dividen en tres grupos:

- **Proteínas miofibrilares:** conforman el aparato contráctil del músculo y son solubles en soluciones salinas concentradas. Las más abundantes son miosina y actina, que suponen el 65-70% del total. El resto son las proteínas tropomiosina y troponina, importantes para la contracción, y distintas proteínas del citoesqueleto.

- **Proteínas sarcoplásmicas:** solubles en agua o soluciones salinas diluidas, las cuales constituyen el 25-30% del contenido proteico total del tejido muscular. Se trata esencialmente de enzimas y mioglobina. Las enzimas necesarias para la glicólisis constituyen la mayor proporción de las proteínas sarcoplásmicas.
- **Proteínas insolubles del tejido conjuntivo y de los orgánulos:** el tejido conectivo que rodea las fibras musculares constituye la llamada matriz extracelular (MEC), la cual se divide en tres tipos según su ubicación con respecto a los niveles de organización musculares: (i) el endomisio, la capa más profunda en contacto con las fibras musculares, (ii) el perimisio que rodea a los fascículos, y (iii) el epimisio, la capa más externa en la superficie del músculo. Los tres tipos de MEC son muy similares y están compuestas por proteoglicanos y proteínas fibrosas, de las cuales el colágeno fibrilar I, III y IV son los componentes mayoritarios, mientras que difieren ligeramente en la proporción de laminina y elastina.

Aunque el músculo de los animales sanos se considera estéril, la carne proporciona un excelente ambiente para el crecimiento de microorganismos. Desde un punto de vista microbiológico, la propiedad más importante que presenta la carne es su elevado contenido en agua ($a_w \sim 0,99$), lo que permite el crecimiento de la mayor parte de microorganismos. Además, en condiciones naturales, la carne presenta un pH *post mortem* cercano a la neutralidad (6-6,5), muy próximo al pH óptimo de crecimiento para un gran número de microorganismos patógenos y causantes de alteración. Estas condiciones, sumado al bajo potencial redox y temperatura de almacenamiento, lleva a la selección de microorganismos capaces de desarrollarse en ella, clasificándose los mismos en: **i) Microorganismos de interés tecnológico**, los que conducen la fermentación de ciertos productos cárnicos ya que poseen un importante efecto sobre la calidad organoléptica del producto final (Fadda y col., 2012), **ii) Microorganismos deteriorantes**, capaces de alterar las propiedades organolépticas del alimento y **iii) Microorganismos patógenos**, causantes de infecciones alimentarias (ETAs), que generalmente no modifican la apariencia del alimento.

La industria cárnica constituye actualmente, y desde hace muchos años, uno de los pilares más sólidos en la economía Argentina, encontrándose nuestro país, entre los de mayor producción y exportación de carne bovina hacia mercados internacionales. Por ello, la posible contaminación de estos productos con

microorganismos patógenos no solo representa un potencial riesgo para la salud de los consumidores sino también para la sostenibilidad de este comercio local e internacional. Además, en los últimos 25 años, el mundo desarrollado ha experimentado un marcado cambio desde pequeños agricultores a operaciones de cultivo intensivo a gran escala. En tales operaciones existe un enorme potencial para la diseminación generalizada de patógenos zoonóticos, dando a un organismo emergente acceso a nuevos nichos o entornos.

Estrategias tecnológicas para controlar la calidad sanitaria de la carne

Los patógenos zoonóticos en la carne deben controlarse a través de un sistema completo y continuo conocido en la literatura como “de la granja a la mesa” (conocido en inglés como “*From Farm to Fork*”) que implica la aplicación de intervenciones en distintas fases de este sistema:

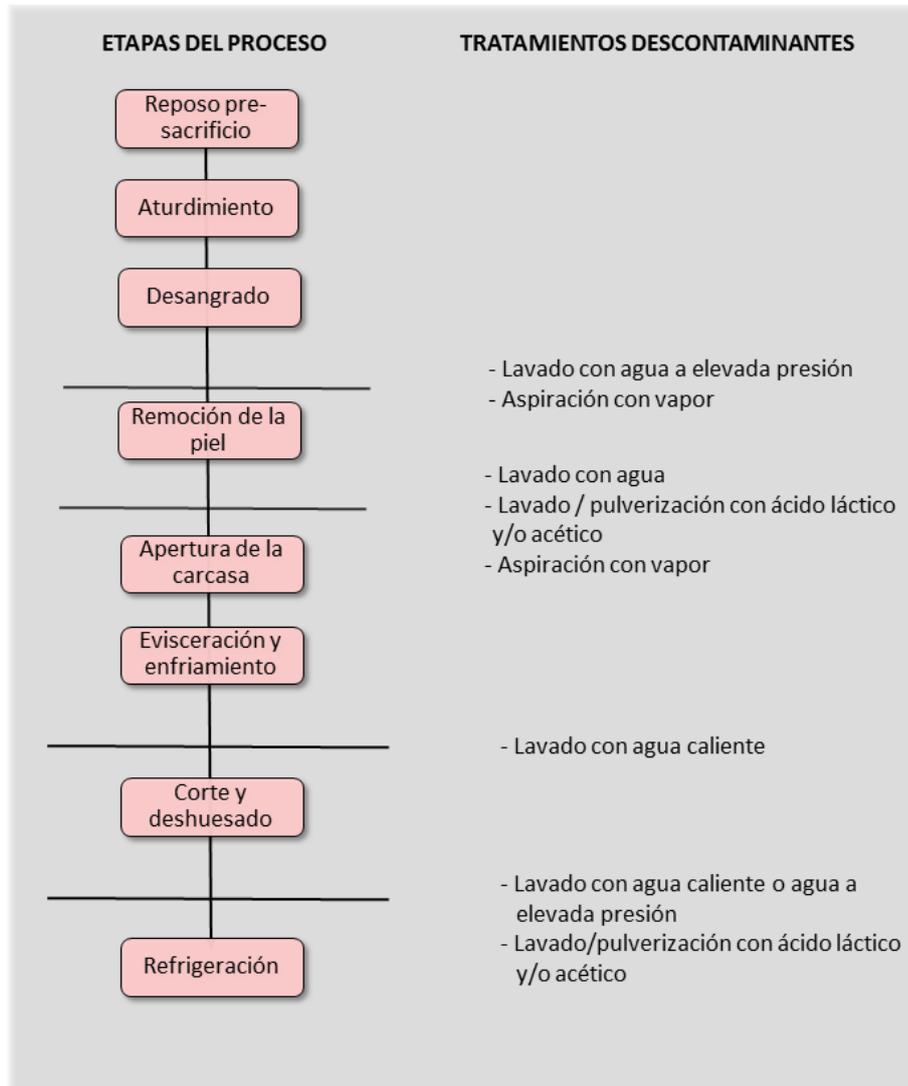
Fase de Precosecha: La aplicación de intervenciones antimicrobianas en el campo, durante la cría del ganado, previas al sacrificio evita la entrada de patógenos en la cadena alimentaria. El *estrés* animal es un factor importante que puede afectar la salud del animal por alteración del equilibrio de su microbiota intestinal normal, la cual proporciona una protección adicional contra la colonización con patógenos. Algunos factores estresantes aparecen “naturalmente”, por ejemplo, el parto y el destete, mientras que otros ocurren debido a la mala crianza de los animales, por ejemplo, vivienda inadecuada, cambios repentinos en la dieta y manejo rudo. Otro aspecto importante en la etapa de precosecha es la *cría intensiva* de animales, donde la convivencia muy próxima entre ellos resulta en una mayor transmisión horizontal de patógenos mediante aerosoles, contactos físicos frecuentes con superficies ambientales contaminadas, etc. Los bebederos de agua, utilizados por más de un animal y con falta de cloración, pueden servir también como fuente de infecciones y reinfecciones de los animales (Nørrung y Buncic, 2008). El *tratamiento del estiércol* (compostaje) es también un aspecto de gran importancia a tener en cuenta, ya que la propagación de estos residuos sin tratar para ser utilizado como fertilizantes en pastizales o tierras agrícolas, para la producción de cultivos, puede mediar infecciones o reinfecciones de animales a través del pastoreo contaminado, además de la posible contaminación de alimentos cosechados (Sofos, 2008).

Entre las intervenciones tecnológicas para evitar la contaminación de la carne durante la precosecha se puede mencionar la *manipulación de la dieta* de los animales mediante el uso de aditivos alimenticios o probióticos que pueden ser incorporados en la misma para lograr un efecto antagonista contra patógenos mediante la modificación de factores ambientales en el intestino, la producción de compuestos antimicrobianos o bien reducir la unión de patógenos a la mucosa intestinal. La *vacunación* de animales puede ser también una estrategia eficiente para la reducción de patógenos en esta etapa, por lo cual es actualmente un área de intensos estudios. Por ejemplo, en el Reino Unido la vacunación de aves contra *Salmonella* contribuyó a una reducción significativa del patógeno en la carne de aves (EFSA, 2004). Cabe destacar los avances obtenidos actualmente en el desarrollo de vacunas contra ECEH de aplicación animal dirigidas a disminuir su propagación en estos hospedadores y en el medio ambiente, y por ende en los seres humanos (Saeedi y col., 2017). Se han empleado diversos enfoques de vacunas, incluidas proteínas recombinantes, células avirulentas de *E. coli* O157:H7, bacterias vivas atenuadas que expresan proteínas recombinantes, proteínas fimbriales recombinantes, etc. (Saeedi y col., 2017). Además de las vacunas basadas en proteínas, las vacunas de ADN estudiadas mostraron resultados prometedores en un modelo animal de laboratorio (Mehr y col., 2012). Hasta ahora, dos vacunas para ganado han recibido licencias condicionales y se han probado en ensayos de campo: *Epitopix* basada en tecnología SRP (del inglés "*Siderophore Receptor and Porin*"), receptor de sideróforo y proteínas porina que proporcionan los requisitos de hierro de las bacterias patógenas; y *Echoniche*, basada en proteínas asociadas al sistema de secreción tipo III (Thomson y col., 2009; Rich y col., 2010).

Fase de cosecha: esta fase comprende desde el momento del sacrificio animal hasta su distribución al comercio minorista. La contaminación de las canales (cuerpo del animal luego de la matanza) en el momento del sacrificio puede ocurrir de dos maneras: a través de animales vivos previamente infectados y/o contaminación cruzada de la canal en el entorno del sacrificio, siendo las principales fuentes de contaminación las heces, piel, pelo y el contenido intestinal de los animales. Previo al sacrificio, el ganado es mantenido en reposo con el objetivo de evitar cualquier situación de estrés para el animal. Posteriormente, el sacrificio o faena se inicia con el aturdimiento, cuya finalidad es insensibilizar al animal y evitar así el sufrimiento del mismo además de lograr su inmovilización para facilitar el corte de vasos sanguíneos en la posterior etapa de desangrado. Una vez concluido el sacrificio, la descontaminación inicial de la canal implica la aplicación secuencial

de la limpieza con agua de la piel, la aspiración con vapor de manchas de la canal visiblemente sucias y finalmente la remoción de la piel del animal. Durante este proceso es esencial evitar el contacto de la piel con la parte interna estéril de la canal, así como también llevar a cabo la permanente esterilización de cuchillas utilizadas. Posteriormente se lleva a cabo la limpieza de la canal previa a la evisceración, la apertura y evisceración propiamente dicha, la limpieza final de la canal por pulverización con agua, y enfriamiento de canales evisceradas (Sofos, 2008). En el año 2013, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) convalidó en el Reglamento (UE) 101/2013 el uso de ácido láctico para la descontaminación de superficies de reses y carne bovina. En Argentina, el SENASA, en base a dicho reglamento, decidió aceptar el empleo de ácidos orgánicos en los frigoríficos, modificando el Decreto 4.238/68. Además la Comisión Europea (CE) aprobó en 2013 el uso del ácido láctico para reducir la contaminación microbiológica en la superficie de canales de bovinos aplicado mediante pulverización o nebulización, en concentraciones comprendidas entre el 2% y el 5% de ácido láctico en agua potable (Lezzi y col., 2016). De hecho, la acción combinada de la pulverización de ácidos láctico y acético así como de NaOH ha sido exitosa en la reducción de *Salmonella* y en particular el nivel de *E. coli* O157: H7 en cueros y carcasas (Carlson y col., 2008).

Dado que la temperatura es el factor más importante que afecta a la microbiota de la carne, el enfriamiento de las canales es la primera y una de las barreras más importantes, luego de las intervenciones de limpieza y evisceración, que se aplican rutinariamente para controlar el crecimiento de las bacterias deteriorantes y patógenas (Barco y col., 2015). Después de enfriar, las canales se cortan en diferentes partes. Las operaciones de corte y deshuesado de carne implican una manipulación y manejo relativamente intensivos de la carne, lo que aumenta notablemente el riesgo de contaminación cruzada a través de manos y utensilios (cuchillos, sierras, transportadores, etc.) así como también la transferencia de bacterias desde la superficie de la carne a las partes internas. Luego del corte y deshuesado, las canales son nuevamente lavadas con agua caliente y pulverizadas con ácido láctico y / o acético. En la siguiente Figura 1.5 se encuentran resumidas las principales etapas del proceso de faena y sus tratamientos descontaminantes aplicados.



Fuente: adaptado de L. Barco y col., 2015.
Figura 1.5. Diagrama de flujo resumiendo las etapas de la línea de sacrificio de carne de res y sus respectivos tratamientos de descontaminación.

Este complejo proceso, al cual son sometidas las canales en el matadero, se encuentra controlado bajo el sistema de gestión de higiene de procesos obligatorio, basado en los planes de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (HACCP) (Bolton y col., 2001). Para la verificación de la efectividad del sistema basado en HACCP en mataderos, comúnmente se utilizan pruebas microbiológicas de canales. El Código Alimentario Argentino (CAA) establece como criterio que la carne picada y alimentos a base de carne picada vacuna, porcina y de aves listos y no listos para su consumo, deben hallarse libres de *Salmonella* spp. y de *Escherichia coli* O157:H7/NM. La determinación para estos microorganismos es ausencia/presencia (criterio obligatorio), mientras que el recuento de aerobios mesófilos, de *Escherichia coli*, de coliformes y de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, funcionan como

parámetros de evaluación del proceso tecnológico utilizado (criterio complementario).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos e intervenciones aplicadas en cada etapa del proceso de producción de la carne, evitar la contaminación de la canal con patógenos entéricos resulta una tarea aún muy difícil. Por ello, actualmente son numerosas las estrategias bajo estudio que intentan limitar el ingreso en la cadena productiva o bien lograr la inactivación de *E. coli* O157:H7 en la carne durante esta etapa de cosecha.

Entre ellas podemos nombrar tecnologías físicas de conservación, como el procesamiento a altas presiones hidrostáticas (HPP) (Masana y col., 2015), el almacenamiento bajo vacío, la irradiación, campos eléctrico pulsantes, etc. Por otro lado, diversos tratamientos químicos son actualmente muy estudiados para la descontaminación de las carcasas. Además de los ácidos orgánicos, muchos otros productos químicos han sido evaluados, como el fosfato trisódico, que fue utilizado en Estados Unidos para la descontaminación de las canales de pollo, siendo éste considerado un producto GRAS (Kassem y col., 2017). También se estudió la utilización del dióxido de cloro (CDO) (≥ 100 ppm) para controlar *E. coli* en cortes de carne, demostrando ser efectivo en la reducción del patógeno y actuando de forma sinérgica con el almacenamiento refrigerado (Visvalingam y Holley, 2018). Además de los distintos productos químicos, se evalúan también diversas estrategias de aplicación para optimizar su efecto. Así, Kassem y col. (2017) estudiaron el tratamiento mediante un sistema de inmersión con fosfato trisódico 10%, ácido láctico 3% y decanoato de sodio 3%, demostrando ser una intervención efectiva para reducir las bacterias patógenas sin afectar el color de la carne. En nuestro país, Signorini y col. (2018), evaluaron el efecto antimicrobiano de nueve intervenciones diferentes contra ECEH en carcasas de res en mataderos comerciales. Las mismas incluyeron diversos productos químicos (ácido cítrico, acético y láctico, agua caliente, ácido hipocloroso generado electrolíticamente y la combinación de ácido peroxiacético, octanoico, acético, peróxido de hidrógeno, peroxioctanoico) utilizados en distintas concentraciones y aplicados de forma manual o automatizada. Los autores concluyen que la descontaminación de las canales de res mediante la aplicación automatizada de ácido láctico 2% y agua caliente reduce la contaminación por ECEH, y que la efectividad de las intervenciones mejoró utilizando el procedimiento automatizado ya que garantizaba la aplicación homogénea del producto en volúmenes adecuados.

Fase poscosecha: esta etapa involucra el procesamiento y manipulación del alimento desde el comercio minorista hasta su consumo. Los principales factores de riesgo en esta etapa incluyen en primer lugar la contaminación cruzada de alimentos crudos hacia alimentos cocinados a través de vehículos como manos contaminadas, tablas de cortar, cuchillos y diferentes utensilios de uso doméstico, así como también la conservación simultánea de alimentos crudos (contaminados) y cocidos en heladeras. Otra fuente importante de contaminación es la refrigeración inadecuada de alimentos y sobre todo la cocción insuficiente de los mismos, así como también la recontaminación posterior a la cocción. En esta etapa poscosecha, la prevención de la contaminación se encuentra directamente relacionada con la aplicación de prácticas higiénicas durante la preparación de alimentos así como también la implementación de campañas preventivas y de concientización de la población en general.

Bioprotección: una alternativa natural

La investigación sobre el control biológico de bacterias patógenas a través de la cadena alimenticia de la carne ha proporcionado una amplia gama de opciones de tratamiento basadas en diferentes intervenciones antimicrobianas que involucran una combinación de obstáculos para la proliferación microbiana. En este sentido la preservación biológica o bioprotección, para garantizar la calidad higiénica de los alimentos, se ha convertido en una herramienta prometedora, la cual sería aplicada en la etapa de cosecha.

Se denomina bioprotección a la **utilización de microorganismos antagonistas o sus productos metabólicos para controlar organismos indeseables (patógenos y contaminantes) con el fin de prolongar la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos, sin alterar las características sensoriales del producto final** (Jordan y col., 2014).

En este contexto, las bacterias lácticas (BL) tienen un papel central, siendo de gran interés tecnológico debido a su conocido potencial inhibitorio sobre microorganismos deteriorantes y patógenos de los alimentos. La utilización y aceptación de BL, como agentes bioprotectores, se fue consolidando entre los consumidores durante los últimos años. De hecho, hoy los consumidores exigen alimentos mínimamente procesados y sin agregados químicos, por lo que los

métodos de conservación natural son actualmente mejor aceptados en comparación con tratamientos físicos o químicos. En este sentido, las BL recibieron el estatus GRAS (del inglés *Generally Recognized As Safe*) lo que implica un reconocimiento general de seguridad para el uso en alimentos además de su presencia natural en materias primas y alimentos fermentados (Wessels y col., 2004). Por ejemplo, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum* representan las poblaciones más importantes asociadas con carne refrigerada envasada al vacío y productos cárnicos fermentados (Castellano y col., 2010).

El conocido antagonismo de las BL hacia otros microorganismos se debe a la competencia directa por nutrientes y/o la producción de diferentes metabolitos antimicrobianos, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Woraprayote y col., 2016). En particular, al producir ácido láctico y por lo tanto reducir el pH, las BL inhiben el crecimiento de patógenos bacterianos e incluso, en algunos casos, producen su muerte (Atassi y Servin, 2010). Además, algunas BL producen bacteriocinas, péptidos de síntesis ribosomal con actividad antimicrobiana hacia microorganismos relacionados filogenéticamente, desempeñando un papel importante en la conservación de alimentos. Algunos tipos de bacteriocinas de BL son específicamente activas contra microorganismos Gram positivos causantes de deterioro y/o patógenos tales como *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria monocytogenes* (Woraprayote y col., 2016). Sin embargo, se sabe que la mayoría de las bacteriocinas de BL no son efectivas contra microorganismos Gram negativos tales como ECEH. Aunque, en algunos casos, las bacteriocinas podrían ser activas en asociación con agentes tales como EDTA o ácidos orgánicos, que afecten la integridad de la membrana de los microorganismos Gram negativos (Belfiore y col., 2007; Prudêncio y col., 2015). Aunque el conocimiento sobre los péptidos antimicrobianos de cepas lácticas, ha aumentado exponencialmente durante los últimos 30 años, su aplicación en alimentos no ha tenido el mismo éxito. La legislación restrictiva relativa a los aditivos alimentarios, el espectro de inhibición limitado y los efectos de los componentes de los alimentos sobre la eficiencia podrían explicar la falta de aplicaciones industriales de bacteriocinas. Nisina es la única bacteriocina aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) para su uso en más de 50 países (Castellano y col., 2017). Por ello, la introducción de bacteriocinas en la matriz alimentaria mediante la producción *in situ* utilizando cultivos bioprotectores, constituye un enfoque alternativo factible.

Herramientas de vanguardia: la era de las ciencias «OMICAS»

En los últimos años los avances tecnológicos han posibilitado explorar sin límites la biología y posicionarla como una ciencia de la información. Si bien antes del desarrollo de la genómica los científicos centraron sus investigaciones en grupos únicos o pequeños de genes o proteínas, las nuevas tecnologías surgidas en la era posgenómica plantean una visión global de los procesos biológicos, que se ve reflejada en el desarrollo de lo que se ha denominado como «La era ómica». El sufijo «-oma» tiene origen latino y significa «conjunto de». Las “ciencias ómicas” tiene por objeto el estudio de conjuntos biomoleculares particulares (ADN, ARN, proteínas o metabolitos secundarios) analizados mediante procedimientos de alto rendimiento. Es por ello que, la adición de este sufijo a diferentes estudios en biología, hace referencia a las aproximaciones masivas en las que se está enfocando la biología recientemente.

En este sentido, la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, entre otras disciplinas ómicas, conforman líneas de estudio imprescindibles que han logrado avances extraordinarios en los campos de la salud, la biotecnología, la ecología y la industria de los alimentos. La cantidad de información obtenida con estas técnicas es tal, que sobrepasa el discernimiento humano, y por ello se valen de potentes técnicas estadísticas e informáticas para alcanzar la interpretación de los datos obtenidos, es decir, la bioinformática se convierte en una herramienta imprescindible detrás del desarrollo de cualquier ciencia ómica y necesaria para la integración de las mismas, constituyendo un desarrollo clave de la era posgenómica (Liebler, 2002).

El campo de la proteómica ayuda a establecer la conexión entre las secuencias del genoma y su comportamiento biológico, y puede definirse como el análisis del complemento proteico completo del genoma expresado en una célula o en cualquier muestra biológica en un momento dado bajo condiciones específicas (Champomier-Vergès y col., 2010). Dado que el genoma de un organismo es casi completamente estático mientras que el proteoma es altamente dinámico, la analogía de genoma y proteoma es solo superficial. El proteoma varía ya que no todas las proteínas se expresan al mismo tiempo ni en iguales cantidades; ocurriendo también modificaciones postraduccionales. Además diferentes tipos de células en organismos multicelulares expresan conjuntos especializados de proteínas, es decir,

es probable que un genoma dado pueda dar lugar a un número infinito de proteomas (Champomier-Vergès y col., 2010).

Dentro del campo de esta disciplina, la proteómica diferencial tiene por objeto evaluar la expresión diferencial de las proteínas en una célula en diferentes condiciones (Graham y col., 2007). Ésta área demostró ser útil para evaluar cambios en los niveles de expresión de las proteínas expresadas por un organismo bajo determinadas condiciones de crecimiento (Lilley y col., 2002; De Angelis y col., 2016). La expresión de las diferentes proteínas es un reflejo del medioambiente en el que se encuentra el organismo. La proteómica aplicada a los microorganismos, ya sea en condiciones de laboratorio o en nichos similares a los alimentarios, contribuye a una mejor comprensión de las estrategias y/o mecanismos de adaptación microbiana y a la reconstrucción de vías metabólicas que permitirán seleccionar cultivos funcionales con capacidades optimizadas. De manera que la aplicación de esta tecnología, así como la combinación de otros enfoques "ómicos", constituye una herramienta de gran utilidad para la mejora de los alimentos ya existentes, o para el desarrollo de nuevos alimentos, permitiendo profundizar el conocimiento acerca de la capacidad de los cultivos microbianos seleccionados para competir y producir metabolitos de interés tecnológico o para la salud.

El desarrollo de la proteómica ha sido facilitado por los avances alcanzados en los métodos de separación de proteínas, la espectrometría de masa (MS, del inglés *Mass Spectrometry*), la secuenciación y anotación de los genomas, y los algoritmos de búsqueda de proteínas (Thelen, 2007). En la década del 90, la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (E2D) seguida de la identificación por espectrometría de masa eran las técnicas predilectas para el estudio de los cientos de proteínas expresadas en un organismo y en una determinada condición (Gil y Monteloliva, 2014). No obstante, aún hoy, la E2D es una técnica muy utilizada por su gran versatilidad (buena resolución, capacidad de separar proteínas de muestras complejas, reproducibilidad, carácter cuantitativo, entre otras). Sin embargo, los métodos modernos en el área de la proteómica han evolucionado desde las técnicas dependientes de geles a las técnicas libres de geles conocidas como proteómica "shotgun". Esta última emplea sistemas nano-HPLC en conjunto con espectrómetros de masa de alta resolución que posibilitan la caracterización proteica a gran escala con un alto rendimiento (Yang y col., 2015; Semanjski y Macek, 2016), obteniendo información no accesible mediante el uso de técnicas de separación basada en geles.

Problemática y relevancia del estudio

Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH) es un patógeno alimentario, transmitido principalmente a través de productos cárnicos y causante del Síndrome Urémico Hemolítico, principal causa de insuficiencia renal aguda en niños en Argentina, siendo a nivel mundial, el país con mayor incidencia de esta patología. Por ello, ECEH constituye una gran preocupación para la sostenibilidad de la industria de la carne y una grave amenaza para la salud pública.

Por otra parte, las exigencias actuales de los consumidores por alimentos más seguros, naturales y menos elaborados son cada vez mayores.

Surge en este contexto la necesidad de aportar, desde el ámbito científico, soluciones inmediatas para limitar y prevenir riesgos futuros.

En este sentido, las bacterias lácticas reconocidas como organismos seguros (GRAS), capaces de producir distintos tipos de metabolitos antimicrobianos, entre ellos las llamadas bacteriocinas, constituyen una estrategia biológica para ser utilizadas como biopreservantes. De hecho, en el mercado actualmente están disponibles algunos cultivos bioprotectores, especialmente contra *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, no existen cultivos activos contra ECEH, ya que este patógeno es resistente a los péptidos antimicrobianos producidos por BL.

Hipótesis

Ciertas BL pueden controlar y/o inhibir el crecimiento de ECEH en la carne a través de la interacción directa o indirecta con el patógeno, posiblemente afectando su adhesión y/o anclaje a proteínas de la MEC. El estudio de esta interacción permitirá el desarrollo de un cultivo bioprotector activo contra ECEH y de uso seguro en alimentos, ya que no actuará como un agente inductor del bacteriófago W933 de ECEH, evitando así la producción y liberación de partículas virales y/o de toxina shiga en el alimento cárnico.

El empleo de nuevas tecnologías como la proteómica aplicadas al estudio de la expresión de genes/proteínas bacterianos involucrados en las interacciones celulares permitirán conocer los mecanismos involucrados en la acción antagónica de microorganismos beneficiosos como las BL sobre el patógeno.

Objetivo general

En el contexto planteado, se propone como objetivo general de esta tesis doctoral, la búsqueda de cepas de BL con acción inhibitoria sobre ECEH, estudiando la interacción entre ambos microorganismos a fin de comprender las bases moleculares involucradas en la acción antagonista. Se espera proporcionar a la industria cárnica bovina, una solución biotecnológica con base científica sólida para reducir la incidencia de ECEH basada en el uso de BL bioprotectoras.

Objetivos específicos

En base al objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

OEI: CARACTERIZAR MOLECULARMENTE *E. coli* NCTC 12900 Y SELECCIONAR BL CON POTENCIAL INHIBITORIO SOBRE EL PATÓGENO

- Caracterización de la cepa modelo a utilizar, *E. coli* O157:H7 NCTC12900: detección de genes relacionados a la virulencia mediante PCR
- Selección de BL de interés tecnológico con capacidad inhibitoria sobre ECEH:
 - Ensayos de inhibición en placa
 - Cocultivos (BL-ECEH) en Sistema Cárnico Modelo (SCM)

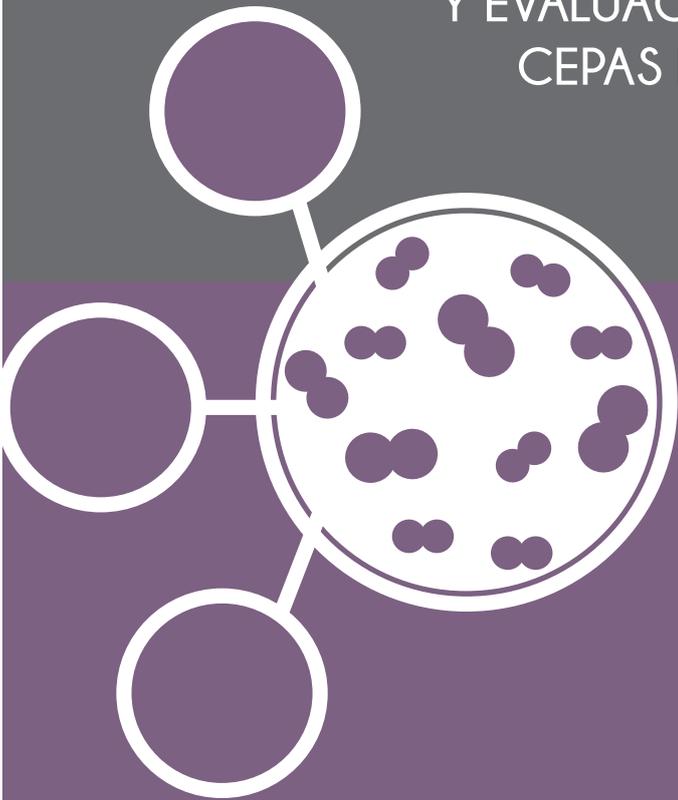
OEII: ESTUDIAR LA INTERACCION BL - ECEH *in vitro*

- Estudios proteómicos de la interacción BL - ECEH (análisis de expresión diferencial)
- Estudio de adhesión celular: ensayos de unión a Matriz Extracelular (MEC) (BL - ECEH)
- Efecto de BL sobre el bacteriófago W933 y su implicancia en la liberación de Stx por ECEH
- Evaluación de la actividad antilisteria de *Ent. mundtii* CRL35 durante el cocultivo con ECEH en ambiente cárnico

OEIII: ANALIZAR LAS INTERACCIONES MICROBIANAS EN AMBIENTE CÁRNICO

- Estudios fisiológicos en carne molida: pH y recuento bacteriano
- Estudios proteómicos en carne molida
- Evaluación de la actividad antilisteria de *Ent. mundtii* CRL35 en carne molida

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
E. coli O157:H7 NCTC12900
Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBIDOR DE
CEPAS LÁCTICAS PRESELECCIONADAS



CAPITULO

CAPÍTULO 2

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBIDOR DE CEPAS LÁCTICAS PRESELECCIONADAS

Introducción

La cepa NCTC12900 de *E. coli* O157:H7 es un aislado de origen natural caracterizado por no producir toxinas tipo Shiga. La misma se aisló en un laboratorio de salud pública de Austria durante 1992 y fue descrita anteriormente por Best y col. (2003). Con el fin de utilizarla como modelo seguro de estudio de cepas ECEH, en este trabajo de tesis se analizó en primer lugar sus características moleculares. Esto fue realizado mediante detección de genes claves de virulencia empleando la técnica de PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*, "Reacción en Cadena de la Polimerasa"). Luego se iniciaron los desafíos (ensayos de inhibición en placa y cocultivos en SCM) de dicha cepa con cada una de las tres cepas lácticas preseleccionadas por sus propiedades tecnológicas a fin de encontrar entre ellas la mejor alternativa bioprotectora con capacidad para combatir el patógeno en alimentos cárnicos.

Las bacterias lácticas empleadas para este estudio fueron: I) ***L. curvatus* CRL705**, aislado de embutidos artesanales argentinos, productor de dos tipos de bacteriocinas con probada eficiencia bioprotectora en alimentos cárnicos: lactocina 705 (capaz de inhibir *Brochothrix thermosphacta* y ciertas bacterias lácticas) y lactocina AL705 antilisteria (Castellano y col., 2003; Castellano y Vignolo, 2006), y cuyo genoma ha sido secuenciado parcialmente (Hebert y col., 2012). II) ***L. plantarum* CRL681** aislado de embutidos argentinos resulta de interés como potencial cultivo bioprotector por su alta capacidad acidogénica, efecto que sería esencial para la inhibición de ECEH; además de propiedades tecnológicas importantes tales como actividad peptidasa, degradación de aminas biogénicas *in vitro* y ausencia de actividad descarboxilasa de aminoácidos que impacta beneficiosamente en la seguridad de productos cárnicos (Fadda y col., 2010). III) ***Enterococcus mundtii* CRL35**, aislada de queso artesanal de Tafí del Valle, productora de una bacteriocina, enterocina CRL35, con actividad antagónica

frente a *Listeria monocytogenes* y con propiedades antivirales (Wachsman y col., 1999). Se ha secuenciado su genoma y se están analizando sus propiedades tecnológicas más relevantes (Bonacina y col., 2014).

Si bien esta cepa no fue aislada de un nicho cárnico, estudios previos acerca de su potencial tecnológico justifican su aplicación en este ecosistema (Orihuel y col., 2018).

Caracterización de factores de virulencia de la cepa modelo *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 mediante PCR

Resultados

Se evaluó la presencia de genes de virulencia claves de este patotipo (ver Tabla 6.2, Capítulo 6 Materiales y Métodos) mediante PCR, en dos cepas de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7: NCTC 12900, cepa en estudio y *E. coli* EDL 933, cepa toxigénica de referencia aislada de carne de hamburguesa, utilizada ésta última como control positivo. Los genes investigados fueron los siguientes:

- ***gadA* (glutamato descarboxilasa alfa)**: gen utilizado junto con genes de virulencia para detectar grupos patogénicos de *E. coli*.
- ***stx 1* (toxina shiga I)**: gen codificante de la toxina shiga I y presente en bacteriófago lisogénico.
- ***eaeA* (intimina)**: ubicado en la isla de patogenicidad LEE, codifica la principal adhesina participante de la lesión A/E ocasionada sobre enterocitos.
- ***hlyA* (hemolisina)**: codificada en el plásmido O157 y causante de lesiones extraintestinales.

Como se observa en la imagen del gel obtenido (Figura 2.1), los genes *gadA* y *eaeA* fueron amplificados en ambas cepas. En la cepa control *E. coli* EDL933 además fue amplificado el gen *stx 1*, mientras que, como se esperaba, éste estuvo ausente en *E. coli* NCTC 12900. Por otro lado, se observó que el gen que codifica para la hemolisina solo fue amplificado en la cepa *E. coli* NCTC 12900 (Tabla 2.1).

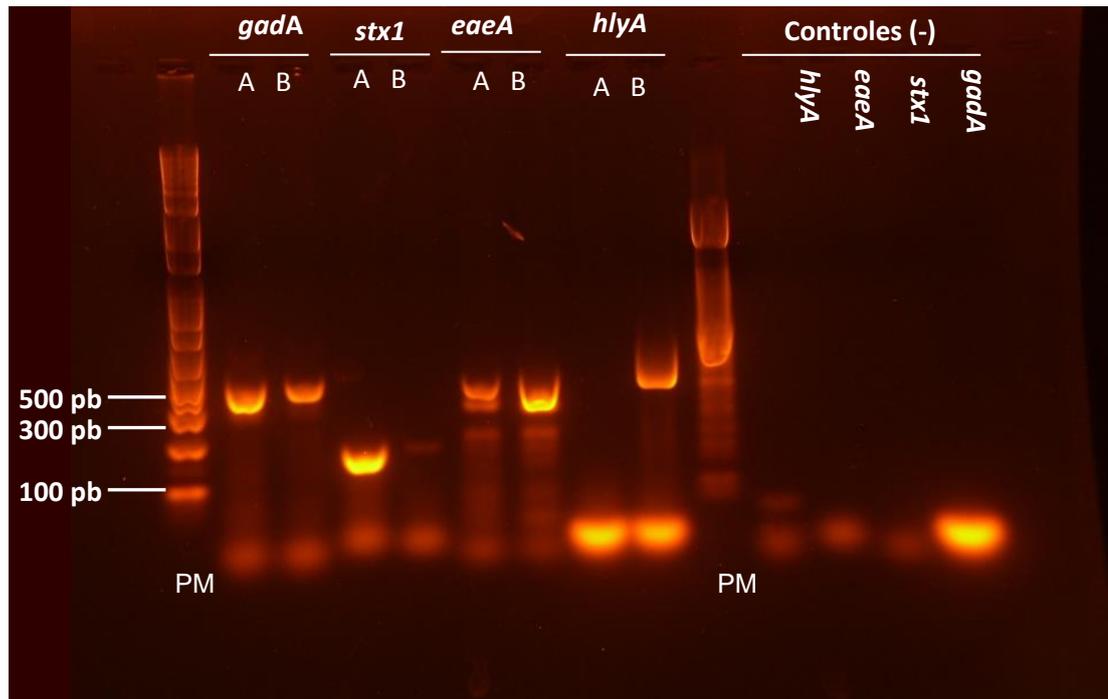


Figura 2.1. Fotografía del gel de agarosa. Se observan los fragmentos obtenidos luego de la amplificación por PCR. La identidad de cada banda se indica en la parte superior del gel, donde (A) corresponde a los productos de PCR obtenidos a partir del genoma de *E. coli* EDL933 y (B) a *E. coli* NCTC 12900.

Tabla 2.1. Presencia (+) o ausencia (-) de los genes amplificados por PCR en la cepa control (A) y de la cepa en estudio (B).

Gen	<i>E. coli</i> 933 (A)	<i>E. coli</i> NCTC 12900 (B)
<i>gadA</i>	+	+
<i>stx 1</i>	+	-
<i>eaeA</i>	+	+
<i>hlyA</i>	-	+

Los fragmentos de ADN obtenidos fueron secuenciados y las secuencias nucleotídicas obtenidas (ver sección Anexo Capítulo 2) se analizaron usando BLASTn (*The Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2.2. Resultados obtenidos tras el análisis mediante BLASTn de las secuencias nucleotídicas obtenidas.

MUESTRA ENVIADA	MUESTRA	PROTEÍNA IDENTIFICADA	ID	IDENTIDAD	MICROORGANISMO
Ec 933_gadA	M1_gadAFw	glutamato descarboxilasa alfa parcial	EKV723 40.1	99%	<i>E. coli</i> 88.1042
Ec 933_gadA	M1_gadARv	glutamato descarboxilasa alfa parcial	KGP416 88.1	100%	<i>E. coli</i>
Ec 12900_gadA	M2_gadAFw	glutamato descarboxilasa alfa parcial	EKV723 40.1	99%	<i>E. coli</i> 88.1042
Ec 12900_gadA	M2_gadARv	glutamato descarboxilasa alfa parcial	KGP08 080.1	99%	<i>E. coli</i>
Ec 933_Stx1	M3_stx1Fw	Verotoxina, parcial	AKL712 35.1	100%	<i>E. coli</i>
Ec 933_Stx1	M3_stx1Rv	Verotoxina, parcial	AKL712 35.1	100%	<i>E. coli</i>
Ec 12900_hlyA	M4_hlyAFw	nd*	-	-	-
Ec 12900_hlyA	M4_hlyARv	Hemolisina	WP_000 217735.1	99%	<i>E. coli</i>
Ec 933_eaeA	M6_eaeAFw	proteína de unión y borrado, parcial	AKL712 41.1	100%	<i>E. coli</i>
Ec 933_eaeA	M6_eaeARv	proteína de unión y borrado, parcial	AKL712 41.1	99%	<i>E. coli</i>
Ec 12900_eaeA	M7_eaeAFw	proteína de unión y borrado, parcial	AKL712 41.1	97%	<i>E. coli</i>
Ec 12900_eaeA	M7_eaeARv	proteína de unión y borrado, parcial	AKL712 41.1	99%	<i>E. coli</i>

*nd: no determinada. Este gen (*hlyA*) está presente en la cepa *E. coli* NCTC12900, sin embargo no se obtuvo con éxito la secuenciación del cebador *reverse*

Discusión

A través de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral se confirmó que *E. coli* NCTC12900 posee los genes de virulencia característicos del patotipo ECEH (*gadA*, *eaeA* y *hlyA*). Sin embargo, a pesar de ser una cepa patogénica, la ausencia del gen *stx1*, reafirma que se trata de una cepa de ECEH atoxigénica, lo cual la hace inocua para su manipulación. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ayaz y col. (2014) quienes realizaron una caracterización molecular de los principales genes de virulencia y adherencia de aislados de *E. coli*

O157:H7 de ganado bovino en Turquía y utilizaron NCTC12900 como control. Nuestros resultados permiten confirmar que la cepa *E. coli* NCTC12900 constituye un adecuado modelo de estudio de ECEH, siendo una mutante que cuenta con los genes de virulencia característicos del patotipo pero sin capacidad de producir y liberar la toxina tipo shiga, lo que permitió llevar a cabo los estudios propuestos, sin implicancias en bioseguridad.

A continuación, se utilizará la sigla “ECEH” para hacer referencia a la cepa *E. coli* NCTC12900.

Ensayos de inhibición en placa

Resultados

El ensayo de inhibición del crecimiento de ECEH se realizó como primer enfoque para determinar el potencial inhibidor de tres cepas lácticas preseleccionadas frente al patógeno. Mediante este método rápido y simple, detallado en Materiales y Métodos (Capítulo 6), se evaluó la capacidad inhibidora de cada cepa BL contra ECEH, así como la naturaleza del efecto inhibidor. Los resultados obtenidos demostraron que las tres cepas de BL estudiadas mostraron un patrón inhibitorio similar, ya que los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de ECEH obtenidos fueron similares (Figura 2.2). Se observó además que, en general se registraron halos de inhibición en aquellas condiciones en las que las células de BL permanecían viables sin ser dañadas (Figura 2.2, condiciones 1 y 4), mientras que cuando las células fueron tratadas con lisozima, se observaron halos de inhibición de menor diámetro (Figura 2.2, condición 3). Por el contrario, no se observó inhibición cuando se utilizó células lisadas o sobrenadante libre de células (no tratado, calentado o calentado y neutralizado) conteniendo metabolitos tales como ácidos orgánicos, bacteriocinas termoestables y diferentes factores solubles (Figura 2.2, condición 5, 6 y 7). Finalmente, la presencia de halos de tamaño casi imperceptibles cuando se utilizó solución de ácido láctico al 4% confirmó la conocida resistencia ácida de ECEH (Figura 2.2, condición 8).

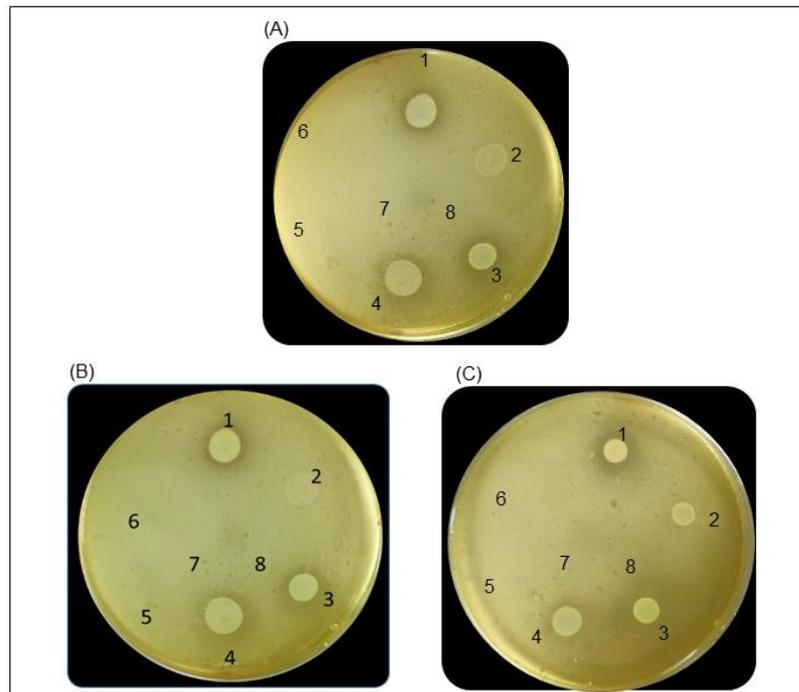


Figura 2.2. Inhibición del crecimiento celular de ECEH por las BL estudiadas: *L. curvatus* CRL 705 **(A)**, *Ent. mundtii* CRL35 **(B)** y *L. plantarum* CRL 681 **(C)**. Sobre un césped de ECEH se evaluaron diferentes condiciones de cada cepa láctica: 1- células intactas / viables, suspensión de BL en solución fisiológica; 2- células no viables, suspensión de LB en agua destilada calentada durante 15 minutos a 95°C; 3- suspensión de BL tratadas con lisozima (1 mg/ml); 4- cultivo activo de BL en medio MRS directo; 5- sobrenadante libre de células del cultivo de toda la noche calentado (5 min, 95°C); 6- sobrenadante libre de células del cultivo toda la noche calentado (5 min, 95°C) y neutralizado; 7- sobrenadante libre de células del cultivo de toda la noche intacto; 8 -solución de ácido láctico al 4%.

Discusión

Los resultados obtenidos a través de este ensayo, evidenciaron una actividad inhibidora variable de las cepas evaluadas, siendo dicho efecto independiente de la acción del ácido producido luego de la fermentación, de las bacteriocinas sintetizadas por cada una, o de algún metabolito soluble presente en el sobrenadante de cultivo ya que no mostró capacidad de inhibición (ausencia de halos) con ninguno de los tratamientos realizados al mismo (calentamiento y/o neutralización). En este sentido, el control de ácido láctico al 4% utilizado, presentó halos de inhibición casi imperceptibles, siendo la concentración utilizada ampliamente mayor a la habitualmente producida por las bacterias lácticas (0,5–2,5 g/l) (Boontim y col., 2018). Además, incluso siendo todas las cepas de BL capaces de acidificar el medio sarcoplásmico (como se describirá en el siguiente ensayo),

demonstraron una actividad inhibidora diferente hacia el patógeno. Esto confirmaría que el efecto observado no responde a la presencia de ácido producido por las cepas lácticas durante su crecimiento. Por su parte, ECEH tiene tres poderosos sistemas de resistencia al estrés ácido descritos; estos incluyen un sistema oxidativo inducido por ácido, un sistema dependiente de arginina inducido por ácido y un sistema dependiente de glutamato (Bearson y col., 2009). Estos tres sistemas de resistencia a ácidos tienen diferentes requisitos para su funcionamiento, lo que permite una superposición entre ellos, asegurando que al menos uno de ellos siempre estará activo para proteger la célula en un ambiente ácido (Bearson y col., 2009). Estas propiedades de ECEH están íntimamente relacionadas con las bajas dosis infecciosas registradas para este patógeno, ya que le permite atravesar la barrera de acidez gástrica asegurando que al menos un pequeño porcentaje de células pueda sobrevivir a la misma e infectar las células hospedadoras. Por lo tanto, su gran capacidad de resistencia a estrés ácido es un factor de virulencia de suma importancia y explica la ausencia de halos de inhibición al utilizar sobrenadantes de cultivo, observado en el ensayo realizado en este trabajo.

Sin embargo, Angmo y col. (2016) describieron que el bajo pH y la producción de ácido láctico fueron los principales factores para la inhibición del crecimiento de otra enterobacteria como *Yersinia enterocolitica* cuando estudiaron su inhibición en presencia de cepas de *Lactobacillus*. Estos resultados reflejan los diferentes niveles de tolerancia al estrés ácido entre distintas enterobacterias patógenas.

En cuanto a la inhibición de ECEH por acción de bacteriocinas de BL, se sabe que estos péptidos no actúan naturalmente sobre microorganismos Gram negativos a menos que su acción se combine con un tratamiento para permeabilizar la pared celular y permitir de esa manera la entrada de la bacteriocina a la célula (Castellano y col., 2011). Sin embargo, la efectividad de la bacteriocina internalizada dependerá del mecanismo de acción específico de cada péptido antimicrobiano. En este sentido, nuestros resultados muestran la ausencia de inhibición debido a las bacteriocinas producidas por *Ent. mundtii* CRL35 (enterocina CRL35) y *L. curvatus* CRL705 (lactocina 705) en las condiciones ensayadas.

Por otra parte, Cisneros y col. (2017) (comunicación personal) evaluaron mediante el ensayo de inhibición del crecimiento de ECEH en placa, el efecto del sobrenadante del cocultivo de una cepa láctica (con actividad anti ECEH) y ECEH, con el fin de evaluar si en presencia del patógeno, la BL expresaba algún factor soluble capaz de inhibir el crecimiento de mismo. La ausencia de halos inhibitorios

debido al sobrenadante del cocultivo, indicó que la convivencia con el patógeno no induciría en la cepa láctica la liberación de ningún compuesto soluble capaz de inhibir el crecimiento de cepas ECEH.

En base a esto y a nuestros resultados se sugiere que la acción antagonista de las cepas BL hacia ECEH involucra otros mecanismos, como ser la competencia por nutrientes, implicando una estrecha relación célula-célula donde el cultivo bioprotector debe preservar su vitalidad para hacer frente e inhibir a ECEH.

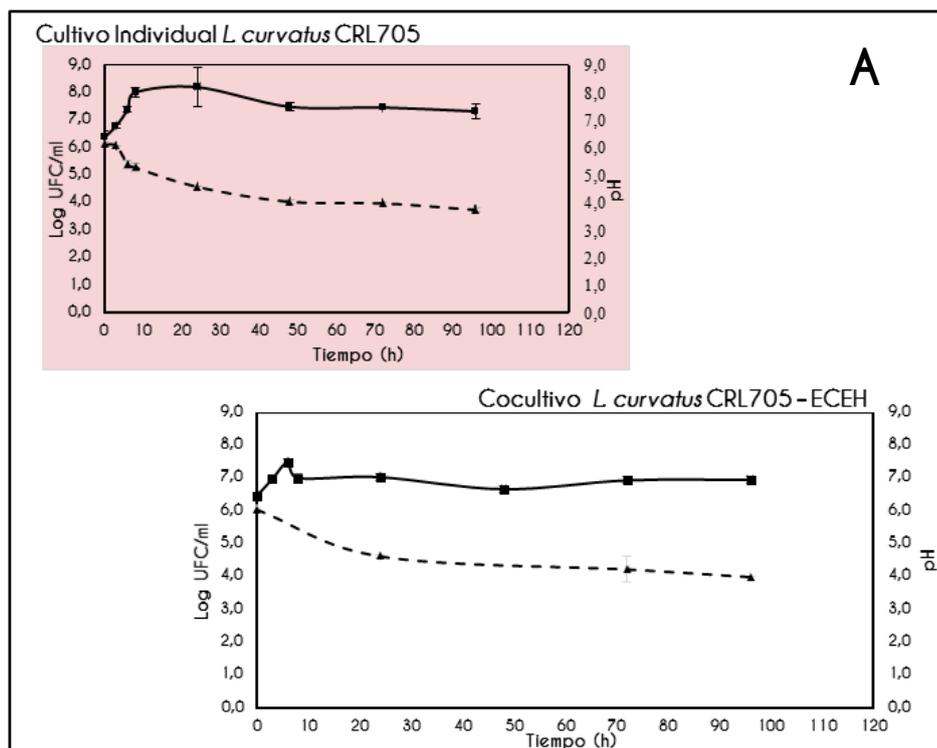
Desempeño de BL y ECEH en ambientes cárnicos

Resultados

Cuando se estudió el crecimiento individual y en cocultivo de las cepas lácticas y ECEH en un sistema cárnico modelo (SCM), se observó que las tres cepas de BL evaluadas lograron un máximo crecimiento individual aproximadamente a las 24-48 h, según la cepa (2.0×10^8 - 9.8×10^8 UFC/ml) (Figura 2.3). Es de destacar que las cepas lácticas alcanzaron su crecimiento exponencial luego de 3-8 h de incubación llegando a fase estacionaria aproximadamente a las 24 h (Figura 2.3). Posteriormente, estas cepas mantuvieron su viabilidad inicial hasta las 96 h de incubación alcanzando valores próximos a 1×10^6 CFU/ml (Figura 2.3). Por otro lado, se observó que todas las cepas de BL creciendo individualmente produjeron un descenso significativo del pH del medio, siendo las cepas CRL705 y CRL35 las que mostraron mayor disminución de dicho valor (Figura 2.3, A y B respectivamente). Cuando se inoculó ECEH de forma individual, se observó una cinética de crecimiento microbiano tradicional. Entre las 4 y 6 h alcanzó el crecimiento exponencial, llegando a fase estacionaria, con la máxima viabilidad celular, a las 24 h (1.8×10^8 UFC/ml) (Figura 2.4).

Cuando se analizó el crecimiento en cocultivo de cada BL con ECEH, se evidenció una cinética de crecimiento diferente para ambos microorganismos en comparación con su crecimiento individual en SCM (Figura 2.3). Se observó un crecimiento disminuido de las cepas de BL en presencia de ECEH, alcanzando 1-2 unidades logarítmicas menos de viabilidad celular que en la condición de cultivo simple, dependiendo de la cepa (Figura 2.3). Sin embargo, durante el cocultivo con ECEH, todas las BL pudieron mantener el estado estacionario hasta el final de la incubación, con una población similar al inicio del ensayo (10^6 - 10^7 UFC/ml) (Figura

2.3). Cabe destacar que el potencial acidificante de las cepas BL no se vio afectado por la presencia del patógeno, alcanzando valores similares a los observados en cultivos puros (pH final entre 4,5 y 3,7) (Figura 2.3). Además, el crecimiento del patógeno en cocultivo se vio afectado considerablemente por la presencia de BL, específicamente después de las primeras 8 h. Particularmente, *L. curvatus* CRL705, produjo una ligera disminución de la población de ECEH, aproximadamente 0,6 unidades logarítmicas (Figura 2.3A), mientras que las cepas *Ent. mundtii* CRL35 y *L. plantarum* CRL681, mostraron un mayor efecto inhibitor (Figura 2.3B y C, respectivamente). De hecho, su presencia produjo una reducción significativa de la viabilidad de ECEH después de 8 h de crecimiento, acelerando la entrada de ECEH en la fase de muerte. A las 96 h, se observó una disminución significativa de los recuentos de UFC de la cepa ECEH alcanzando valores entre 2 y 5 unidades logarítmicas de disminución en los cocultivos que contenían *Ent. mundtii* CRL35 y *L. plantarum* CRL681, respectivamente (Figura 2.3B y C).



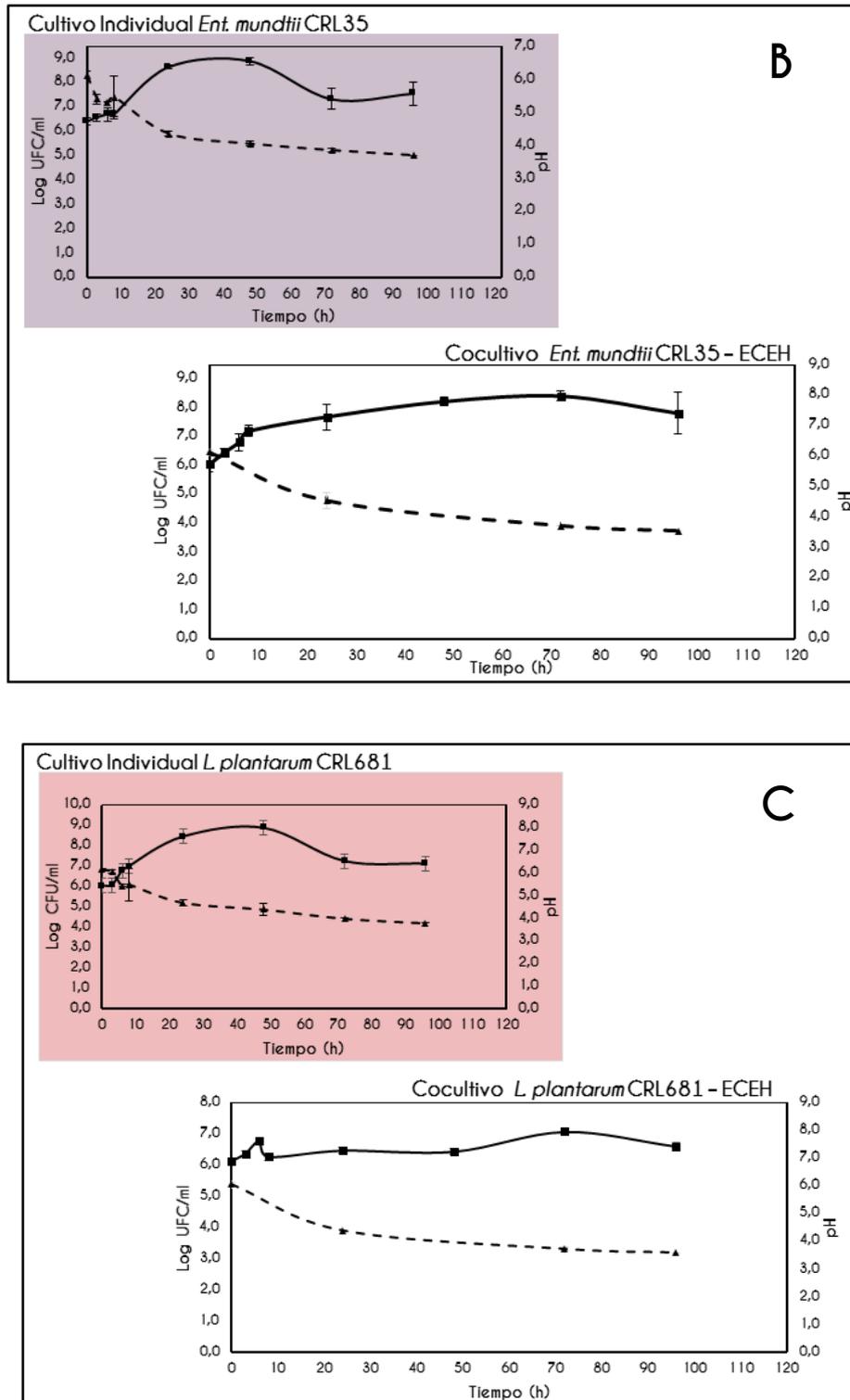


Figura 2.3. Crecimiento individual (panel superior) y crecimiento en cocultivo (panel inferior) de cada BL representado como Log de UFC/ml en SCM incubadas a 30 °C durante 96h. El valor de pH del medio determinado a lo largo del crecimiento en ambas condiciones se representa con línea negra discontinua. **(A)** Cultivo individual y cocultivo de *L. curvatus* CRL705, **(B)** Cultivo individual y cocultivo de *Ent. mundtii* CRL35, **(C)** Cultivo individual y cocultivo de *L. plantarum* CRL681.

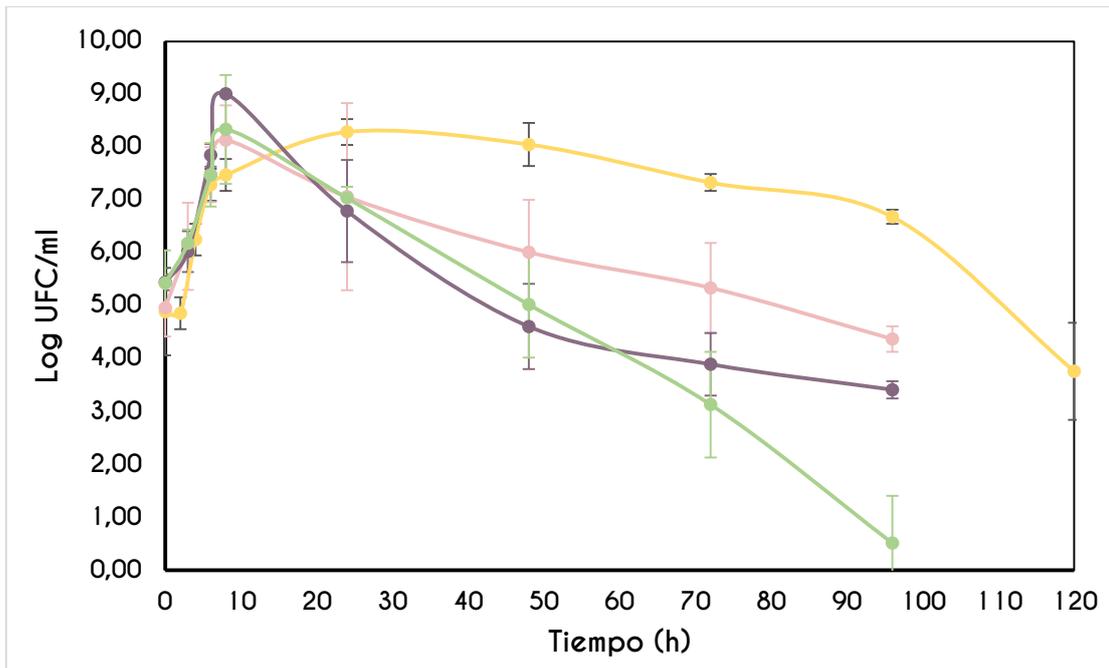


Figura 2.4. Crecimiento individual (línea amarilla) y crecimiento en cocultivo de ECEH con *L. curvatus* CRL705 (línea rosa), con *Ent. mundtii* CRL35 (línea violeta) y *L. plantarum*, CRL681 (línea verde) representado como Log UFC/ml en SCM a 30°C durante 96 h.

Discusión

Al analizar la cinética de crecimiento de los diferentes cocultivos BL-ECEH, se evidenció que las cepas BL evaluadas afectaron negativamente el crecimiento de ECEH en el ambiente cárnico, induciendo la entrada en fase de muerte del patógeno después de 8 h de incubación. En estos ensayos se evidenció un mayor potencial inhibitorio de *L. plantarum* CRL681 y *Ent. mundtii* CRL35, los cuales lograron una disminución significativa de los recuentos de ECEH a las 96 h.

En un trabajo similar, Rios-Covian y col. (2015) informaron un crecimiento retardado de *Bacillus fragilis* por la presencia de *Bifidobacterium longum* en cocultivo durante las primeras 14 h. Además, observaron un crecimiento mejorado de bifidobacterias en comparación con el monocultivo correspondiente. Al evaluar la influencia recíproca entre ambos microorganismos en cocultivo, nuestros resultados mostraron que ECEH afectó levemente la densidad celular máxima lograda por cada BL, comparado con la mayor influencia que tuvo la cepa láctica sobre el crecimiento del patógeno. Concretamente, *Ent. mundtii* CRL35 durante el cocultivo con ECEH, adelantó su entrada en la fase exponencial de crecimiento y experimentó la estabilización de la fase estacionaria con una ligera disminución de la viabilidad

después de 40 h en comparación con su crecimiento individual. Yang y col. (2017) al estudiar la coincubación de *Bifidobacterium bifidum* con *Listeria monocytogenes*, también informaron la entrada temprana en fase de crecimiento logarítmico, lo que sugiere un efecto promotor del crecimiento mutuo durante el cocultivo. Nuestros resultados no muestran un efecto de mutua promoción del crecimiento sino por el contrario una concreta inhibición del patógeno y una fase estacionaria más estable de la BL que durante su cultivo individual.

Anexo Capítulo 2

Secuencias nucleotídicas de los genes amplificados por PCR para las cepas *E. coli* NCTC 12900 y *E. coli* EDL933

M1_gadAFw sequence exported from M1_gadAFw_2016-09-15.ab 1

SEQ DNAMAN1: 329 bp; Composition 67 A; 102 C; 91 G; 68 T; 1 OTHER

Percentage: 20.4% A; 31.0% C; 27.7% G; 20.7% T; 0.3% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 101.37 dsDNA: 202.86

ORIGIN

```
1   CCAAACCNGG TGTGCGGTCC GGTGCAAATC TGCTGGCATA AATTCGCTCG
CTACTGGGAT
61   GTGGAGCTGC GCGAGATCCC TATGCGCCCC GGTCAGTTGT TTATGGACCC
GAAACGCATG
121  ATTGAAGCCT GCGACGAAAA CACCATCGGC GTGGTGCCGA CTTTCGGCGT
GACCTACACC
181  GGTAACATG AGTCCCGCA ACCGCTGCAC GATGCACTGG ATAAATCCA
GGCCGACACC
241  GGTATCGACA TCGACATGCA CATCGACGCT GCCAGCGGTG GCTTCCTGGC
ACCGTTCGTC
301  GCCCCGGATA TCGTCTGGGA CTTCCGCCA
```

M1_gadARv sequence exported from M1_gadARv_2016-09-15.ab 1

SEQ DNAMAN5: 337 bp; Composition 68 A; 96 C; 90 G; 81 T; 2 OTHER

Percentage: 20.2% A; 28.5% C; 26.7% G; 24.0% T; 0.6% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 103.88 dsDNA: 207.78

ORIGIN

```
1   CCACCGCTGG CNGCGTCGAT GTGCATGTCG ATGTCGATAC CCGTGTCCGC
CTGGAATTTA
61   TCCAGTGCAT CGTGCAGCGG TTGCGGGAAC TCATAGTTAC CCGTGTAGGT
CACGCCGAAA
121  GTCGGCACCA CGCCGATGGT GTTTTCGTCG CAGGCTTCAA TCATGCGTTT
CGGATCCATA
181  AACAACTGAC CGGGGCGCAT AGGGATCTCG CGCAGCTCCA CATCCCAGTA
CGGAGCGAAT
241  TTATGCCAGC AGATTGACAC CGGACCGCAC ACCAGGTTTG GTTTATCCGT
TGGTTTGCCT
301  GCAGCTTCCA TACGCTTNCC AACGCCATTT CATCAA
```

>M2_gadAFw sequence exported from M2_gadAFw_2016-09-15.ab 1

SEQ DNAMAN7: 325 bp; Composition 65 A; 101 C; 91 G; 68 T; 0 OTHER

Percentage: 20.0% A; 31.1% C; 28.0% G; 20.9% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 100.14 dsDNA: 200.39

ORIGIN

```
1   ACCTGGTGTG CCGTCCGGTG CAAATCTGCT GGCATAAATT CGCCCCGCTAC
TGGGATGTGG
```

61 AGCTGCGCGA GATCCCTATG CGCCCCGGTC AGTTGTTTAT GGACCCGAAA
CGCATGATTG
121 AAGCCTGCGA CGAAAACACC ATCGGCGTGG TGCCGACTTT CGGCGTGACC
TACACCGGTA
181 ACTATGAGTT CCCGCAACCG CTGCACGATG CACTGGATAA ATTCCAGGCC
GACACCGGTA
241 TCGACATCGA CATGCACATC GACGCTGCCA GCGGTGGCTT CCTGGCACCG
TTCGTCCGCC
301 CGGATATCGT CTGGGACTTC CGCCA

>M2_gadARv sequence exported from M2_gadARv_2016-09-15.ab 1

SEQ DNAMAN9: 341 bp; Composition 66 A; 97 C; 94 G; 80 T; 4 OTHER
Percentage: 19.4% A; 28.4% C; 27.6% G; 23.5% T; 1.2%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 105.17 dsDNA: 210.25
ORIGIN

1 GCGGAGCCNC CGCTGGCNGC GTCGANGTGC ATGTCGATGT CGATACCGGT
GTCCGCCTGG
61 AATTATCCA GTGCATCGTG CAGCGGTTGC GGGAACATCAT AGTTACCGGT
GTAGGTCACC
121 CCGAAAGTCG GCACCACGCC GATGGTGTTC TCGTCGCAGG CTTCAATCAT
GCGTTTCGGA
181 TCCATAAACA ACTGACCGGG GCGCATAGGG ATCTCGCGCA GCTCCACATC
CCAGTAGCGA
241 GCGAATTTAT GCCAGCAGAT TTGCACCGGA CCGCACACCA GGTTTGTTT
ATCCGTTGGT
301 TTGCCTGCAG CTTCCATACG CTTNCCAACG CCATTTATC A

>M3_stx1Fw sequence exported from M3_stx1Fw_2016-09-15.ab 1

SEQ DNAMAN9: 128 bp; Composition 31 A; 21 C; 37 G; 33 T; 6 OTHER
Percentage: 24.2% A; 16.4% C; 28.9% G; 25.8% T; 4.7%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 39.83 dsDNA: 78.91
ORIGIN

1 CNATAGNNGG ACCTCANCTG NACGCAGNTC TGTGGCAAGA GCGATGTTAC
GGTTTGTTAC
61 TGTGACAGCT GAAGCTTTAC GTTTTCGGCA AATACAGAGG GGATTTTCGTA
GAACAGTGGA
121 TGATGTGA

>M3_stx1Rv sequence exported from M3_stx1Rv_2016-09-15.ab 1

SEQ DNAMAN13: 136 bp; Composition 45 A; 29 C; 26 G; 30 T; 6 OTHER
Percentage: 33.1% A; 21.3% C; 19.1% G; 22.1% T; 4.4%OTHER
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 41.99 dsDNA: 83.84
ORIGIN

1 TTGCNGNAAA NCGTAAAGCT TCANCTGNTC ACAGTAACAA ACCGTAACAT
CGCTCTTGCC
61 ACAGACTGCG TCAGTGAGGT TCCACTATGC GACATTAAT CCAGATAAGA
AGTAGTCAAC
121 GAATGGAAGA NTTATA

>M4_hlyARv sequence exported from M4_hlyARv_2016-09-15.ab1

SEQ DNAMAN16: 361 bp; Composition 90 A; 89 C; 54 G; 125 T; 3 OTHER

Percentage: 24.9% A; 24.7% C; 15.0% G; 34.6% T; 0.8% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 110.58 dsDNA: 222.52

ORIGIN

```

1   AAGCTGANTA ATAAGTTCAA TACTACTTTT GGCAATATCA TTNCTGACTT ATATCCTCTC
61   CTCCCCGTTG TTTTCTCAGC AATTCATCAA GAGCCATGCC TGATAAAGCA
ATCCCCGTAA
121  AATTCTGTAG TGCTGAGAGA ACTGTTCCGG CTTTTCCCAG ATTATTACCT
ACATTTTCAG
181  CGGTTCTCTC TATTTACTC CCAACTTTCT GATACTTCTG CAGAAGTTTG
TCAAGTTGTC
241  GTCCGAATAT TGCAACACCA CGTTCAGTTA ATCCTACAAC TTTTCTGCT
GCACCAAAAA
301  ACTGGTTTGC AATCCTGTA TCATCTCGTT CAGTACGGTG TATTTCTATT
CCAAGCTCAT
361  C

```

>M6_eaeAFw sequence exported from M6_eaeAFw_2016-09-15.ab1

SEQ DNAMAN18: 323 bp; Composition 93 A; 58 C; 62 G; 110 T; 0 OTHER

Percentage: 28.8% A; 18.0% C; 19.2% G; 34.1% T; 0.0% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 99.71 dsDNA: 199.09

ORIGIN

```

1   TTTTTATGT TAATCAGAAT TCATTGCAA ATGGTGAAAA TTATTTAAA TTGGTTCCGG
61   ATTCAAACACT GTTAACTCAT GATAGCTATC AGAATCGCCT TTTTATACG TTGAAAACCTG
121  GTGAAACTGT TGCCGATCTT TCTAAATCGC AAGATATTAA TTTATCGACC
ATTGGTTCGT
181  TGAATAAGCA TTTATACAGT TCTGAAAGCG AAATGATGAA GGCCGCGCCCT
GGTCAGCAGA
241  TCATTTGCC ACTCAAAAAA CTCCCTTTG AATACAGTGC ACTACCACTT
TTAGGTTCCG
301  CACCTCTTGT TGCTGCAGGT GGA

```

>M6_eaeARv sequence exported from M6_eaeARv_2016-09-15.ab1

SEQ DNAMAN20: 323 bp; Composition 106 A; 62 C; 51 G; 103 T; 1 OTHER

Percentage: 32.8% A; 19.2% C; 15.8% G; 31.9% T; 0.3% OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 99.50 dsDNA: 199.08

ORIGIN

```

1   TTTTTGAGT GGCAAATGA TCTGCTGACC AGGCGCGGCC TTCNTCATT
CGCTTTCAGA
61   ACTGTATAAA TGCTTATTCA ACGACCAAAT CGTCCGATAAA TTAATATCTT GCGATTTAGA
121  AAGATCGGCA ACAGTTTCAC CAGTTTCAA CGTATAAAAA AGCGGATTCT
GATAGCTATC
181  ATGAGTTAAC AGTTTTGAAT CCGAACCCAA TTAAAATAA TTTTCACCAT
TTGCAAATGA
241  ATTCTGATTA ACATAAAAAA ACAATCCTAA ACCAGCACTA AGCATAATCA ATGTTTTTTT
301  TAGCTTATGC TTGTGCCGGG TCA

```

>M7_eaeAFw sequence exported from M7_eaeAFw_2016-09-15.ab 1

SEQ DNAMAN22: 322 bp; Composition 91 A; 58 C; 62 G; 108 T; 3 OTHER

Percentage: 28.3% A; 18.0% C; 19.3% G; 33.5% T; 0.9%OTHER

Molecular Weight (kDa): ssDNA: 99.40 dsDNA: 198.48

ORIGIN

```

1   TTTTTANGN TANTCAGAAT TCATTTGCAA ATGGTGAAAA TTATTTAAA TTGGGTTCGG
61  ATTCAAACACT GTTAACTCAT GATAGCTATC AGAATCGCCT TTTTATACG TTGAAAACCTG
121 GTGAAACTGT TGCCGATCTT TCTAAATCGC AAGATATTA TTTATCGACG
    ATTTGGTTCGT
181 TGAATAAGCA TTTATACAGT TCTGAAAGCG AAATGATGAA GGCCGCGCCT
    GGTCAGCAGA
241 TCATTTTGCC ACTCAAAAAA CTCCCTTTG AATACAGTGC ACTACCACTT
    TTAGGTTCCG
301 CACCTCTTGT TGCTGCAGGT GG
  
```

>M7_eaeARv sequence exported from M7_eaeARv_2016-09-15.ab 1

SEQ DNAMAN24: 324 bp; Composition 109 A; 62 C; 51 G; 101 T; 1 OTHER

Percentage: 33.6% A; 19.1% C; 15.7% G; 31.2% T; 0.3%OTHER

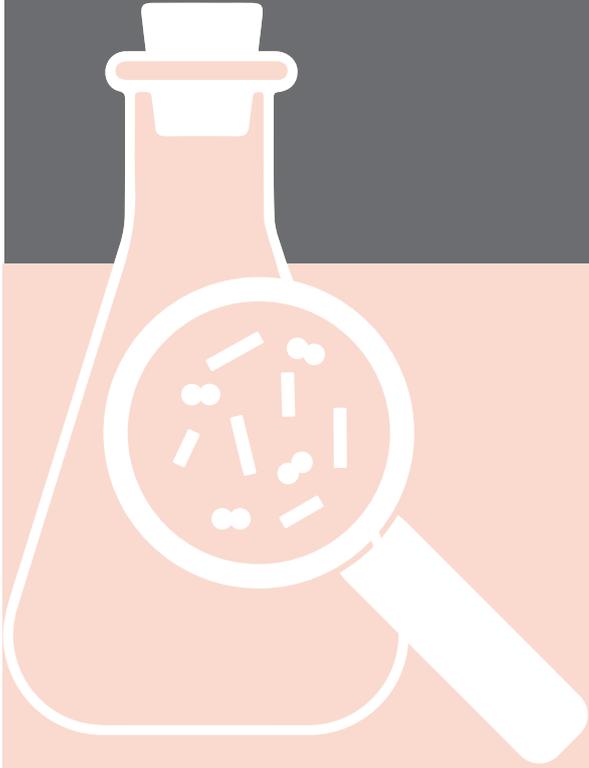
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 99.83 dsDNA: 199.70

ORIGIN

```

1   TTTTGAGTG GCAAAATGAT CTGCTGACCA GGCGCGGCCT TCATCATTC
    GCTTTCAGAA
61  CTGTATAAAT GCTTATTCAA CGACCAAATC GTCGATAAAT TAATATCTTG CGATTAGAA
121 AGATCGGCAA CAGTTTCACC AGTTTCAAC GTATAAAAAA GGCGATTCTG
    ATAGCTATCA
181 TGAGTTAACA GTTTTGAATC CGAACCCAAT TAAAATAAT TTTCACCATT
    TGCAAATGAA
241 TTCTGATTAA CATAAAAAA CAATCCTAAA CCAGCACTAA GCATAATCAA TGTTTTTTTT
301 ACCTNATGCT TGTGCCGGGT CAAA
  
```

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
BL-ECEH *in vitro*



CAPITULO

CAPITULO 3

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN BL-ECEH *in vitro*

Introducción

Tras la evaluación de la capacidad antagónica de las cepas lácticas estudiadas frente ECEH, *L. plantarum* CRL681 y *Ent. mundtii* CRL35 resultaron los candidatos más eficaces para luchar contra ECEH en el sistema cárnico estudiado. Sin embargo, en este trabajo se decidió seleccionar solo *Ent. mundtii* CRL35 para análisis ulteriores debido a la disponibilidad de su genoma, que se encuentra parcialmente secuenciado y anotado en base de datos, lo cual resultó esencial para la identificación de proteínas durante los estudios proteómicos. Además, esta cepa es capaz de producir la enterocina CRL35, una bacteriocina muy eficaz contra *Listeria monocytogenes*. De esta forma, *Ent. mundtii* CRL35 podría ofrecer una potencialidad bioprotectora con un espectro de acción más amplio, es decir, no solo contra ECEH, sino también contra *Listeria monocytogenes*, otro patógeno alimentario de gran preocupación para la industria cárnica (Salvucci y col., 2007). Sumado a esto, en nuestro laboratorio se han realizado estudios bioquímicos y genéticos de *Ent. mundtii* CRL35 que garantizan sus características tecnológicas y bioprotectoras, haciendo de esta cepa una candidata interesante para ser utilizada como cultivo adjunto de alimentos, incluyendo alimentos cárnicos (Saavedra, 2004; Pingitore y col., 2012; Orihuel y col., 2018).

Por todo lo expuesto, en el presente capítulo se buscó profundizar en el conocimiento de los eventos bioquímicos y moleculares que subyacen a la interacción *Ent. mundtii* CRL35-ECEH, mediante los siguientes estudios:

- Análisis proteómicos de expresión diferencial que permitan comprender el comportamiento y la influencia mutua entre *Ent. mundtii* y ECEH en ambiente cárnico.
- Estudios de la capacidad de adhesión de ambos microorganismos a proteínas de la matriz extracelular cárnica así como su recíproca influencia sobre este fenómeno.
- Evaluación del potencial de *Ent. mundtii* CRL35 para inducir la liberación de toxina shiga durante el cocultivo con *E. coli* C600 Δ tox mediante estudios de inducción del fago W933, a fin de conocer el grado de seguridad que presentaría

la cepa bioprotectora seleccionada durante su coexistencia con el patógeno en el alimento.

- Evaluación de la actividad antilisteria de *Ent. mundtii* CRL35 durante el cocultivo con ECEH en ambiente cárnico, con el fin de conocer el efecto de la interacción microbiana sobre la producción de enterocina CRL35. La conocida actividad antilisteria, sumada a su acción contra ECEH, le darían al cultivo láctico estudiado un doble interés tecnológico.

Estudios proteómicos de la interacción BL-ECEH: análisis de expresión diferencial

Resultados

Para estudiar las bases moleculares de la acción antagónica de *Ent. mundtii* hacia ECEH durante su interacción en un ambiente cárnico, se estudió la expresión diferencial de proteínas de ambos microorganismos durante su crecimiento individual o en cocultivo en dos momentos claves de dicha interacción: T1 (fase exponencial para ambos microorganismos) y T2 (fase estacionaria para *Ent. mundtii* y fase de muerte para ECEH) (ver Capítulo 6, Materiales y Métodos). La expresión diferencial de proteínas de cada microorganismo se determinó de acuerdo a las siguientes comparaciones: **I)** crecimiento en cocultivo *versus* crecimiento individual a T1; **II)** crecimiento en cocultivo *versus* crecimiento individual a T2 y **III)** crecimiento en cocultivo a T1 *versus* crecimiento en cocultivo a T2, como se grafica en Figura 3.1.

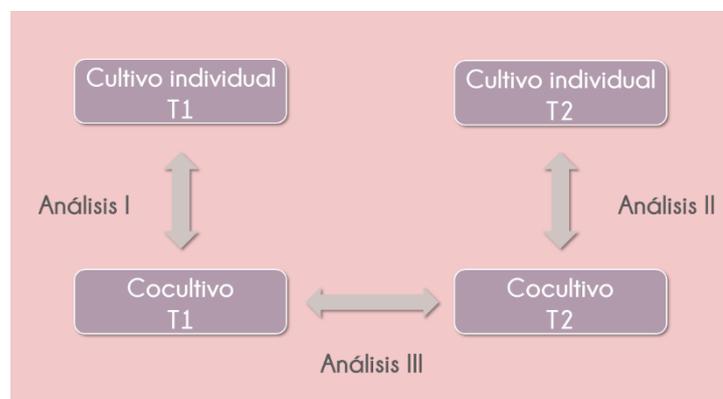


Figura 3.1. Esquema representativo de los diferentes análisis proteómicos abordados. T1 corresponde al momento de crecimiento exponencial de ambas cepas (6h) tanto en cocultivo como cultivo individual, T2 corresponde al momento de crecimiento en fase estacionaria de *Ent. mundtii* en cultivo individual y en cocultivo, y a fase de muerte de ECEH en cultivo individual (96 h) y en cocultivo (30 h).

Los geles 2D obtenidos fueron analizado usando el programa SameSpots, donde se obtuvieron 203 *spots* que presentaron diferencias significativas en los niveles de expresión ($p < 0,05$). De estos 203 *spots* se seleccionaron 106 que presentaron variaciones de más de 1,5 veces en la expresión ($p < 0,05$, veces de

expresión (*fold change*) > 1,5) para su identificación por MALDITOF. Un total de 86 *spots* fueron identificados con éxito, 45 correspondieron a ECEH y 41 a *Ent. mundtii*, de acuerdo con las bases de datos consultadas. Las proteínas identificadas se asignaron a diferentes categorías funcionales y además fueron clasificadas de acuerdo a las categorías COG (del inglés *Cluster Orthologous Group*), que consiste en relacionar a cada proteína con grupos funcionales identificadas con una letra mayúscula, por ejemplo aquellas proteínas relacionadas al metabolismo y transporte de aminoácidos se representan con la letra E.

De forma mostrativa, en la Figura 3.2, se exponen los mapas 2D obtenidos luego de realizar los 3 análisis comparativos. Para cada análisis se encuentran marcadas las proteínas expresadas diferencialmente (de ambos microorganismos) y enumeradas aquellas pertenecientes a *Ent. mundtii*.

Discusión

La interacción y las actividades antagónicas de BL con diferentes microorganismos patógenos fueron el foco de numerosos estudios. Entre ellos, Atassi y Servin (2010) investigaron la capacidad de cepas de *Lactobacillus* para combatir *Salmonella* entérica serovar Typhimurium en cocultivos; Angmo y col. (2016) evaluaron diferentes cepas de BL como agentes de biocontrol contra *Yersinia enterocolitica* usando ensayos de inhibición en placa como método de detección, para luego evaluar el crecimiento del patógeno en cultivos mixtos con dos cepas de *Lactobacillus* seleccionadas. Por otro lado, Yang y col. (2017) estudiaron cultivos mixtos de bifidobacterias con *Listeria monocytogenes* para detectar cambios en su patrón de crecimiento luego de la interacción mediante la aplicación de un enfoque proteómico. El presente estudio es el primero donde se evalúa el potencial inhibidor de cepas de BL frente a ECEH en cocultivos utilizando enfoques tanto fisiológicos como proteómicos. Si bien los estudios fisiológicos realizados mostraron un efecto inhibitorio de *Ent. mundtii* sobre ECEH en SCM, el enfoque proteómico abordado nos permitió profundizar en las bases moleculares de la interacción entre ambos microorganismos y su relación con los eventos fisiológicos observados durante su desarrollo conjunto en SCM.

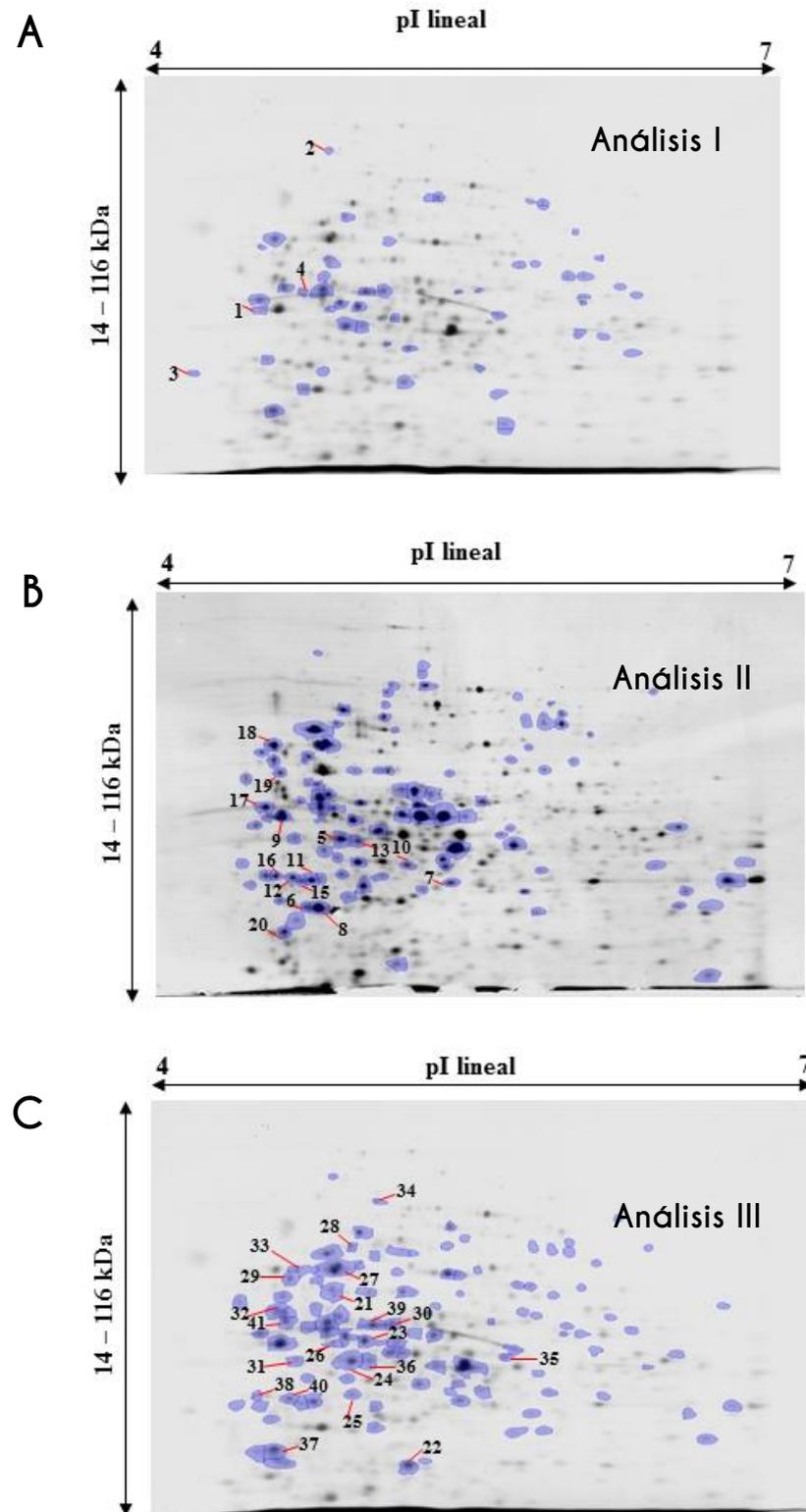


Figura 3.2. Geles E2D mostrando las proteínas diferencialmente expresadas de ambos microorganismos. Las proteínas identificadas exitosamente de *Ent. mundtii* se encuentran enumeradas. **(A)** Cocultivo T1 versus Cultivo Individual T1, **(B)** Cocultivo T2 versus Cultivo Individual T2, **(C)** Cocultivo T1 versus cocultivo T2.

A. Análisis proteómico para *Ent. mundtii* CRL35 durante su crecimiento en SCM

Resultados

Expresión diferencial de proteínas de *Ent. mundtii* CRL35 creciendo en cocultivo con respecto a su crecimiento individual

Cuando se comparó los proteomas del crecimiento en cocultivo con respecto al crecimiento individual en SCM, se obtuvo una sobreexpresión significativa de proteínas de *Ent. mundtii* en cocultivo en ambos tiempos analizados (T1 y T2). Las proteínas identificadas se asignaron con éxito a diferentes categorías funcionales. Específicamente, a T1 resultaron sobreexpresadas 4 proteínas por *Ent. mundtii* en cocultivo (Tabla 3.2, Figura 3.3A), las cuales estuvieron relacionadas con:

- Metabolismo de aminoácidos (50%),
- Metabolismo de carbohidratos (25%),
- División celular (25%),

Por otro lado, a T2, cuando *Ent. mundtii* alcanzó su fase estacionaria de crecimiento en ambas condiciones, 16 proteínas identificadas resultaron sobreexpresadas en cocultivo con una diferencia significativa entre 2,1 y 4,7 veces con respecto al cultivo individual (Tabla 3.2; Figura 3.3B). Estas proteínas se relacionaron con:

- Metabolismo de carbohidratos (31,25%),
- Conversión y producción de energía (18,75%),
- Transcripción (6,25%),
- División celular (6,25%),
- Biosíntesis de la pared celular (6,25%),
- Metabolismo de aminoácidos (6,25%),
- Plegamiento y procesamiento proteico (6,25%),
- Estructura ribosomal (6,25%)
- Estrés (6,25%)

Además, se realizó un análisis de distribución hipergeométrica, el cual permite determinar la probabilidad que una determinada categoría COG se encuentre enriquecida en la muestra de proteínas sobreexpresadas en nuestro estudio, en relación a la totalidad de proteínas codificadas por el genoma de la célula. Los resultados de este análisis indicaron que, en una muestra de 16 proteínas sobreexpresadas, existe más probabilidad de encontrar solo una relacionada con

el metabolismo y el transporte de carbohidratos (E) (Figura 3.4), sin embargo en nuestro estudio se encontraron cinco de ellas expresadas diferencialmente a T2 (Tabla 3.2), indicando que esta categoría se encuentra enriquecida en las condiciones analizadas. Esto también ocurrió con las categorías de conversión y producción de energía (C), plegamiento y procesamiento de proteínas (O) y biosíntesis de la pared celular (M). Para las proteínas relacionadas con transcripción (K), estrés (S), estructura ribosomal (J) y metabolismo de aminoácidos (E) se encontró una proteína sobreexpresada de cada categoría como se esperaba según la distribución hipergeométrica. Sin embargo, para la oxidoreductasa que incluye tres categorías de COG (I, Q, R), era más probable encontrar dos proteínas y solo se identificó una proteína sobreexpresada, lo que podría implicar un empobrecimiento de estas categorías (Figura 3.4A, Tabla 3.2).

Expresión diferencial de proteínas de *Ent. mundtii* CRL35 al comparar su crecimiento en cocultivo en ambos tiempos analizados (T1 y T2)

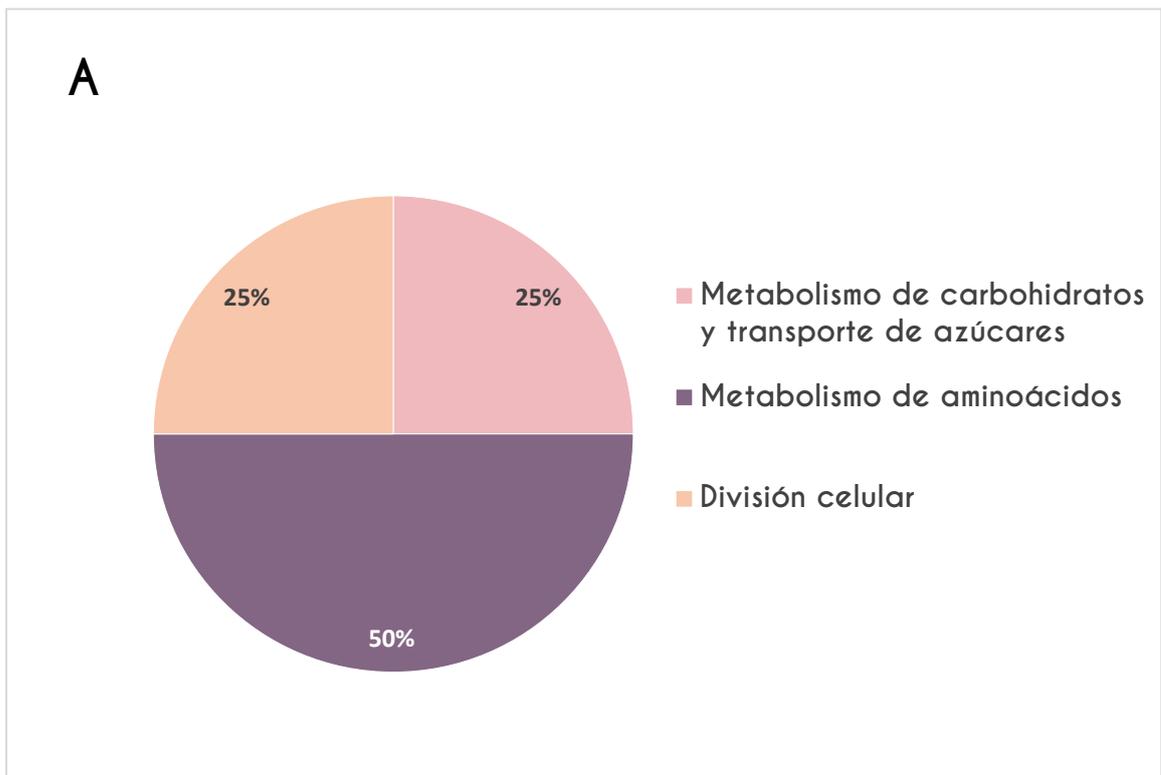
Durante el crecimiento en cocultivo, *Ent. mundtii* expresó diferencialmente (entre 1,5 y 3,4 veces) 21 proteínas. Veinte de ellas presentaron sobreexpresión a las 6 h de crecimiento en cocultivo (T1) y solo una de ellas, la fosfoglucomutasa/fosfomanomutasa, se expresó mayoritariamente a las 30 h durante el cocultivo (T2) (Tabla 3.3, Figura 3.3). Las proteínas sobreexpresadas pudieron ser clasificadas y se demostró que pertenecen a diferentes categorías funcionales, a saber:

- Metabolismo de carbohidratos (40%),
- Metabolismo de aminoácidos (15%),
- Producción y conversión de energía (20%),
- Transcripción (5%),
- Metabolismo de nucleótidos (5%),
- Traducción (5%),
- Estrés (5%),
- Biosíntesis de la pared celular (5%)

Además, al realizar el análisis de distribución hipergeométrica, se demostró que las categorías relacionadas con metabolismo de carbohidratos (G), producción y conversión de energía (C), transporte y metabolismo de aminoácidos (E), transporte y metabolismo de nucleótidos (F) están enriquecidas, mientras que las categorías de

traducción (J), transcripción (K), biogénesis de la pared celular (M) y de función desconocida (S) no presentaron variaciones (Figura 3.4B).

En los tres análisis proteómicos realizados, el mayor número de proteínas expresadas diferencialmente se relacionó con las categorías funcionales de metabolismo de carbohidratos, producción de energía y metabolismo de aminoácidos (Figura 3.3).



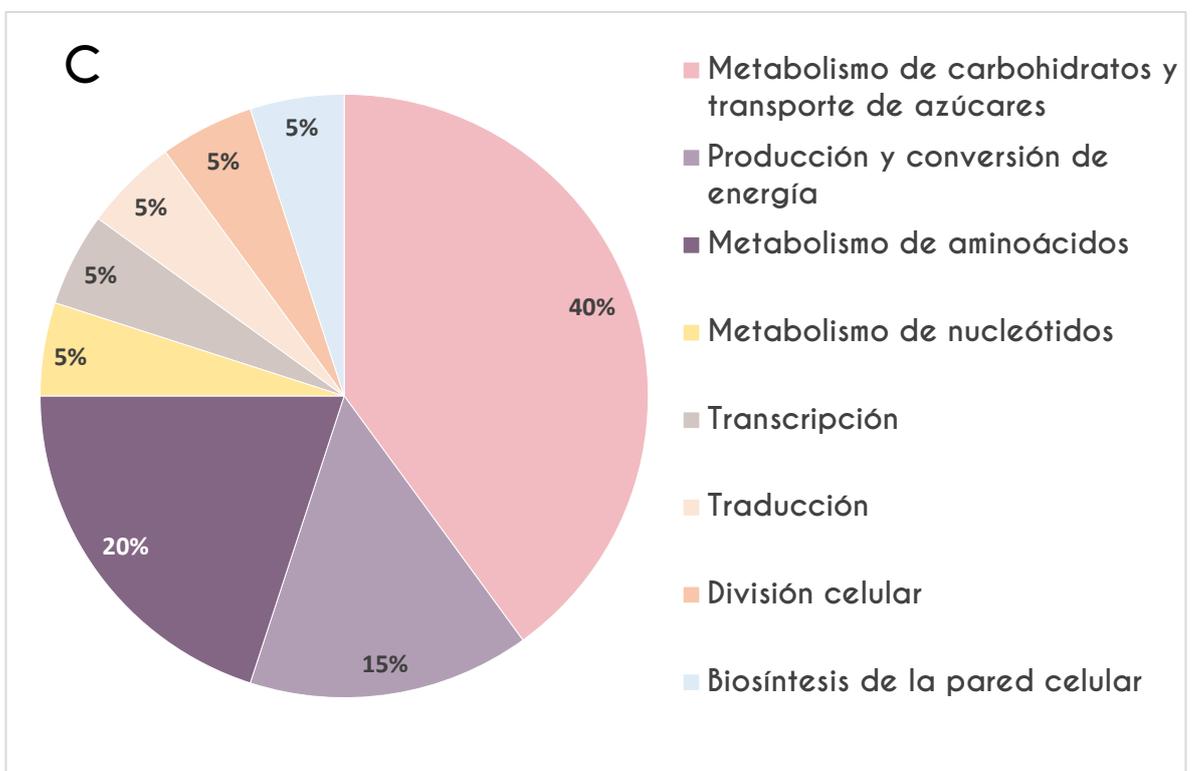
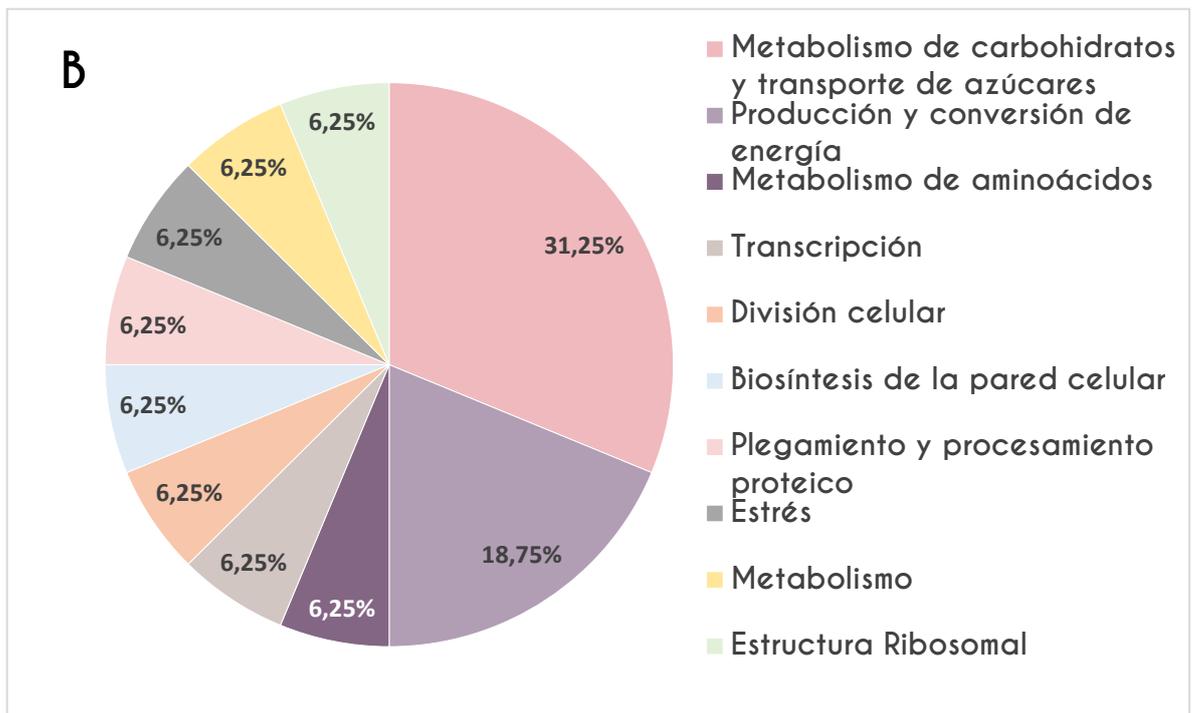


Figura 3.3. Abundancia relativa (%) de las proteínas sobreexpresadas por *Ent. mundtii* CRL35 según las categorías funcionales a las cuales pertenecen. **(A)** Cocultivo T1 versus crecimiento individual T1; **(B)** Cocultivo T2 versus crecimiento individual T2; **(C)** Cocultivo T1 versus cocultivo T2.

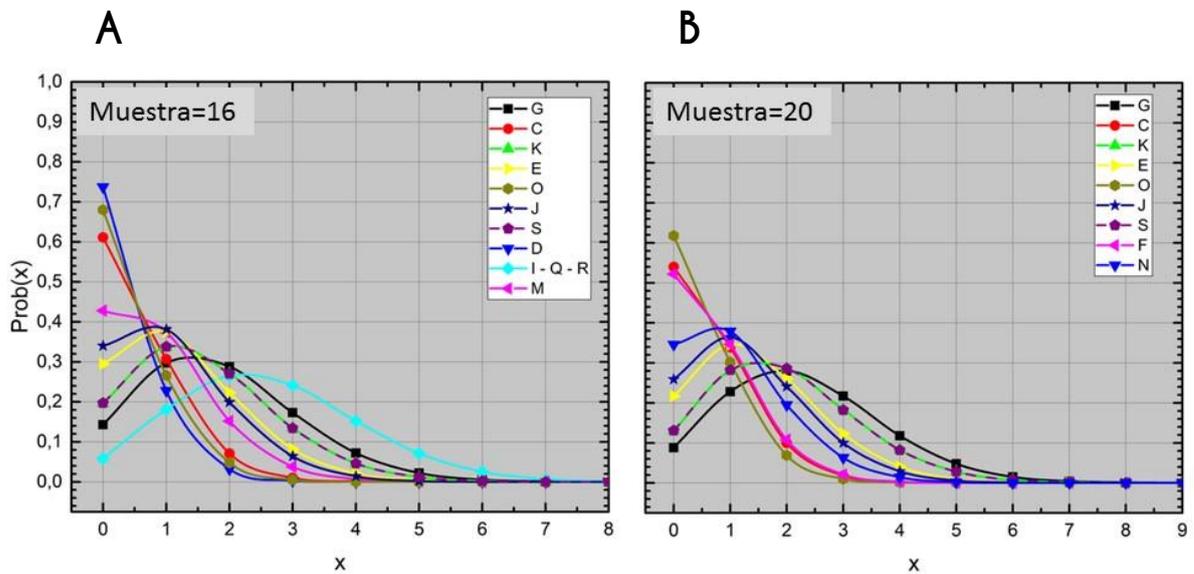


Figura 3.4. Análisis hipergeométrico según el cual se grafica la distribución de las probabilidades (Prob) de encontrar una determinada categoría funcional COG un cierto número de veces "x" en relación al número total de proteínas codificadas por el genoma de la cepa. **(A)** 16 proteínas sobreexpresadas de *Ent. mundtii* CRL35 (Muestra=16) cuando crece en cocultivo frente a cultivo individual a T2 y **(B)** 20 proteínas sobreexpresadas de *Ent. mundtii* CRL35 (Muestra=20) cuando crece en cocultivo en T1 frente a T2. Abreviaturas de una letra para las categorías funcionales COG: G: metabolismo y transporte de carbohidratos; C: producción y conversión de energía; K: transcripción; D: división celular y partición cromosómica; I: metabolismo lipídico; Q: biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R: solo predicción funcional general; M: biosíntesis de la pared celular; E: transporte y metabolismo de aminoácidos; O: plegamiento y procesamiento proteico; J: traducción, incluyendo estructura de ribosomas y biogénesis; S: sin predicción funcional, N: motilidad.

Análisis funcional e interacción de proteínas expresadas diferencialmente por *Ent. mundtii* CRL35

Si bien las proteínas identificadas fueron clasificadas según diferentes categorías funcionales, es necesario conocer si la función biológica específica de cada una de ellas las relaciona de manera concreta, y a partir de allí inferir acerca de la estimulación o inhibición de un evento, proceso o metabolismo dado. En este sentido la utilización de bases de datos como STRING v10.05 resultan una herramienta de gran valor ya que permite la construcción de redes de interacción proteína-proteína basándose en la combinación de diferentes criterios (interacciones determinadas experimentalmente, interacciones predichas mediante genes vecinos, fusión de genes, coexpresión, etc), a partir de los cuales genera un puntaje que permite establecer distintos niveles de interacción entre las proteínas de la red.

Además, el hallazgo de interacciones mediante esta base de datos, respalda la coexpresión diferencial del conjunto de proteínas obtenidas en nuestros análisis, y contribuye a establecer el significado biológico sobre ellas.

Se construyeron dos redes de interacción para aquellas proteínas expresadas diferencialmente por *Ent. mundtii*: **i)** proteínas sobreexpresadas por *Ent. mundtii* en cocultivo con respecto a su crecimiento individual a T2 (Figura 3.5A); no se construyó una red para T1 ya que solo cuatro proteínas resultaron sobreexpresadas en esta condición, y **ii)** proteínas de *Ent. mundtii* sobreexpresadas en T1 con respecto a T2 en cocultivo con ECEH (Figura 3.6A). En dichas redes, cada proteína se encuentra representada mediante nodos y la fuerza de las interacciones entre ellas está representada por el grosor de las líneas que las une. En círculo se destacan las interacciones de mayor intensidad observadas entre las proteínas de las diferentes redes.

Los resultados arrojados por STRING, fueron luego objeto de análisis de una nueva base de datos, análisis y visualización, Cytoscape v3.6.1, mediante la cual se obtuvieron redes de mayor complejidad (Figura 3.5B y Figura 3.6B), en las cuales, además de representarse la intensidad de la interacción mediante el grosor de las líneas de unión, el tamaño de los nodos refleja las veces de expresión de cada proteína en las condiciones estudiadas.

Como se muestra en la Figura 3.5A, 5 de las 15 proteínas sobreexpresadas en cocultivo a T2 con respecto al cultivo individual no tienen interacciones entre sí. Sin embargo, 10 proteínas estaban relacionadas demostrando que existían

interacciones entre ellas. Cuatro proteínas están relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y tres de ellas con la producción y conversión de energía, mostrando interacciones muy fuertes entre sí. Esto también respalda el hecho de que el metabolismo de carbohidratos (G) a través de la glucólisis se encontró enriquecido luego del análisis hipergeométrico a T2 durante el cocultivo con ECEH. Los niveles de sobreexpresión de cada proteína de este grupo se presentó en un amplio rango, registrándose valores entre 2 y 4,7 veces de expresión en cocultivo con respecto al cultivo individual a T2, siendo 6-fosfofructokinasa (pfkA), L-lactatodeshidrogenasa (ldh) y 2-oxoisovalerato deshidrogenasa subunidad beta (AK 89_08915), aquellas que evidenciaron mayor diferencia de expresión, (5,32, 4,74 y 4,70 respectivamente) (Figura 3.5B).

La segunda red (Figura 3.6) corresponde a las proteínas sobreexpresadas por *Ent. mundtii* creciendo en cocultivo a las 6 h respecto a las 30 h, (T1 versus T2). Dos (Proteína de estrés general, familia Asp23/Gls24 y Colilglicinohidrolasa) de las 20 proteínas no presentaron interacciones en la base de datos consultada.

Además, 3 proteínas presentaron interacciones entre sí, sin observarse relaciones con las proteínas restantes. En esta red se obtuvieron sesenta y ocho interacciones entre las proteínas sobreexpresadas por *Ent. mundtii*. Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de estas 20 proteínas en el cocultivo a T1 con respecto a T2 podría explicarse por la fase de crecimiento logarítmico de *Ent. mundtii* a las 6 h. Además, como se puede observar en la Figura 3.6A, las principales interacciones encontradas en la red están relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono (7 proteínas), implicados en particular en la vía de la glucólisis y de la pentosa fosfato. Esta red de interacción respalda además el enriquecimiento de la categoría G evidenciado por la prueba de distribución hipergeométrica descrita anteriormente. Por otro lado, a través de la red presentada en la Figura 3.6B, se puede observar cierta uniformidad en el tamaño de los nodos, lo cual indica similares niveles de sobreexpresión entre las proteínas de este grupo, estando éstos valores comprendidos entre 1,5 y 3,4 veces de expresión a T1 con respecto a T2 en cocultivo con ECEH.

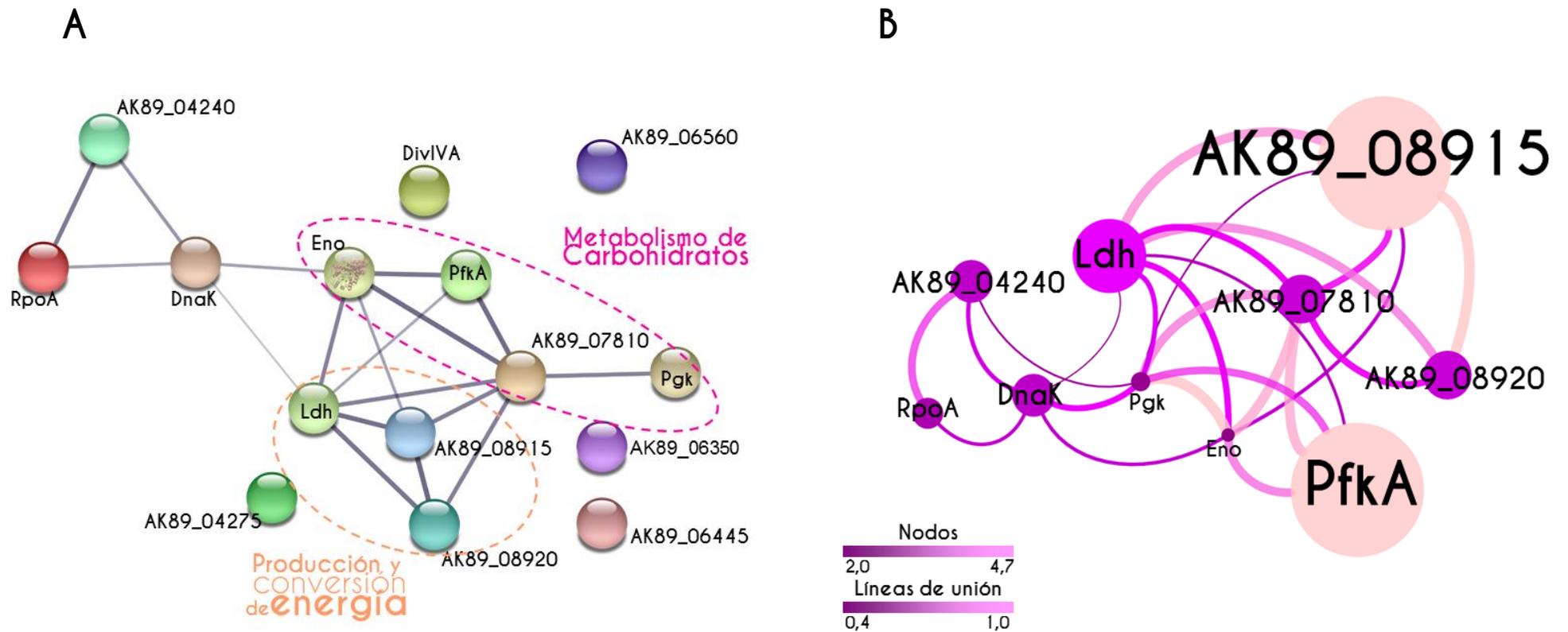


Figura 3.5. Red de interacción de proteínas sobreexpresadas por *Ent. mundtii* CRL35 en cocultivo con respecto a su cultivo individual a T2. Las proteínas están representadas por nodos mientras que sus interacciones por líneas. La fuerza de las diferentes interacciones está representada por el grosor de las líneas. **(A)** Red construida utilizando STRING v10.05. Los círculos agrupan las proteínas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos y la producción y conversión de energía respectivamente. **(B)** Red construida utilizando Cytoscape v3.6.1. El tamaño de los nodos representa de forma proporcional las veces de expresión de cada proteína representada. La gama de colores en líneas de unión y nodos indican la magnitud de la interacción y veces de expresión respectivamente, siendo los mayores valores representados en color rosado y los menores en color violeta.

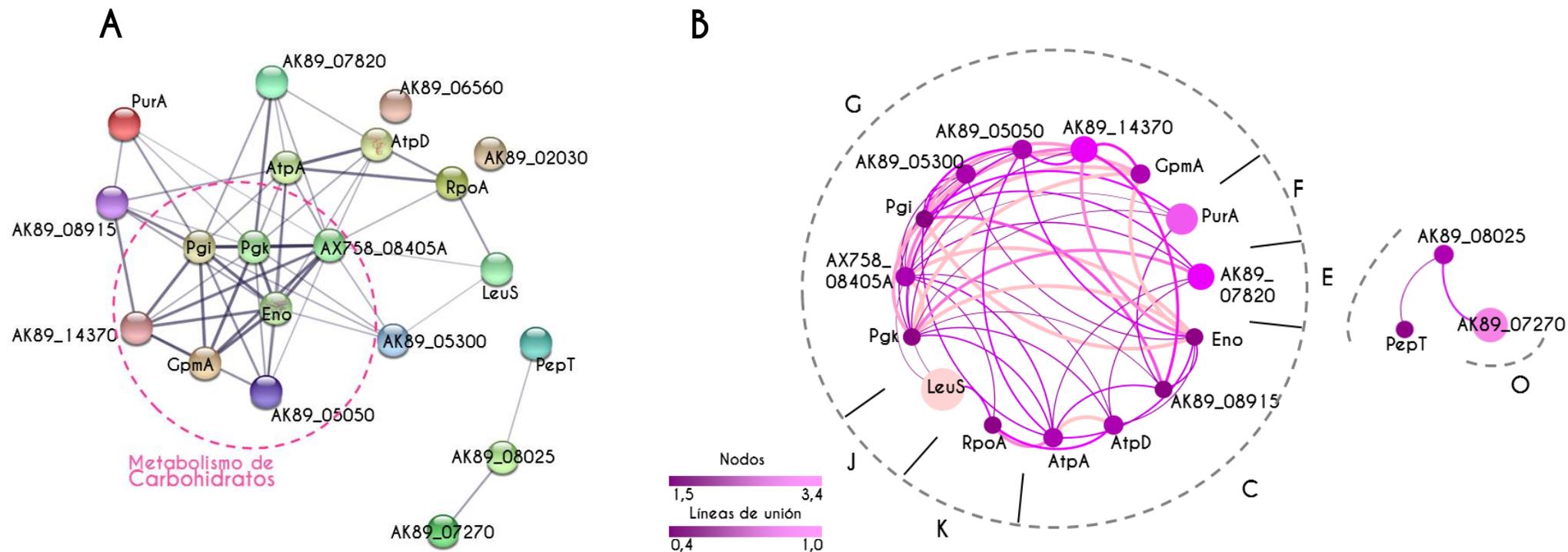


Figura 3.6. Red de interacción de proteínas sobreexpresadas por *Ent. mundtii* CRL35 en cocultivo a T1 con respecto a T2. Las proteínas están representadas por nodos mientras que sus interacciones por líneas. La fuerza de las diferentes interacciones está representada por el grosor de las líneas. **(A)** Red construida utilizando STRING v10.05. El círculo agrupa las proteínas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos. **(B)** Red construida utilizando Cytoscape v3.6.1. El tamaño de los nodos representa de forma proporcional las veces de expresión de cada proteína representada. El orden de los nodos en la representación circular está dada por la categoría COG a la cual pertenecen. La gama de colores de las líneas de unión y nodos indican la magnitud de la interacción y veces de expresión respectivamente, siendo los mayores valores representados en color rosado y los menores en color violeta. Abreviaturas de una letra para las categorías funcionales COG: G: metabolismo y transporte de carbohidratos; C: producción y conversión de energía; K: transcripción; E: transporte y metabolismo de aminoácidos; F: metabolismo de nucleótidos; O: chaperonas moleculares y funciones relacionadas; J: traducción, incluyendo estructura de ribosomas y biogénesis.

Discusión

Cuando se comparó la expresión de proteínas de *Ent. mundtii* CRL35 en cocultivo con la ocurrida durante su crecimiento como cultivo individual, las proteínas identificadas se encontraron siempre sobreexpresadas durante el crecimiento en cocultivo, tanto a T1 como a T2. Sin embargo, las variaciones del proteoma a T1 fueron ligeras. Un transportador ABC para metionina y la subunidad mayor de carbamoil fosfato sintasa están entre las proteínas sobreexpresadas. Ambas relacionadas con la biosíntesis y metabolismo de aminoácidos. Una enzima relacionada con la glucólisis, la enolasa (*spot* N° 9) y una enzima implicada en la división celular, proteína FtsZ, (*spot* N° 14) resultaron sobreexpresadas también en cocultivo durante estas primeras horas de crecimiento, lo que indicaría que *Ent. mundtii* activó su vía glicolítica y el proceso de división celular para competir con ECEH y mantener su crecimiento sin abruptos cambios. Cabe mencionar que la enolasa también se conoce como proteína de pluriempleo, conocidas en inglés como *moonlighting proteins*. Estas son proteínas que muestran funciones adicionales, distintas de su principal actividad catalítica descrita. En general, estas proteínas citoplásmicas pueden ser de superficie celular durante sus actividades adicionales y desempeñan funciones en infecciones, virulencia o respuestas inmunes (Jeffery, 2015). Por ejemplo, la enolasa también se asocia con la unión a células epiteliales (Castaldo y col., 2009). De hecho, Peng y col. (2014) describieron a la enolasa como una de las proteínas de unión a actina en *Enterococcus faecalis*. Por lo tanto, se podría sugerir que *Ent. mundtii* podría regular la expresión de esta proteína durante el cocultivo con ECEH como una estrategia adicional para competir con el patógeno por la unión a actina durante el proceso de adhesión a la matriz cárnica. Por otro lado, el proteoma de *Ent. mundtii* se vio mucho más afectado en el cocultivo a las 30 h que en su respectivo crecimiento individual.

La red de interacción proteína-proteína, construida con las proteínas sobreexpresadas a las 30 h, mostró clara interacción en doce de estas proteínas, relacionadas principalmente con el metabolismo de carbohidratos. El 31,25% de las proteínas con sobreexpresión diferencial estuvieron involucradas en la glucólisis, y el 18,75% en la producción y conversión de energía, lo que indicaría que el cocultivo con ECEH ejerció una activación más efectiva de estas vías en su fase estacionaria (T2). Además, los resultados fisiológicos indicaron que a las 30 h, ECEH se encuentra en fase de muerte en cocultivo, lo que sugiere también, que la disminución de viabilidad de ECEH resultó en beneficio para *Ent. mundtii* que persistió en fase estacionaria. Más aún, *Ent. mundtii*, resultó incluso más estable en su fase estacionaria

durante el cocultivo que en su crecimiento individual. Este hecho es consistente con la sobreexpresión de muchas proteínas del metabolismo de carbohidratos, la producción de energía, la transcripción, la división celular y el metabolismo de aminoácidos que reflejan un metabolismo activo de *Ent. mundtii* permitiéndole su persistencia en SCM. También se debe resaltar la regulación positiva de las proteínas relacionadas con el plegamiento/procesamiento proteico y el estrés, como la chaperona DnaK y el regulador de respuesta a estrés Gls24, que podrían contribuir a la resistencia satisfactoria de *Ent. mundtii* a condiciones estresantes que dominan el ambiente microbiano en esta fase del crecimiento (T2), como por ejemplo la disminución de nutrientes o el descenso de pH registrado (pH: 4,0). Existen algunos estudios que demuestran la interacción de ciertos microorganismos durante su crecimiento en cultivos mixtos. Yang y col. (2017) propusieron que el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum* WBB103 y *Listeria monocytogenes* en cocultivo promueve el crecimiento de forma recíproca, lo que resulta en la entrada más temprana a fase logarítmica. Por su parte, Rios-Covián y col. (2016) describieron la estimulación del crecimiento de *Bifidobacterium longum* en cocultivo con *Bacteroides fragilis* mientras se retardó el crecimiento de éste último, con cambios concomitantes en la producción de algunas proteínas y metabolitos de ambas bacterias. En el presente trabajo parece ocurrir una interacción diferente entre *Ent. mundtii* y *E. coli* NCTC 12900. De hecho, pareciera producirse un efecto positivo de ECEH sobre la aptitud de la bacteria láctica, mientras que ésta fue capaz de precipitar la muerte del patógeno en cocultivo en las condiciones ensayadas.

Al comparar el proteoma de los cocultivos a lo largo del tiempo (T1 y T2), resultaron sobreexpresadas veinte proteínas de *Ent. mundtii* durante las primeras horas de crecimiento. Esto está relacionado con la fase de crecimiento exponencial que atraviesa el microorganismo, en donde el metabolismo general se encuentra activado como esperábamos y según lo documentado por estudios previos (Cohen y col., 2006; Koistinen y col., 2007). Esos resultados también fueron respaldados al construir la red de interacción de proteínas (Figura 3.5), donde aquellas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos presentaron interacciones de mayor magnitud. Entre las proteínas reguladas, se identificaron 7 pertenecientes al metabolismo de carbohidratos y 1 al transporte de azúcares. Cinco enzimas se relacionaron con la glucólisis (*spots* N° 22, 23, 24, 25 y 27) y dos estuvieron involucradas en la ruta de la pentosa fosfato (*spots* N° 26 y 28) (Figura 3.11). La sobreexpresión de fosfoenolpiruvato fosfotransferasa, implicada en el transporte de carbohidratos, podría facilitar la entrada de glucosa en la célula, reflejando una

ventaja para la incorporación de azúcar, contribuyendo así a su lucha contra la presencia del patógeno que también se encuentra en estado de crecimiento logarítmico. Solo una enzima glicolítica, la fosfoglucomutasa (*spot* N° 21), se expresó en menor cantidad a las 6 h. Esto podría relacionarse con la regulación en alza del PTS fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (sistema PTS) involucrado en el transporte de glucosa mediante la generación de glucosa-6P, la cual ingresa directamente en la ruta Embden-Meyerhorff-Parnas, lo que explicaría la baja expresión de fosfoglucomutasa productora de glucosa -6P a partir de glucosa-1P procedente de otras vías, como la de hidrólisis del glucógeno (Bonacina, 2017) (Figura 3.11). El metabolismo del glucógeno sería menos activo que el de glucosa durante las primeras horas. De hecho, la glucosa está disponible, ya que se adiciona al sistema cárnico modelo, por lo que estaría siendo utilizada por *Ent. mundtii* como fuente de energía primaria en las primeras horas de cultivo. Por otro lado, dos enzimas relacionadas con la vía de la pentosa fosfato / fosfocetolasa (PKP) resultaron sobreexpresadas en *Ent. mundtii* a T1, la gluconato deshidrogenasa 6-P y la transcetolasa, indicativas también del metabolismo activo de la ribosa, uno de los azúcares presentes en la carne (Chaillou y col., 2005) (Figura 3.11). De acuerdo con nuestros hallazgos, Koistinen y col. (2007) informaron que las principales proteínas expresadas por *L. plantarum* en fase exponencial temprana estaban relacionadas con el consumo de azúcar y el aumento de la biomasa.

Cuatro enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos también fueron sobreexpresadas por *Ent. mundtii* en cocultivo a T1 con respecto a T2. Entre ellas, la glutamina sintasa, enzima clave del metabolismo del nitrógeno que cataliza la incorporación de amonio en el glutamato y está relacionada con la biosíntesis de arginina, alanina, glutamato y el metabolismo del aspartato, entre otros (Magasanik y Rothstein, 2012). Además, algunas otras peptidasas y aminopeptidasas resultaron sobreexpresadas también a T1, lo que indica un metabolismo peptidolítico activo durante las primeras horas de cocultivo. Por otra parte, se observa que la sobreexpresión de adenilsuccinato sintasa fue de 2.7 veces. Esta enzima juega un papel importante en la biosíntesis de *de novo* de nucleótidos de purina, catalizando el primer paso comprometido en la biosíntesis de AMP a partir de IMP, lo cual indica también un metabolismo más activo durante las primeras horas de cocultivo. Las proteínas implicadas en la transcripción y la traducción, tales como la subunidad alfa de ARN polimerasa dirigida por ADN y ligasa de leucina-ARNt resultaron también sobreexpresadas durante las primeras horas de cocultivo. En apoyo a esto, Yang y col. (2017), informaron la regulación positiva de las enzimas relacionadas con la

transcripción y la traducción cuando se evaluaron cultivos mixtos de *Bifidobacterium bifidum* y *Listeria monocytogenes*.

Una proteína de estrés general (proteína de estrés general familia Asp23/Gls24) presentó también mayor expresión en T1, así como la colilglicinohidrolasa implicada en el metabolismo lipídico y la biosíntesis de la pared celular. Este patrón se puede relacionar con el crecimiento exponencial y la consecuente división celular. Dos ATP sintasas (subunidades alfa y beta) se encontraron aumentadas en esta condición. Estas enzimas son los principales productores de ATP, utilizando el gradiente de protones generado por la fosforilación oxidativa. Finalmente, la subunidad beta de la 2-oxoisovalerato deshidrogenasa fue sobreexpresada 1,9 veces a T1 durante el cocultivo. Esta enzima pertenece a la familia de las oxidoreductasas, que también está implicada en la degradación de Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, Asp y Asn.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede postular el efecto positivo de ECEH en la aptitud de la cepa láctica para crecer e inhibir a ECEH durante el cocultivo, mientras que se evidenció un impacto negativo de *Ent. mundtii* sobre el patógeno al precipitar su muerte después de 8 h de cocultivo.

Si bien con estos estudios no se puede confirmar exactamente los mecanismos moleculares implicados en la inhibición llevada a cabo por la BL sobre ECEH, se sugiere que fenómenos como la competencia por nutrientes y la relación célula-célula contribuirían a los fenómenos observados de interacción e inhibición del patógeno. La profundización en el conocimiento de estos mecanismos está prevista en investigaciones futuras.

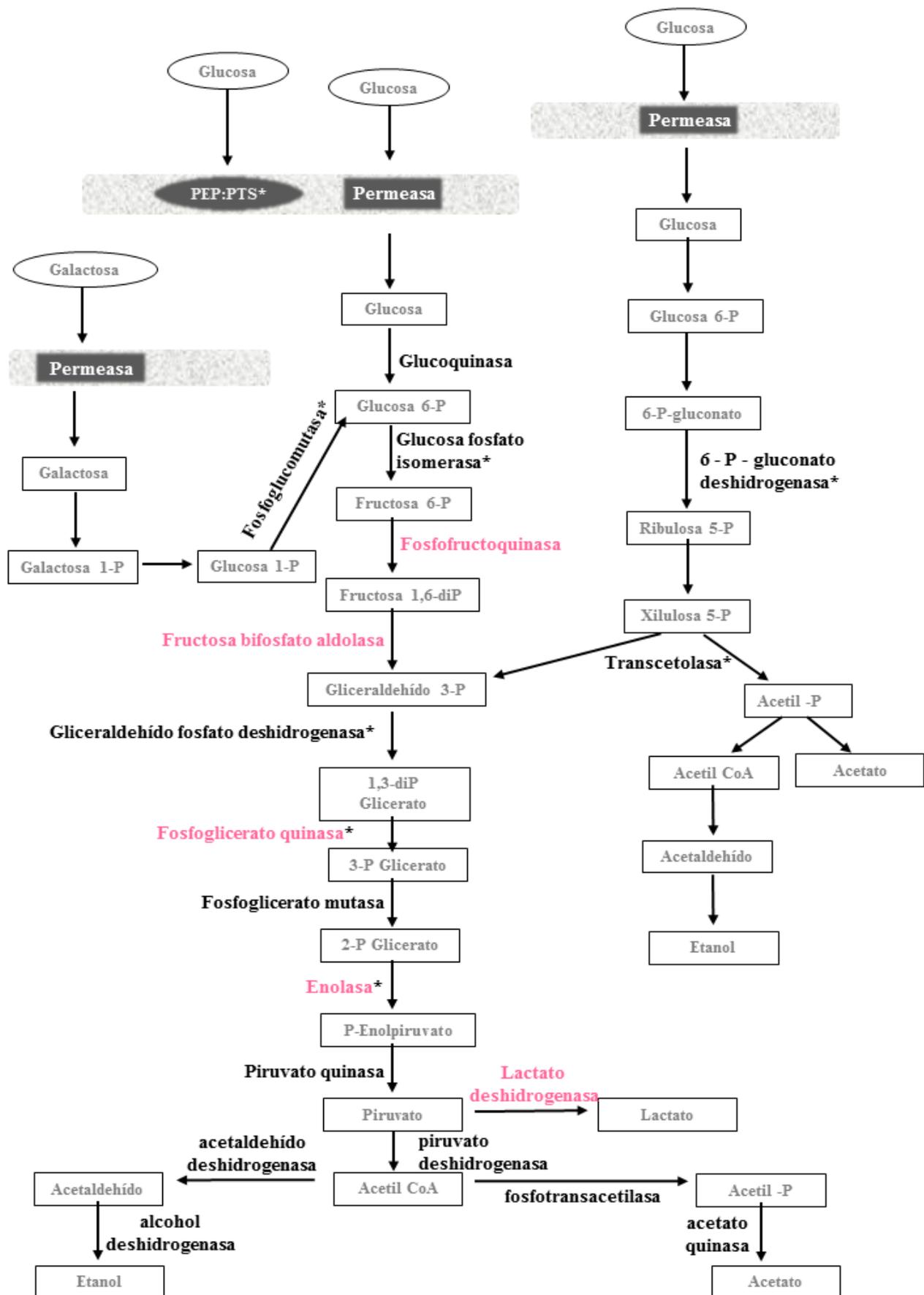
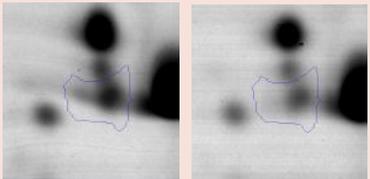
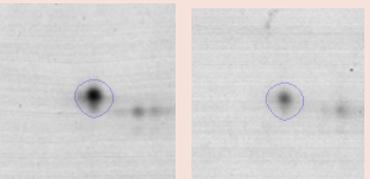
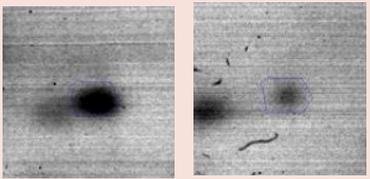
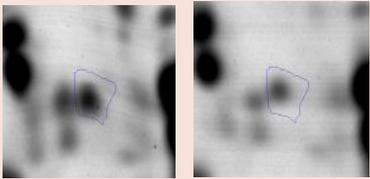
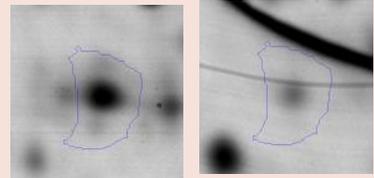
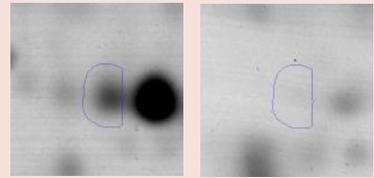
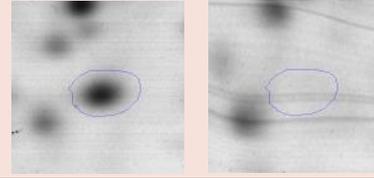
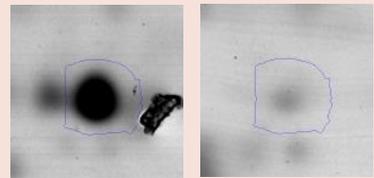
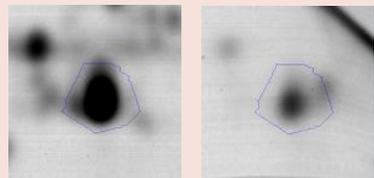
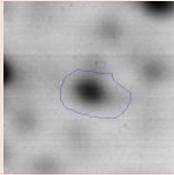
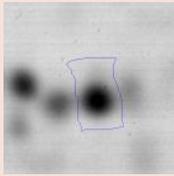
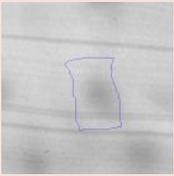
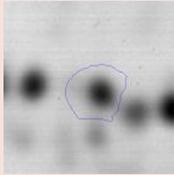
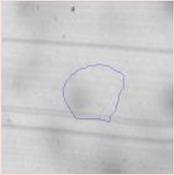
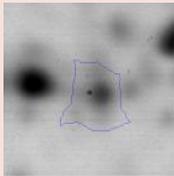
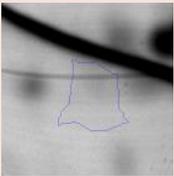
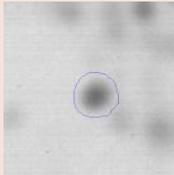


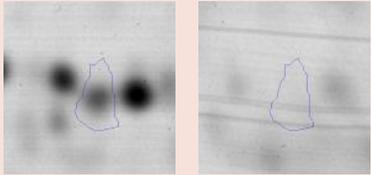
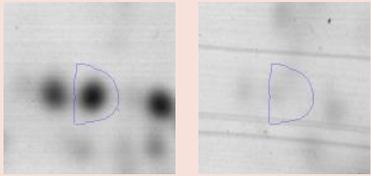
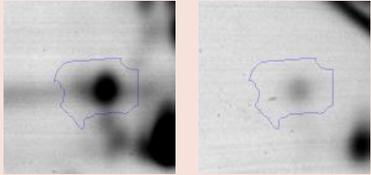
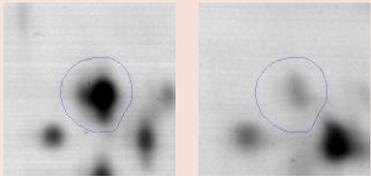
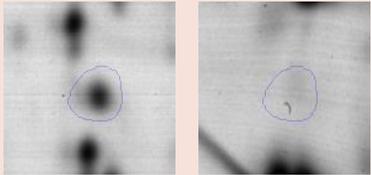
Figura 3.11. Vía glicolítica en *Ent. mundtii* CRL35. Las enzimas sobreexpresadas a T2 en cocultivo con respecto a su crecimiento individual (análisis N°II) se encuentran en color rosado. Con asteriscos se presentan las proteínas sobreexpresadas en cocultivo a 6 h (T1) con respecto a las 30 h (T2) (análisis N°III).

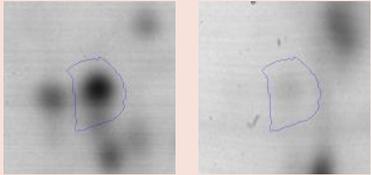
Tabla 3.2. Proteínas sobreexpresadas durante el crecimiento en cocultivo de *Ent. mundtii* CRL35 con respecto a su crecimiento individual a T1 y T2 en SCM a 30°C.

Función	COG ^a	Spot ^b	Proteína	N° de Acceso ^c	Score ^d	Gen	PM teórico ^e	pI ^f	Veces de expresión ^g	Expresión diferencial Cocultivo/Crec. Individual
T1*										
Metabolismo de Carbohidratos	G	1	Enolasa	gil602619948	1120	<i>eno</i>	46496	4,60	1,9	
Metabolismo de Aminoácidos	E F	2	Carbamoil fosfato sintasa -Subunidad grande	gil602619378	1170	<i>AK89_04630</i>	117592	4,82	1,8	
	P	3	Transportador ABC de Metionina. Proteína de unión a sustrato	gil602620029	668	<i>AK89_00090</i>	30407	4,36	2,1	
División Celular	D	4	Proteína de división celular FtsZ	gil602618182	367	<i>ftsZ</i>	44517	4,73	2,2	

Función	COG ^a	Spot ^b	Proteína	N° de Acceso ^c	Score ^d	Gen	PM Teórico ^e	pI ^f	Veces de expresión ^g	Expresión diferencial Cocultivo/Crec. Individual
T2*										
Metabolismo de Carbohidratos	G	5	Fosfoglicerato quinasa	gil602619950	1040	<i>pgk</i>	42045	4,94	2,1	
	G	6	Fructosa bifosfatoaldolasa	gil602618838	707	<i>AK89_07810</i>	30955	4,77	4,0	
	G	7	6-fosfofructokinasa	gil602619230	1320	<i>pfkA</i>	34342	5,32	4,7	
	G	8	Fructosa-bifosfatoaldolasa	gil602618838	626	<i>AK89_07810</i>	30955	4,77	4,6	
	G	9	Enolasa	gil602619948	1460	<i>eno</i>	46496	4,60	2,0	

Producción y Conversión de Energía	C	10	piruvatodehidrogenasa subunidad alfa E1	gil602618669	938	AK89_08920	41004	5,14	2,6	 
	C	11	L-lactatodeshidrogenasa	gil602619124	1230	<i>ldh</i>	35809	4,74	3,1	 
	C	12	2-oxoisovalerato deshidrogenasa subunidad beta	gil602618668	1240	AK89_08915	35393	4,70	2,7	 
Transcripción	K	13	Subunidad alfa-ADN polimerasa dirigida por ADN	gil602618530	445	<i>rpoA</i>	35276	4,98	2,3	 
División Celular	D	14	Proteína DivIVA de división celular	gil602618177	549	AK89_10945	26893	4,61	4,0	 

Metabolismo	I Q R	15	Oxidoreductasa	gil602619024	1020	AK89_06445	31882	4,77	3,5	
Biosíntesis de Pared Celular	M	16	Colilglicinahidrolasa	gil602619043	951	AK89_06560	36948	4,62	3,2	
Metabolismo de Aminoácidos	E	17	Proteína Hipotética AK89_04275	gil602619580	938	AK89_04275	49541	4,58	2,6	
Plegamiento y Procesamiento Proteico	O	18	Chaperona molecular DnaK	gil602618370	1360	<i>dnaK</i>	65585	4,63	2,5	
Estructura Ribosomal	J	19	Proteína ribosomal S1	gil602619573	929	AK89_04240	44564	4,66	2,5	

Estrés	S	20	Regulador de respuesta a estrés Gls24	gi 602619010	873	AK89_06350	20148	4,63	2,3	
--------	---	----	---------------------------------------	--------------	-----	------------	-------	------	-----	---

*T1: 6 horas de incubación, tanto en cocultivo como en cultivo individual para *Ent. mundtii*.

T2: 30 horas de incubación, tanto en cocultivo como en cultivo individual para *Ent. mundtii*.

^a Categoría funcional según la base de datos COG. Abreviaturas de una letra para las categorías funcionales COG: G: metabolismo y transporte de carbohidratos; C: producción y conversión de energía; K: transcripción; D: división celular y partición cromosómica; I: metabolismo lipídico; Q: biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R: solo predicción funcional general; M: estructura de la pared celular y biogénesis de membrana externa; E: transporte y metabolismo de aminoácidos; O: chaperonas moleculares y funciones relacionadas; J: traducción, incluyendo estructura de ribosomas y biogénesis; S: sin predicción funcional.

^b Las designaciones corresponden a las indicadas en los geles de la Figura 3.2.

^c Número de acceso en la base de datos NCBI.

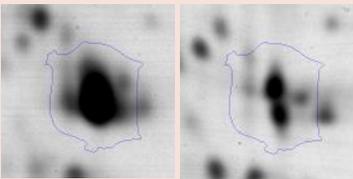
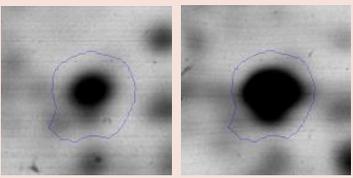
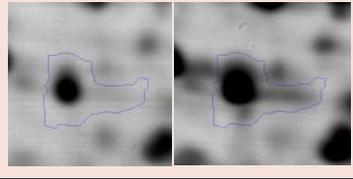
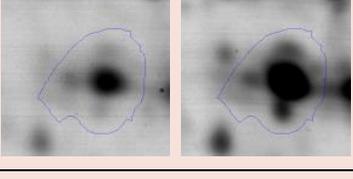
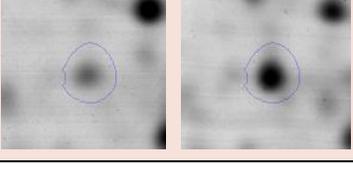
^d El score de proteína es $-10 * \text{Registro}(P)$, donde P es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento aleatorio. Las puntuaciones de proteína mayores a 81 se consideran significativas ($P < 0.05$).

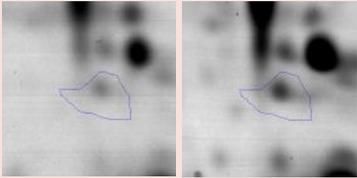
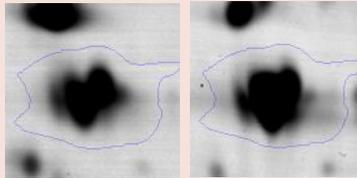
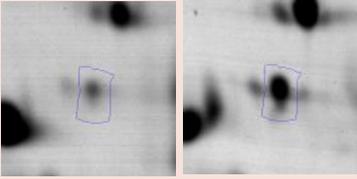
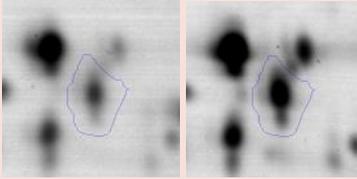
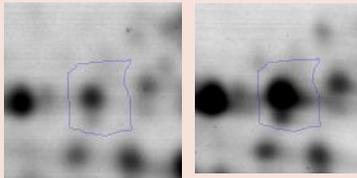
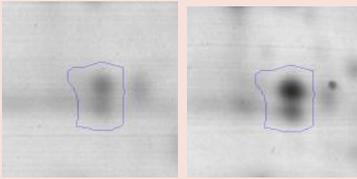
^e Masa Molecular (Da).

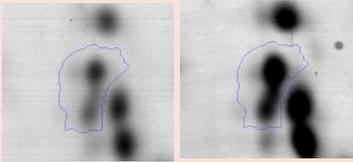
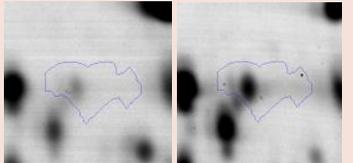
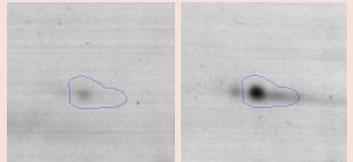
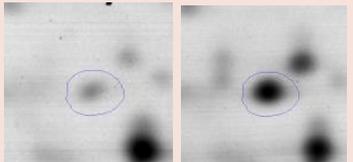
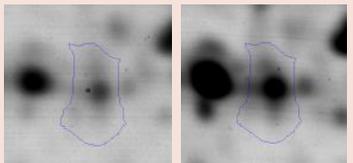
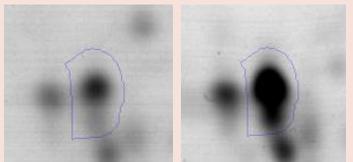
^f Punto isoeléctrico calculado.

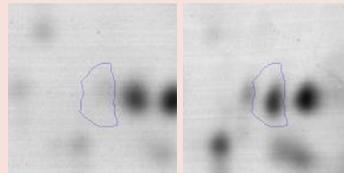
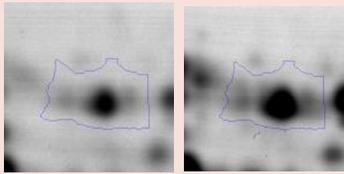
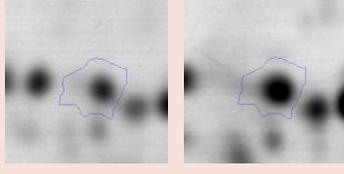
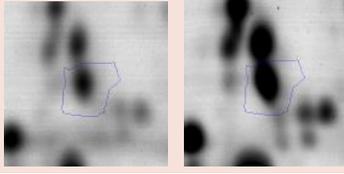
^g Veces de expresión: Volúmenes normalizados de *spot* en cocultivo / Volúmenes normalizados *spot* en crecimiento individual.

Tabla 3.3. Proteínas sobreexpresadas durante el crecimiento en cocultivo de *Ent. mundtii* a T1 con respecto a su crecimiento en cocultivo a T2 en SCM a 30°C

Función	COG ^a	Spot ^b	Proteína	N° de Acceso ^c	Score ^d	Gen	PM Teórico ^e	pl ^f	Veces de expresión ^g	Expresión diferencial Cocultivo T1/Cocultivo T2
Metabolismo de Carbohidratos	G	21	Fosfoglucomutasa / fosfomanomutasa	gil498429168	108	<i>UAC_01121</i>	63509	4,96	-2,2	
	G	22	familia 1 de la Fosfoglicerato mutasa	gil498428689	84	<i>gpmA</i>	33999	6,35	2,0	
	G	23	Glucosa-6-fosfato isomerasa	gil736681785	138	<i>pgi</i>	49574	4,99	1,9	
	G	24	Fosfoglicerato quinasa	gil736681519	186	<i>pgk</i>	42045	4,94	1,9	
	C	25	Fosfopiruvato hidratasa	gil498429079	134	<i>eno</i>	46496	4,60	1,9	

	G	26	Fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilación dependiente de NADP(+))	gil498430058	134	AK89_05050	52733	4,81	2,0	
	G	27	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa tipo I	gil736681521	270	AX758_08405	35827	5,08	1,5	
	G	28	Transcetolasa	gil602617512	147	AK89_14370	49060	5,04	2,4	
Transporte de Azúcares	G	29	Fosfoenolpiruvato fosfotransferasa	gil736682554	121	AK89_05300	63384	4,69	2,0	
Metabolismo de Aminoácidos	E	30	Glutamina sintetasa	gil498430289	109	AK89_07820	50870	5,06	2,4	
	E	31	Amino peptidasa	gil558689945	227	pepT	45091	4,58	1,9	

	E	32	Dipeptidasa PepV	gil7366833 14	154	AK89_08025	51939	4,62	2,0	
	O	33	Peptidasa M13	gil4984304 18	111	AK89_07270	72189	4,71	2,9	
Traducción	J	34	Leucina--tARN ligasa	gil7366839 66	130	<i>leuS</i>	92016	4,99	3,4	
Metabolismo de Nucleótidos	F	35	Adenilosuccinato Sintasa	gil7366838 80	168	<i>purA</i>	48097	5,49	2,7	
Transcripción	K	36	Subunidad alfa-ADN polimerasa dirigida por ARN	gil4925443 74	83	<i>rpoA</i>	35276	4,99	1,9	
Estrés	S	37	Proteína de estrés general, familia Asp23/Gls24	gil4984296 07	98	AK89_02030	20130	9,19	3,1	

Biosíntesis de Pared Celular	M	38	Colilglicinohidrolasa	gi 736682868	111	AK89_06560	36948	4,62	3,2	
Producción y Conversión de Energía	C	39	ATP sintasa subunidad alfa	gi 63091861	106	atpA	56590	5,01	2,0	
	C	40	2-oxoisovalerato deshidrogenasa	gi 736683518	243	AK89_08915	35393	4,70	1,9	
	C	41	FOF1 ATP sintasa subunidad beta	gi 736681478	84		51170	4,72	2,0	

*T1: 6 horas de incubación en cocultivo.

T2: 30 horas de incubación en cocultivo.

^a Categoría funcional según la base de datos COG. Abreviaturas de una letra para las categorías funcionales COG: G: metabolismo y transporte de carbohidratos; C: producción y conversión de energía; K: transcripción; D: división celular y partición cromosómica; I: metabolismo lipídico; Q: biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R: solo predicción funcional general; M: estructura de la pared celular y biogénesis de membrana externa; E: transporte y metabolismo de aminoácidos; O: chaperonas moleculares y funciones relacionadas; J: traducción, incluyendo estructura de ribosomas y biogénesis; S: sin predicción funcional.

^b Las designaciones corresponden a las indicadas en los geles de la Figura 3.2.

^c Número de acceso en la base de datos NCBI.

^d El score de proteína es $-10 * \text{Registro}(P)$, donde P es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento aleatorio. Las puntuaciones de proteína mayores a 81 se consideran significativas ($P < 0.05$).

^e Masa Molecular (Da).

^f Punto isoeléctrico calculado.

^g Veces de expresión: Volúmenes normalizados de spot en cocultivo T1 / Volúmenes normalizados spot en cocultivo T2.

B. Análisis proteómico para ECEH

Resultados

Cuando se analizó la expresión diferencial de ECEH durante su crecimiento en cocultivo con *Ent. mundtii* CRL35 en el sistema experimental cárnico, se identificaron con éxito un total de 45 proteínas expresadas diferencialmente que mostraron un valor entre 1,7 a 2,5 veces de diferencia ($p < 0.05$). Estas fueron relacionadas a diferentes funciones celulares y asignadas a las correspondientes categorías funcionales de acuerdo a la base de datos COG, las cuales estuvieron reprimidas o sobreexpresadas según el análisis comparativo realizado (Tablas 3.4 y 3.5).

Expresión diferencial de proteínas de *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 creciendo en cocultivo con respecto a su crecimiento individual

Cuando se compararon los proteomas durante el crecimiento en cocultivo con respecto al crecimiento individual en SCM, se obtuvo una represión significativa en la expresión de proteínas durante el crecimiento de ECEH en cocultivo en ambos tiempos analizados (T1 y T2), con excepción de dos *spots* que se vieron sobreexpresados a T2.

Fueron 11 las proteínas reprimidas a T1, entre 1,7-2,5 veces disminuidas, (Tabla 3.4, Figura 3.7A), las cuales se encontraron relacionadas con:

- Metabolismo de aminoácidos (45,45%),
- Metabolismo de nucleótidos (18,18%),
- Traducción (9,09%),
- Transcripción (9,09%),
- Plegamiento y procesamiento proteico (9,09%),
- Producción y conversión de energía (9,09%).

Por otro lado, a T2, 20 proteínas identificadas también resultaron reprimidas entre 2,0 y 6,1 veces y solo 2 se detectaron en mayores concentraciones en cocultivo con respecto al cultivo individual (Figura 3.7B). Aquellas 20 proteínas reprimidas, se relacionaron con:

- Metabolismo de aminoácidos (42,11%),
- Traducción (10,53%),

- Plegamiento y procesamiento proteico (10,53%),
- Estrés (10,53%),
- Transporte (10,53 %),
- Producción y conversión de energía (5,26%),
- Metabolismo de carbohidratos y transporte de azúcares (5,26%)
- Catabolismo de metabolitos secundarios (5,26%)

Las dos únicas proteínas de ECEH que se sobreexpresaron en cocultivo fueron la serina hidroximetil transferasa, relacionada al metabolismo de aminoácidos y la dihidrolipoil-lisina-residuo succiniltransferasa del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa, involucrada en la producción y conversión de energía (Tabla 3.4).

En resumen, el metabolismo de aminoácidos resultó mayoritariamente reprimido durante el crecimiento de ECEH en cocultivo con respecto a su crecimiento individual, en ambos tiempos evaluados.

En contraste, cuando *Ent. mundtii* creció en cocultivo con ECEH sobreexpresó proteínas relacionadas principalmente con el metabolismo de aminoácidos (T1), metabolismo de carbohidratos y a la producción/conversión de energía (T2). Estos resultados indicarían que ECEH habría experimentado una desventaja adaptativa durante el cocultivo con la BL (Figura 3.7B).

Expresión diferencial de proteínas de ECEH al comparar su crecimiento en cocultivo en ambos tiempos analizados (T1 y T2)

Durante el crecimiento en cocultivo de ambos microorganismos en SCM, se comparó la expresión diferencial de proteínas de ECEH a las 6 h durante su crecimiento exponencial (T1) con respecto a lo ocurrido a T2 (30 h, fase de muerte). En este estudio se identificaron 13 proteínas expresadas diferencialmente ($p < 0,05$; 1,8-2,5 veces) y en todos los casos se registró sobreexpresión a las 30 h.

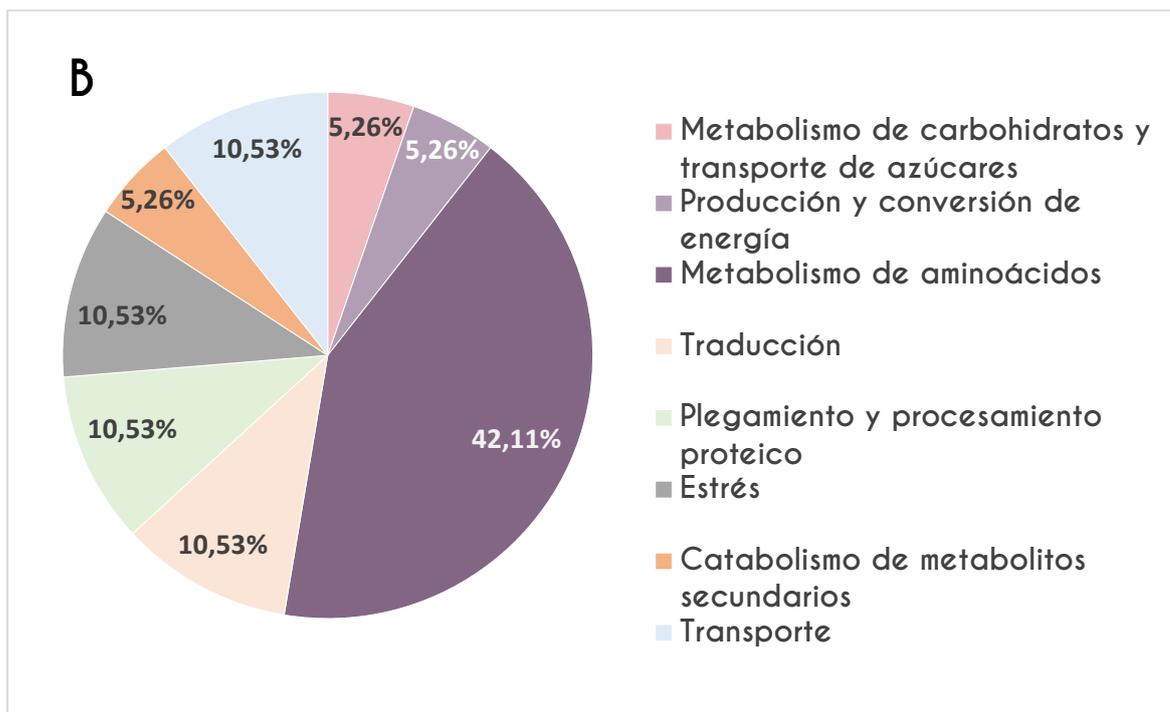
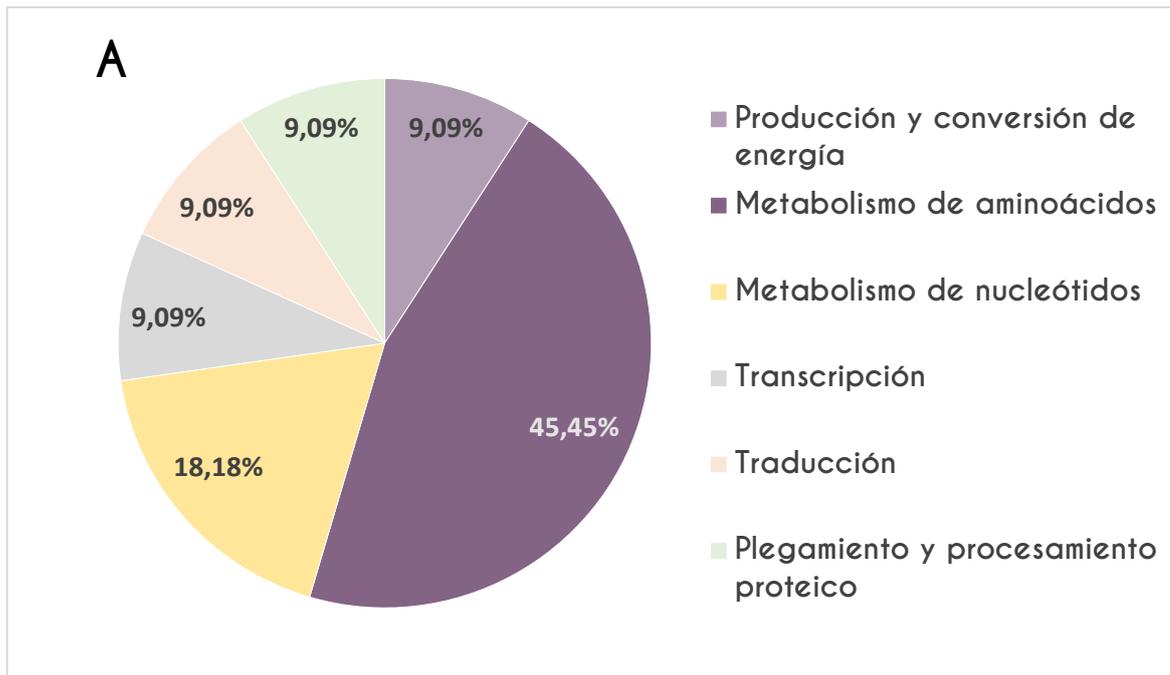
Se observó que las proteínas sobreexpresadas pertenecen a diferentes categorías funcionales (Tabla 3.5, Figura 3.7C), a saber:

- Producción y conversión de energía (23,08%),
- Estrés (23,08%),
- Metabolismo de aminoácidos (15,38%),
- Transcripción (15,38%),
- Transporte de azúcares (7,69%),
- Metabolismo de nucleótidos (7,69%),

- Biosíntesis de pared celular (7,69%).

De manera que cuando ECEH se encuentra en fase de muerte gatilla la sobreexpresión principalmente de proteínas de estrés y de producción de energía para hacer frente a las condiciones hostiles del ambiente incluyendo la presencia de la BL quien se encuentra en franca ventaja competitiva con respecto a ECEH en esta etapa del cocultivo. De hecho la población láctica es superior y se encuentra en una estable fase estacionaria, lo que explicaría que esta bacteria no haya gatillado la sobreexpresión de proteínas en este momento del cocultivo (Figura 3.3).

En los tres análisis comparativos realizados del proteoma de ECEH, el mayor número de proteínas expresadas diferencialmente se relacionó con metabolismo de aminoácidos, nucleótidos, estrés y producción de energía. Cuando se comparó el crecimiento en cocultivo con el crecimiento individual, se observó represión de proteínas, por el contrario cuando comparamos dos momentos diferentes del crecimiento en cocultivo se observó sobreexpresión de proteínas a las 30 h de incubación (T2) en SCM (Figura 3.7).



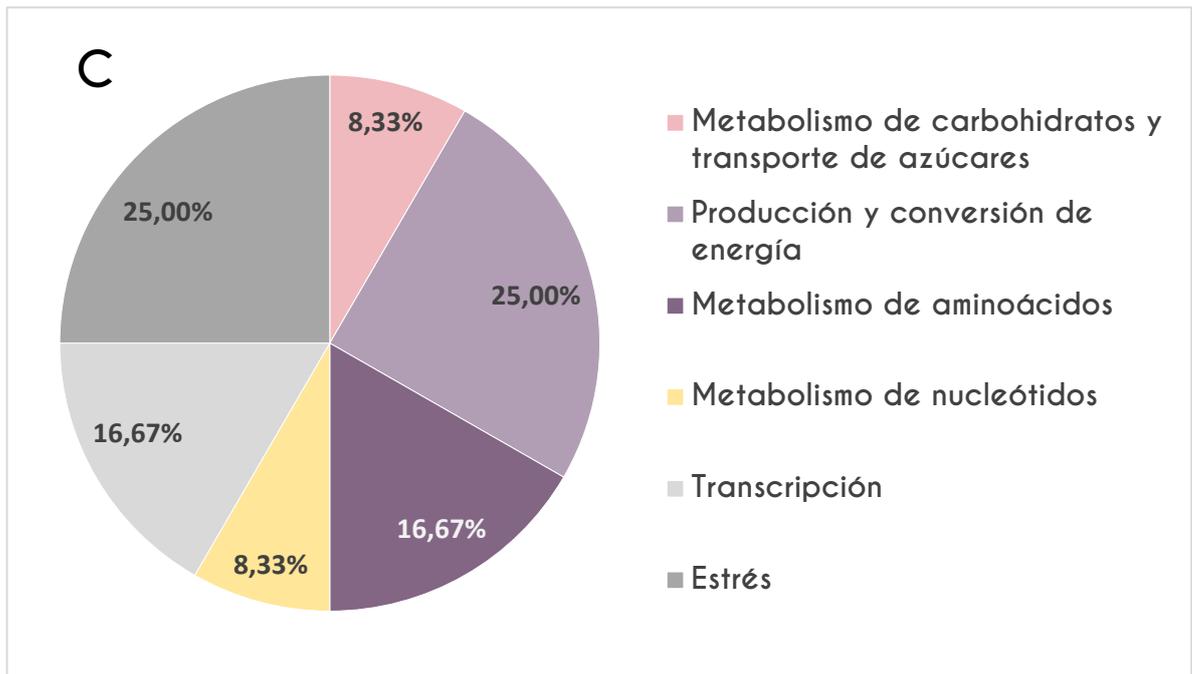


Figura 3.7. Abundancia relativa (%) de las proteínas diferencialmente expresadas por ECEH según sus categorías funcionales: **(A)** Proteínas reprimidas en cocultivo T1 versus cultivo individual T1; **(B)** Proteínas reprimidas en cocultivo T2 versus cultivo individual T2; **(C)** Proteínas sobreexpresadas Cocultivo T2 versus Cocultivo T1

Análisis funcional e interacción de proteínas expresadas diferencialmente por ECEH

Utilizando la base de datos, análisis y visualización STRING v10.05 y Cytoscape v3.6.1, se construyeron las redes de interacción proteína-proteína para cada conjunto de proteínas expresadas diferencialmente por ECEH en los tres análisis proteómicos llevados a cabo (Figura 3.7): **i)** proteínas reprimidas por ECEH en cocultivo con respecto a su crecimiento individual a T1 (Figura 3.8); **ii)** proteínas reprimidas por ECEH en cocultivo con respecto a su crecimiento individual a T2 (Figura 3.9), **iii)** proteínas de ECEH sobreexpresadas en cocultivo a T2 con respecto al cocultivo a T1 (Figura 3.10). Las proteínas están representadas por nodos y la fuerza de las diferentes interacciones está representada por el grosor de las líneas que las une. En las figuras Figura 3.8A, Figura 3.9A y Figura 3.10A se muestran las redes obtenidas mediante STRING y se destacan en círculos las interacciones de mayor intensidad observadas. Las redes obtenidas mediante el análisis en el programa Cytoscape se observan en las Figura 3.8B, Figura 3.9B y Figura 3.10B, donde el tamaño de los nodos refleja en valores absolutos las veces de expresión de cada proteína en las condiciones estudiadas. En estas redes las proteínas sin interacción no son representadas.

Fueron 11 las proteínas reprimidas por ECEH en cocultivo con respecto a su crecimiento individual a T1, representadas por 11 nodos (Figura 3.8A). De las 11 proteínas, 5 no presentaron interacciones entre ellas, mientras que se observaron 2 grupos, de 3 proteínas cada uno, relacionados principalmente con el metabolismo y transporte de aminoácidos. Cada grupo presentó 2 interacciones entre sus proteínas. Las proteínas participantes de esta red tuvieron una diferencia de expresión de 2,5 a 1,7 veces. Si bien en este caso se trata de proteínas reprimidas, es decir, las veces de expresión constituyen valores negativos, la red construida (Figura 3.8B) exhibe las veces de expresión en valores absolutos y por lo tanto demuestra aquellas proteínas que presentaron mayor represión, evidenciándose que la proteína de unión al sustrato del transportador ABC de arginina (ArtJ), 5-metiltetrahydropteril triglutamato-homocisteína metiltransferasa (MetE) y 3-isopropilmalato dehidratasa subunidad grande (LeuC) fueron aquellas que mayor represión experimentaron (2,5, 2,4 y 2,3 veces respectivamente).

Por otro lado, fueron 19 las proteínas reprimidas por ECEH en cocultivo con respecto a su crecimiento individual a T2 y están representadas en 16 nodos en la Figura 3.9A, ya que la identificación de tres de los *spots* resultó en la misma proteína

(glutamato descarboxilasa). En dicha red, se observa que de esas 16 proteínas, 3 no poseen interacciones con el resto y 2 presentan relación exclusiva entre ellas. Las interacciones de mayor magnitud están relacionadas con el metabolismo y transporte de aminoácidos, transcripción y modificaciones postraduccionales (Figura 3.9A). Este grupo de proteínas fueron reprimidas entre 2,0 y 6,1 veces (valores absolutos) en cocultivo con respecto al cultivo individual de ECEH a T2, donde la proteína periplásmica de unión a taurina (TauA) fue la que mayor represión demostró (6,1 veces), seguida por la proteína taurina dioxigenasa dependiente de alfa-cetoglutarato (TauD) (4,5 veces).

En la red observada en la Figura 3.10A se representan las 13 proteínas sobreexpresadas en cocultivo a T2 con respecto a T1, de las cuales 6 de ellas no presentó interacción con el resto. Las interacciones de mayor intensidad entre las proteínas del grupo fueron aquellas pertenecientes a producción y conversión de energía y a modificaciones postraduccionales. Este conjunto de proteínas fueron sobreexpresadas entre 1,9 y 5,2 veces por ECEH a T2 en cocultivo, siendo PflB (formato acetiltransferasa) y ClpB (proteína chaperona ClpB) aquellas con mayor diferencia de expresión (5,2 y 3,8 veces respectivamente) (Figura 3.10B).

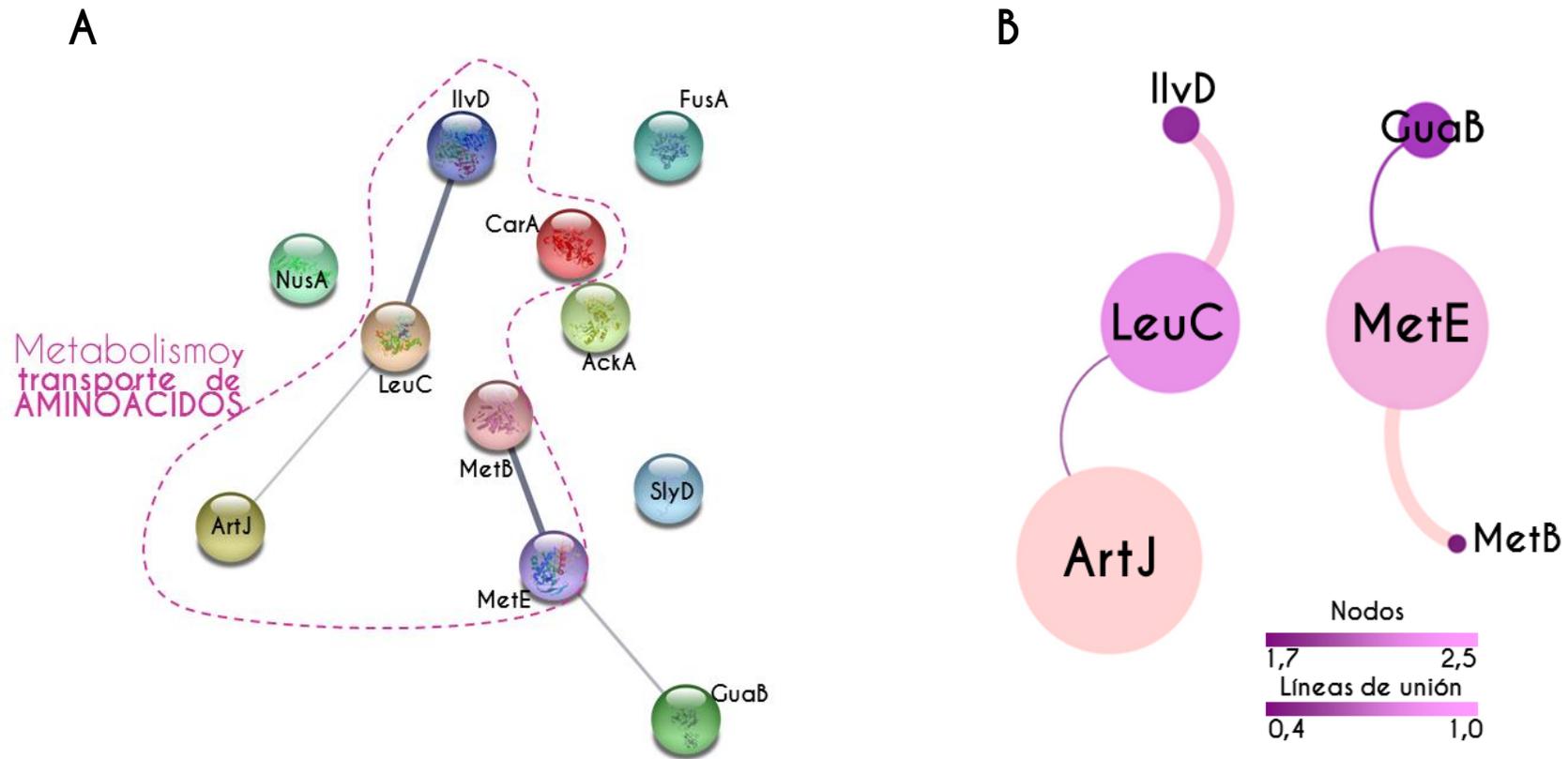


Figura 3.8. Red de interacción de proteínas reprimidas por ECEH en cocultivo con respecto a su cultivo individual a T1. Las proteínas están representadas por nodos mientras que sus interacciones por líneas. La fuerza de las diferentes interacciones está dada por el grosor de las líneas. **(A)** Red construida utilizando STRING v10.05. Los círculos agrupan las proteínas relacionadas con el metabolismo y transporte de aminoácidos. **(B)** Red construida utilizando Cytoscape v3.6.1. El tamaño de los nodos representa de forma proporcional las veces de expresión en valores absolutos de cada proteína representada. La gama de colores presentada en líneas de unión y nodos indican la magnitud de la interacción y veces de expresión respectivamente, siendo los mayores valores representados en color rosado y los menores en color violeta.

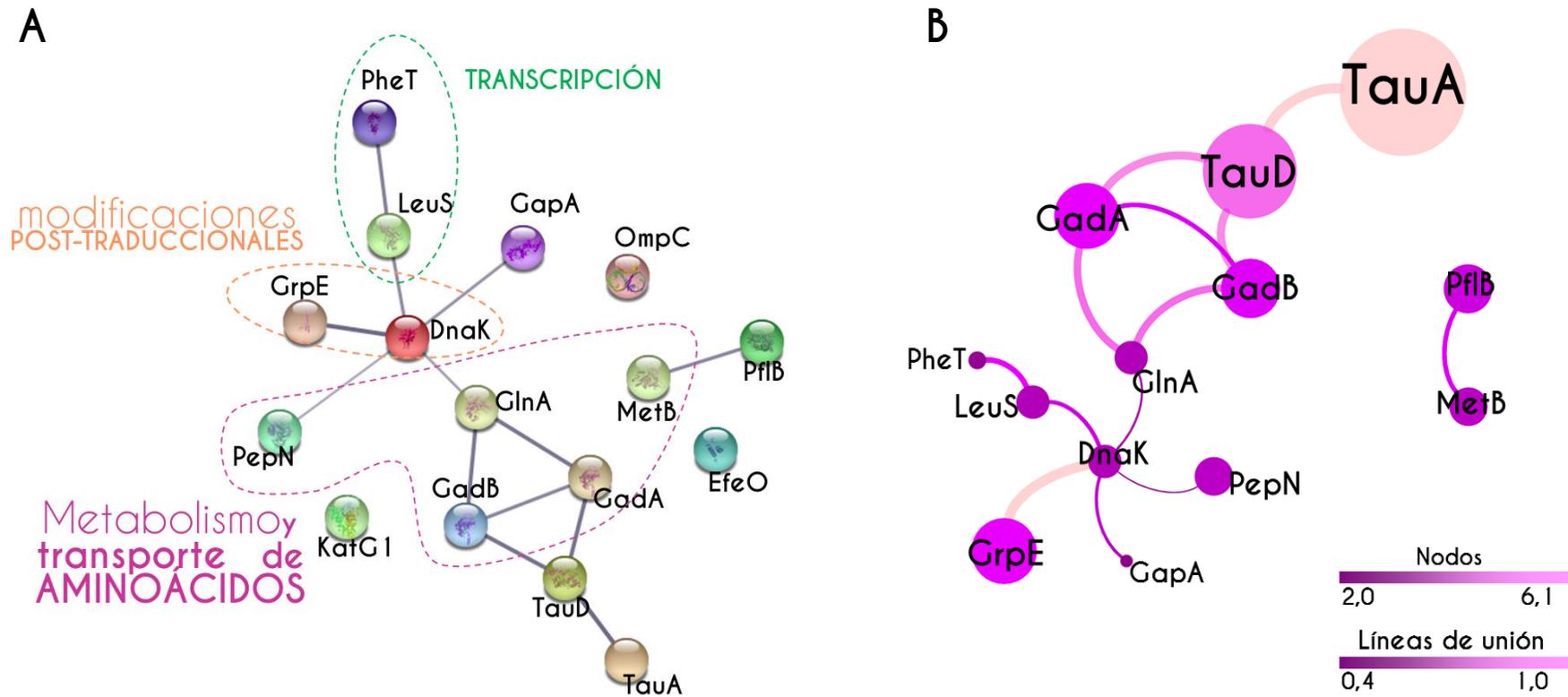


Figura 3.9. Red de interacción de proteínas reprimidas por ECEH en cocultivo con respecto a su cultivo individual a T2. Las proteínas están representadas por nodos mientras que sus interacciones por líneas. La fuerza de las diferentes interacciones está dada por el grosor de las líneas. **(A)** Red construida utilizando STRING v10.05. Los círculos agrupan las proteínas relacionadas con el metabolismo y transporte de aminoácidos, transcripción y modificaciones postraduccionales. **(B)** Red construida utilizando Cytoscape v3.6.1. El tamaño de los nodos representa de forma proporcional las veces de expresión en valores absolutos de cada proteína representada. La gama de colores presentada en líneas de unión y nodos indican la magnitud de la interacción y veces de expresión respectivamente, siendo los mayores valores representados en color rosado y los menores en color violeta.

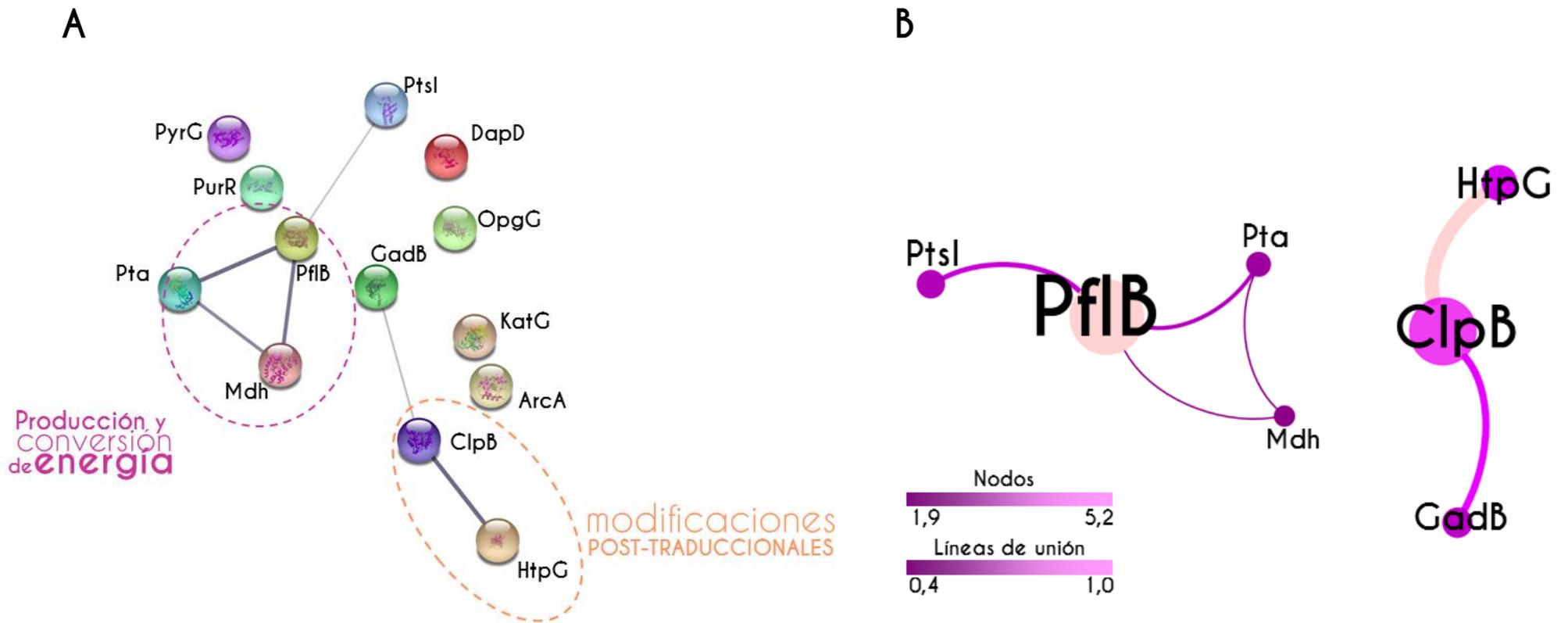


Figura 3.10. Red de interacción de proteínas sobreexpresadas en cocultivo a T2 con respecto al cocultivo T1. Las proteínas están representadas por nodos mientras que sus interacciones por líneas. La fuerza de las diferentes interacciones está dada por el grosor de las líneas. **(A)** Red construida utilizando STRING v10.05. Los círculos agrupan las proteínas relacionadas con la producción y conversión de energía y modificaciones post-traduccionales. **(B)** Red construida utilizando Cytoscape v3.6.1. El tamaño de los nodos representa de forma proporcional las veces de expresión de cada proteína representada. La gama de colores presentada en líneas de unión y nodos indican la magnitud de la interacción y veces de expresión respectivamente, siendo los mayores valores representados en color rosado y los menores en color violeta.

Discusión

Al comparar con su crecimiento individual, ECEH evidenció una fuerte represión de proteínas pertenecientes a diferentes grupos funcionales tanto a 6 como a 30 h de crecimiento en cocultivo con la BL. La mayor proporción de proteínas reprimidas se relacionaron con el metabolismo de aminoácidos. Además, en las primeras horas de incubación (T1), también se encontraron reprimidas proteínas pertenecientes al metabolismo nucleotídico, mientras que en fase de muerte (T2), se destaca también la disminución en la expresión de proteínas involucradas en la traducción, plegamiento proteico y estrés. Este comportamiento de ECEH en presencia de la BL, refleja el menor rendimiento metabólico y fisiológicamente se observa una entrada anticipada en fase de muerte, la cual se produce recién a las 96 h cuando ECEH crece individualmente.

En contraste, como se describió anteriormente, *Ent. mundtii* fue capaz de sobreexpresar un amplio abanico de proteínas cuando creció en cocultivo con el patógeno, destacándose entre ellas las pertenecientes al metabolismo de carbohidratos y conversión de energía, lo cual refleja una actividad metabólica superior de la BL cuando conviven ambos microorganismos en cocultivo respecto al cultivo puro. Asimismo, se puede sugerir que la bacteria patógena ejerce un efecto neutro o ligeramente positivo en la actividad metabólica de la BL ya que se observa una cinética de crecimiento poco modificada a lo largo del tiempo y con fase estacionaria estabilizada respecto a su crecimiento independiente.

No hay antecedentes entorno al estudio de la expresión diferencial de proteínas de ECEH en cocultivo con otros microorganismos, sin embargo, se encuentra ampliamente estudiada su expresión de proteínas en respuesta a diferentes estímulos estresantes, con el fin de comprender los mecanismos que gobiernan la tolerancia y/o debilidad de este microorganismo a las distintas estrategias utilizadas para combatirlo. En este sentido, Bae y col. (2018) realizaron un análisis proteómico comparativo de *E. coli* O157:H7 con el fin de comprender su resistencia aumentada al tratamiento con ácido acético luego de la adición de sal. En contraste a lo esperado, y en armonía con lo obtenido en este trabajo, las proteínas expresadas diferencialmente no se relacionaron principalmente con proteínas de estrés, sino en su mayoría fueron proteínas metabólicas las que se encontraron diferencialmente expresadas. Es decir que la tolerancia y/o debilidad en respuesta a diferentes condiciones estresantes no siempre son el resultado de la síntesis de proteínas

relacionadas exclusivamente con estos fenómenos; por lo tanto, es necesario realizar mayores investigaciones en este sentido, para dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes.

Es necesario recordar que cuando las bacterias se someten a un factor de estrés intenso (shock), son capaces de desarrollar resistencia a factores de estrés ambiental diferentes, lo cual se conoce como “tolerancia cruzada”. La exposición a dichos factores de estrés ambiental, inducen la expresión de proteínas conocidas como “proteínas de choque”, cuya función principal es reparar el daño causado por el factor de estrés o eliminar los agentes de estrés (Yousef y Courtney, 2003). El regulador maestro de la respuesta general al estrés en *E. coli* consiste en una subunidad sigma de la ARN polimerasa, el factor RpoS (σ^S), que controla la expresión de más de 35 genes involucrados en la respuesta general al estrés (Bae y col., 2018). En nuestro estudio, las proteínas de estrés no fueron el grupo mayoritario afectado por la presencia de la bacteria láctica, lo cual indicaría que el patógeno no logró poner en marcha su complejo sistema de resistencia y tolerancia frente a las condiciones desfavorables producidas por la presencia de la cepa láctica en el nicho cárnico. Por el contrario, como se destacó anteriormente, aquellas más afectadas fueron las proteínas involucradas en diferentes vías metabólicas.

Por su parte, Bi y col. (2017) estudiaron las bases moleculares involucradas en la formación de células de *E. coli* O157:H7 subletalmente lesionada (SIC) inducida por dióxido de carbono de alta presión (HPCD: *High Pressure Carbon Dioxide*) utilizando métodos proteómicos libres de geles (iTRAQ). Según los resultados obtenidos por este grupo, las SIC sobrevivieron al tratamiento con HPCD al reducir la descomposición de carbohidratos, el transporte y el metabolismo de los lípidos, el transporte y el metabolismo de los aminoácidos, la transcripción y la traducción, la replicación y reparación del ADN. Los autores proponen la formación de SIC con baja actividad metabólica como una estrategia de supervivencia de *E. coli* O157:H7 contra HPCD. En línea con este razonamiento, la represión general observada en las proteínas de ECEH que arrojaron nuestros estudios, podría leerse también como una táctica o habilidad del patógeno para intentar sobrevivir en este escenario hostil dominado por la cepa láctica. Sin embargo, según los resultados fisiológicos en este estudio de tesis, ECEH se encontraba en proceso de muerte acelerada por la presencia de *Ent. mundtii*, de manera que, aun con la represión proteica observada pudo cursar la fase log hasta las 8 h, similar a lo observado durante su crecimiento individual y luego entrar indefectiblemente en fase de muerte. No

obstante, es necesario tener en cuenta la posibilidad de recuperación de dichas células remanentes y subletalmente lesionadas del patógeno. De hecho, Garcia-Gonzalez y col. (2007), postularon que las SIC generadas durante el tratamiento con HPCD podrían recuperarse durante el almacenamiento en condiciones favorables, lo que representa un riesgo potencial para la salud. Es por eso que cobra gran importancia la idea de implementar la combinación de barreras adicionales contra el patógeno a fin de atacarlo de manera estratégica y no permitir la recuperación de dichas células subletalmente lesionadas. Este enfoque fue descrito por Leistner (1994) como “tecnología de obstáculos”, y propone la utilización de múltiples barreras de pequeña intensidad en lugar de un factor antimicrobiano de mayor magnitud para lograr mayor efectividad de conservación y minimizar la pérdida de calidad organoléptica del alimento.

Por otro lado, Kocharunchitt y col. (2012) llevaron a cabo un interesante análisis transcriptómico y proteómico integrado para determinar la respuesta fisiológica de la cepa Sakai *E. coli* O157: H7 a condiciones de baja temperatura y actividad de agua experimentadas durante el enfriamiento de canales bovinas en aire frío. El análisis transcriptómico reveló la activación del regulador maestro de respuesta al estrés RpoS. En contraste, los datos proteómicos revelaron que varios procesos involucrados en la síntesis de proteínas fueron reprimidos, sugiriendo que durante el crecimiento en estas condiciones, en *E. coli* podría haber transcripción para producir el ARNm requerido para responder al estrés, pero carecer de los recursos celulares necesarios para la traducción. Los resultados obtenidos en este trabajo son coincidentes con estos reportes, y revelaron además que existe una represión general de proteínas cuando ECEH crece en cocultivo con una BL, lo cual podría sugerir también que existe una posible deficiencia en el aparato de traducción del microorganismo en estas condiciones, que no implica necesariamente una disminución en el mecanismo de transcripción.

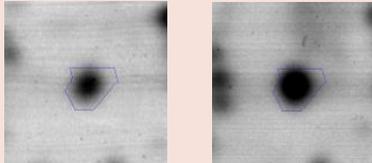
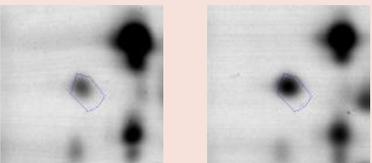
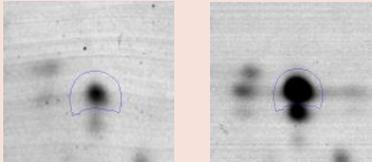
Cuando se comparó el crecimiento en cocultivo con el crecimiento individual de ECEH, se observó represión de proteínas del patógeno en el cocultivo, por el contrario, cuando se analizaron comparativamente dos momentos del crecimiento en cocultivo se observó sobreexpresión de proteínas a las 30 h de incubación (T2), momento en el cual ECEH atravesaba su fase de muerte. Es importante mencionar que entre las proteínas sobreexpresadas, aquellas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, así como también proteínas de estrés fueron

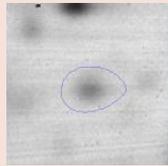
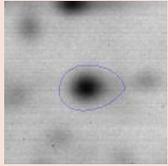
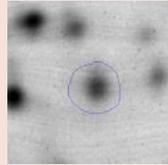
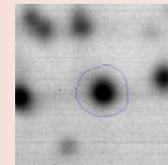
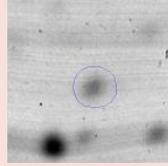
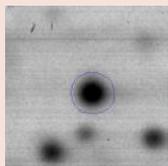
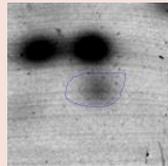
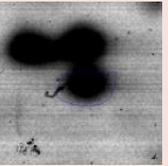
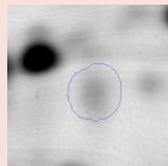
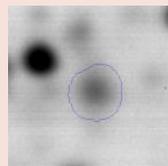
predominantes. Esto posiblemente está ocurriendo en respuesta a su lucha por la supervivencia y/o para evitar la muerte indeclinable que está ocurriendo en ese momento. Sin embargo, en el mismo análisis comparativo, se observó que el microorganismo competidor, *Ent. mundtii* presentaba una sobreexpresión de proteínas a las 6 h de cocultivo, relacionadas principalmente con el metabolismo del azúcar y el nitrógeno. Esto podría considerarse como una estrategia para lograr una elevada producción de energía y un óptimo crecimiento, estableciendo una ventaja competitiva respecto a *E. coli*.

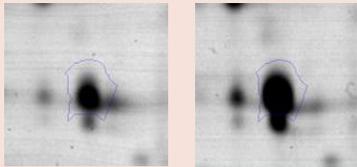
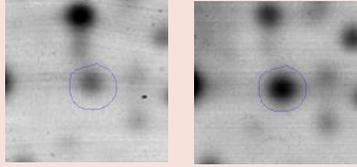
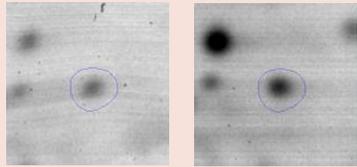
En resumen, los resultados obtenidos a partir del análisis proteómico abordado, sustentan el comportamiento fisiológico observado previamente: ECEH en franca desventaja de supervivencia frente a la cepa láctica manifestándose como un microorganismo en vías de extinción cuando crece en el sistema cárnico en presencia de *Ent. mundtii*. En esta situación de mayor vulnerabilidad del patógeno se podría esperar que la aplicación de barreras adicionales para su control sean más efectivas.

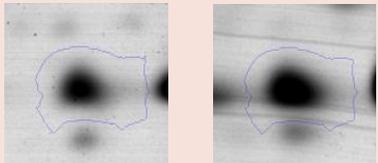
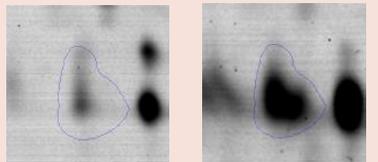
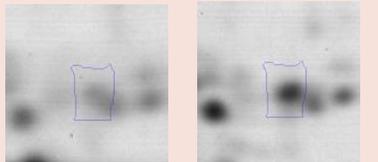
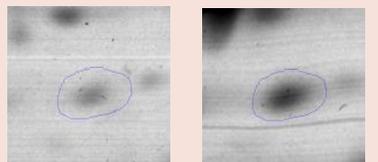
La información recopilada a través de este enfoque proteómico contribuye a dilucidar la respuesta adaptativa global de *E. coli* O157:H7 en un ambiente cárnico para permitir la selección y/o el desarrollo de potenciales estrategias efectivas para desactivar este patógeno.

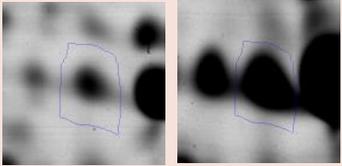
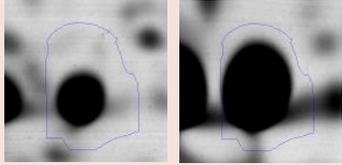
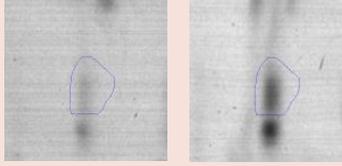
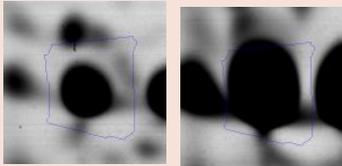
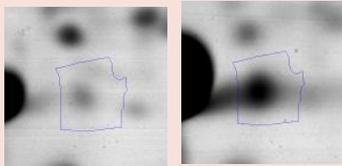
Tabla 3.4. Proteínas expresadas diferencialmente por ECEH durante su crecimiento en cocultivo con *Ent. mundtii* CRL35 con respecto a su crecimiento individual a T1 y T2 en SCM a 30°C.

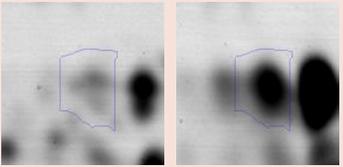
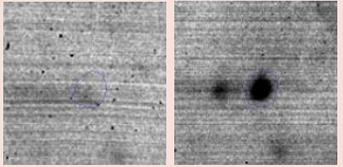
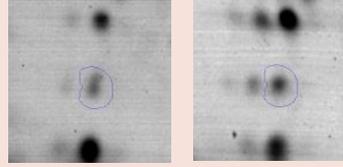
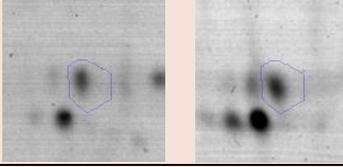
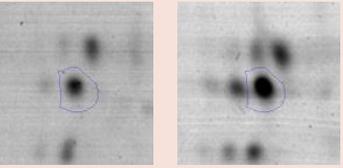
Función	COG ^a	Proteína	N° de Acceso ^b	Score ^d	Gen	PM teórico ^d	pI ^e	Veces de expresión ^f	Expresión diferencial Cocultivo / Crecim. Individual
T1*									
Producción y Conversión de Energía	C	Acetato quinasa	gi 446017850	923	<i>ackA</i>	43619	5,85	-1,8	
Transcripción	K	Factor de elongación de transcripción nusA, parcial	gi 771529055	1020	<i>nusA</i>	42261	4,53	-1,8	
Metabolismo de Aminoácidos	E	5-metiltetrahydropteril triglutamato - homocisteína metiltransferasa	gi 446076045	1220 1220 1210	<i>metE</i>	85126	5,61	-2,4 -2,4 -2,1	

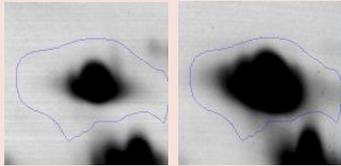
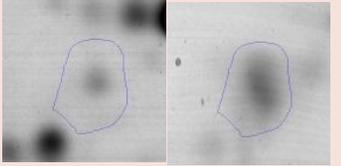
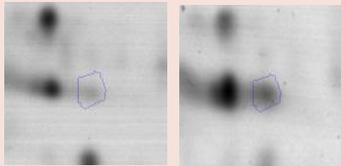
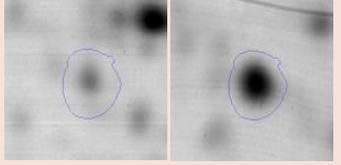
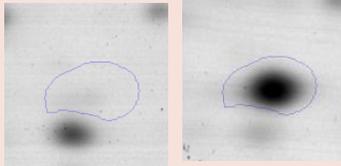
	E	Cistationina gama sintasa	gij485798137	1240	<i>metB</i>	41825	6,13	-1,7	 
	E G	Dihidroxi-ácido dehidratasa	gij377906350	1050	<i>ilvD</i>	64617	5,59	-1,8	 
	E	3-isopropilmalato dehidratasa subunidad grande	gij447063396	916	<i>leuC</i>	50363	5,90	-2,3	 
	E T	Transportador ABC de arginina. Proteína de unión al sustrato	gij485658024	756	<i>artJ</i>	27001	6,31	-2,5	 
Plegamiento Proteico	○	Peptidilprolil isomerasa, parcial	gij585370710	472	<i>slyD</i>	15265	4,31	-1,7	 

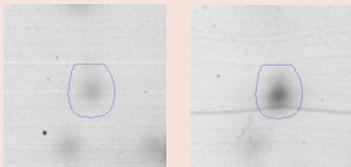
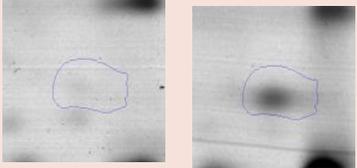
Traducción	J	Factor de elongación G	gij446046850 -	1220	<i>fusA</i>	77677	5,24	-1,7	
Metabolismo de Nucleótidos	E F	Carbamoil-fosfato sintasa. Subunidad pequeña	gij545256321 -	752	<i>carA</i>	41653	5,91	-1,9	
	F R	Inosina-5-monofosfato dehidrogenasa	gij692993475 -	1460	<i>gua</i> <i>B</i>	52303	6,02	-1,9	

Función	COG ^a	Proteína	Nº de Acceso ^b	Score ^c	Gen	PM teóric ^o ^d	pI ^e	Veces de expresió ⁿ ^f	Expresión diferencial Cocultivo / Crecim. Individual
T2*									
Metabolismo de Carbohidratos	C	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa tipo I	gi 331056066	744	<i>gapA</i>	31252	6,61	-2	
Producción y Conversión de Energía	C	piruvato formato-liase, parcial	gi 585367238	1080	<i>pflB</i>	82365	5,69	-2,7	
	C	Dihidrolipoil-lisina-residuo succiniltransferasa del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa	gi 487439769	947	<i>sucB</i>	43942	5,58	+2	
Metabolismo de Aminoácidos	E	Cistationina gamma-sintasa	gi 564925939	1080	<i>V415_15330</i>	48565	6,16	-2,5	

E	Glutamato descarboxilasa	gil692976899	537	<i>AIU 5_04 201</i>	53216	5,2 3	-3	
E	Glutamato descarboxilasa parcial	gil544880474	453	<i>gad B</i>	43402	5,4 2	-2,9	
E	Glutamato descarboxilasa, parcial	gil545145374 -	632	<i>gad A</i>	53120	5,2 2	-3	
E	Glutamato descarboxilasa	gil692976899	539	<i>gad A</i>	53216	5,2 3	-3,1	
E	Glutamato descarboxilasa	gil446281071	483	<i>gad B</i>	53264	5,2 9	-2,4	

	E	Glutamina sintasa	gi 723045049	861	<i>glnA</i>	52159	5,2 6	-2,4	
	E	Serina hidroximetil transferasa	gi 446841912	739	<i>glyA</i>	45477	6,0 3	+2,8	
	E	Amino peptidasa N	gi 485729121	826	<i>pep N</i>	99371	5,1 2	-2,5	
Traducción	J	Leucina--tARN ligasa	gi 928813394	895	<i>leuS</i>	97831	5,1 1	-2,4	
	J R	Fenilalanina--tARN ligasa subunidad beta	gi 486178371	1150	<i>pheT</i>	88091	5,1 7	-2,1	

Plegamiento proteico	○	Chaperona molecular DnaK	gil486185817	1760	<i>dnaK</i>	69216	4,8 3	-2,4	
	○	Proteína de shock térmico, parcial	gil52697878	490	<i>grpE</i>	16896	4,4 7	-3,1	
Estrés	p	Catalasa/peroxidasa HPI	gil490132057	1030	<i>katG</i>	80031	5,1 4	-3,2	
	p	Transportador de ion férrico	gil913459360	1120	<i>efeO</i>	39444	4,8 6	-2,1	
Transporte	p	Proteína periplásmica de unión a Taurina	gil383101757	1240	<i>tauA</i>	31575	6,3 3	-6,1	

	M	Porina	gij446788299	1030	<i>omp C</i>	40483	4,5 5	-2,3	
Catabolismo de Metabolitos Secundarios	Q	Taurina dioxigenasa dependiente de alfa-cetoglutarato	gij487445736	1130	<i>tauD</i>	32350	6,2 7	-4,5	

*T1: 6 h de incubación, tanto en cocultivo como cultivo individual.

T2: 30 h de incubación en cocultivo, y 96 h de incubación en cultivo individual

^a Categoría funcional según la base de datos COG. Abreviaturas de una letra para las categorías funcionales COG: G: metabolismo y transporte de carbohidratos; C: producción y conversión de energía; K: transcripción; D: división celular y partición cromosómica; I: metabolismo lipídico; Q: biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R: solo predicción funcional general; M: estructura de la pared celular y biogénesis de membrana externa; E: transporte y metabolismo de aminoácidos; O: chaperonas moleculares y funciones relacionadas; J: traducción, incluyendo estructura de ribosomas y biogénesis; S: sin predicción funcional.

^b Número de acceso en la base de datos NCBI.

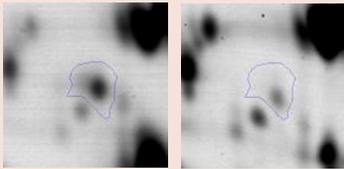
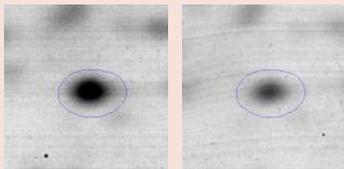
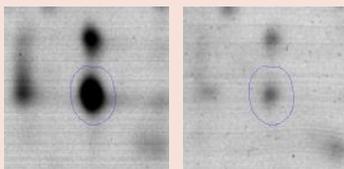
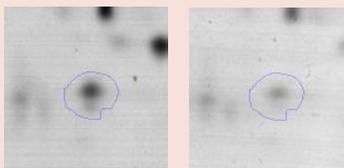
^c El score de proteína es $-10 * \text{Registro}(P)$, donde P es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento aleatorio. Las puntuaciones de proteína mayores a 81 se consideran significativas ($P < 0.05$).

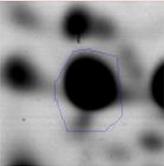
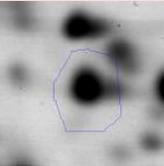
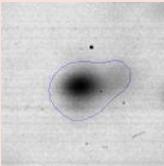
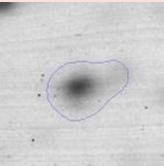
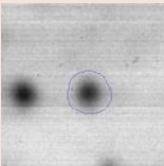
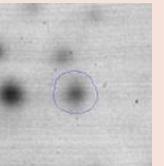
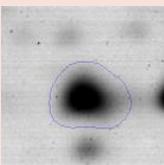
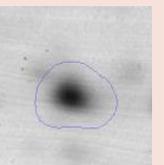
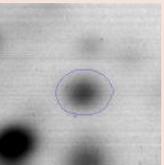
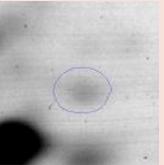
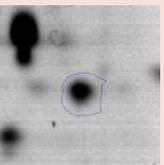
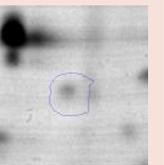
^d Masa Molecular (Da).

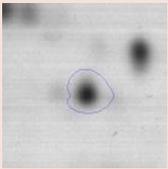
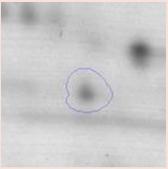
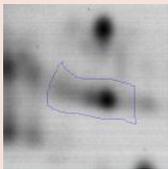
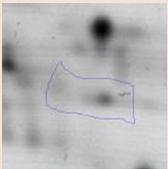
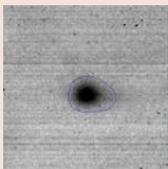
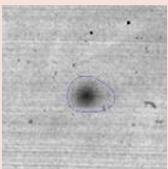
^e Punto isoeléctrico calculado.

^f Veces de expresión: Volúmenes normalizados de spot en cocultivo / Volúmenes normalizados spot en crecimiento individual.

Tabla 3.5. Proteínas expresadas diferencialmente por ECEH durante su crecimiento en cocultivo con *Ent. mundtii* a T2 con respecto a su crecimiento en cocultivo a T1 en SCM a 30°C.

Función	COG ^a	Proteína	N°de Acceso ^b	Score ^c	Gen	PM teórico ^d	pI ^e	Veces de expresión ^f	Expresión diferencial T2/T1
Metabolismo de Carbohidratos y Transporte de Azúcares	G	Fosfoenolpiruvato fosfotransferasa	gi 657341210 /	119	<i>ptsI</i>	63708	4,7 7	2,5	
Producción y Conversión de Energía	C	Malato dehidrogenasa parcial	gi 1016536138	146	<i>mdh</i>	28317	5,6 1	2,1	
	C	Formato acetiltransferasa I	gi 756415160 /	195	<i>pflB</i>	82365	5,6 2	5,2	
	R C	Fosfato acetiltransferasa	gi 754726897 /	143	<i>pta</i>	56200	5,3 9	2,3	

Metabolismo de Aminoácidos	E	Glutamato descarboxilasa, parcial	gi 835808727 /	110	<i>gadB</i>	46850	5,2 5	2,6		
	E	2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato N-succiniltransferasa	gi 693142726 /	116	<i>dapD</i>	30030	5,5 6	2,00		
Metabolismo de Nucleótidos	F	CTP sintasa, parcial	gi 558735510 -	192	<i>pyrG</i>	56285	5,6 3	2,1		
Transcripción	K	Represor de síntesis de nucleótido purina	gi 571183554	79	<i>purR</i>	16098	5,6 2	2,2		
	T K	Regulador de respuesta de unión a DNA	gi 487477377	107	??	27349	5,1 4	2,5		
Estrés	O	Proteína chaperona ClpB	gi 323971463	160	<i>clpB</i>	95428	5,3 3	3,8		

	O	Chaperona molecular HtpG, parcial	gi 692193109	98	<i>htpG</i>	65179	5,0 9	2,9	 
	p	Catalasa HPI	gi 146535	128	<i>katG</i>	80017	5,1 4	2,4	 
Biosíntesis de pared celular	p	Proteína de biosíntesis de glucanos G	gi 806456002	141	<i>mdo G</i>	58646	6,7 0	1,9	 

*T1: 6 h de incubación en cocultivo.

T2: 30 h de incubación en cocultivo.

^a Categoría funcional según la base de datos COG. Abreviaturas de una letra para las categorías funcionales COG: G: metabolismo y transporte de carbohidratos; C: producción y conversión de energía; K: transcripción; D: división celular y partición cromosómica; I: metabolismo lipídico; Q: biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R: solo predicción funcional general; M: estructura de la pared celular y biogénesis de membrana externa; E: transporte y metabolismo de aminoácidos; O: chaperonas moleculares y funciones relacionadas; J: traducción, incluyendo estructura de ribosomas y biogénesis; S: sin predicción funcional.

^b Número de acceso en la base de datos NCBI.

^c El score de proteína es $-10 * \text{Registro (P)}$, donde P es la probabilidad de que la coincidencia observada sea un evento aleatorio. Las puntuaciones de proteína mayores a 81 se consideran significativas ($P < 0.05$).

^d Masa Molecular (Da).

^e Punto isoeléctrico calculado.

^f Veces de expresión: Volúmenes normalizados de *spot* en cocultivo T2/ Volúmenes normalizados *spot* en cocultivo T1.

Estudios de adhesión a proteínas de la matriz extracelular cárnica (MEC)

Resultados

La colonización exitosa y el establecimiento de un microorganismo en la matriz alimentaria es una consecuencia directa de la adhesión bacteriana efectiva a los principales componentes de la matriz extracelular (Chagnot y col., 2013). La MEC presente entre las fibras musculares, se compone de dos clases principales de macromoléculas, las proteínas fibrosas y los proteoglicanos. Las proteínas fibrosas son los componentes predominantes de la MEC bovina, que comprenden esencialmente colágeno I, III y IV, fibronectina insoluble (i-fibronectina), laminina- $\alpha 2$ y elastina las cuales son los principales agentes de interacción durante la adhesión de los microorganismos a la carne (Chagnot y col., 2013). Por ello consideramos de gran importancia conocer el comportamiento de ambas cepas bacterianas en estudio frente a componentes claves de la matriz extracelular cárnica, tanto en su capacidad individual de adhesión como la influencia recíproca entre ambos microorganismos frente a este fenómeno.

Con este fin se realizó un ensayo en microplaca utilizando como sustratos colágeno IV y laminina. Se permitió la adhesión de forma individual y conjunta en iguales proporciones de *Ent. mundtii* CRL35 y ECEH a la superficie de la microplaca previamente tapizada con las proteínas de MEC. Luego de eliminar las células que no lograron su adhesión, aquellas células adheridas exitosamente fueron removidas y plaquedas en los medios agarizados correspondientes. El recuento bacteriano obtenido en cada condición representó el porcentaje de células adheridas con respecto al total de células colocadas.

Los resultados obtenidos, que se presentan en la Figura 3.8, demostraron que *Ent. mundtii* presentó muy buena capacidad de adhesión a ambas proteínas de MEC, observándose que más del 80% de las células agregadas lograron una óptima adhesión. Además, esta capacidad de adhesión no se vio afectada cuando *Ent. mundtii* se encontraba en presencia del patógeno, incluso su adhesión a laminina experimentó un incremento del 5%. Por su parte, ECEH, también demostró buena capacidad de adhesión a ambas proteínas de matriz extracelular (alrededor del 70% de las células agregadas) aunque menor a la experimentada por *Ent. mundtii*. Sin embargo, el patógeno no pudo conservar la misma capacidad de adhesión en

presencia de la BL, sino que, se evidenció una disminución en su capacidad de adhesión cuando se encontraba en presencia de *Ent. mundtii*, alcanzando tan solo un 54% de adhesión con respecto a las células colocadas (Figura 3.8).

La capacidad de adhesión diferencial observada de las cepas en estudio a las proteínas de la MEC sugiere que existe una ventaja competitiva de *Ent. mundtii* sobre el fenómeno de adhesión/colonización del alimento en presencia del patógeno.

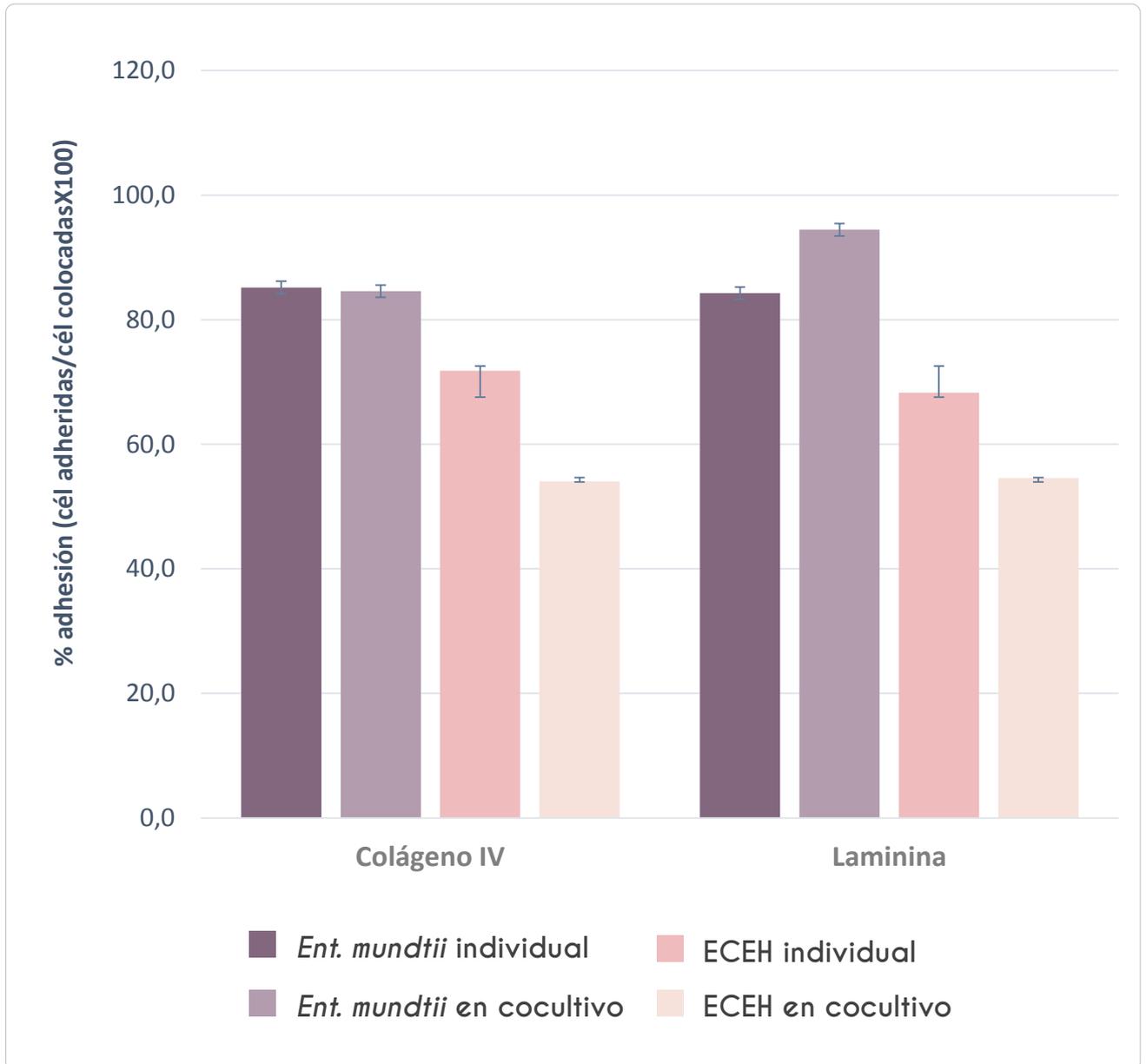


Figura 3.8. Capacidad de adhesión a Colágeno IV y Laminina de *Ent. mundtii* CRL35 y ECEH agregadas como cultivos individuales o mixtos (BL-ECEH). El nivel de adhesión se expresó en porcentaje teniendo en cuenta el número de células adheridas/ número células colocadas x 100.

Discusión

La adhesión bacteriana a superficies bióticas es un complejo proceso basado inicialmente en interacciones físicas no específicas entre las dos superficies participantes, que posteriormente dan lugar a interacciones de tipo específicas entre las proteínas de adhesión bacteriana y sus receptores (Yadav y col., 2015). Este último evento es cepa dependiente y la temperatura juega un papel muy importante en el proceso de unión (Zulfakar y col., 2012).

Se encuentra bien establecido, que la capacidad de un microorganismo patógeno para adherirse a las superficies de los alimentos puede influir directamente en su persistencia durante la etapa de fabricación así como también durante el comercio minorista y por ende en su capacidad para ocasionar infecciones (Rivas y col., 2006a). Estudios previos han demostrado que especies bacterianas como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 se adhieren preferentemente a componentes del tejido conectivo, como las fibras de colágeno (Frank, 2001). De hecho, nuestros estudios confirmaron la capacidad de este patógeno para adherirse a colágeno IV y laminina de forma efectiva. Sin embargo se pudo observar también que la presencia de *Ent. mundtii* logró reducir su capacidad de unión a las proteínas de MEC estudiadas. Jin y col. (2000) describieron un efecto similar al utilizar la cepa *Ent. faecium* 18C23, la cual inhibió eficazmente la adhesión de *E. coli* K88ac y K88MB al moco intestinal de cerdos.

El efecto observado en este estudio, donde *Ent. mundtii* CRL35 afecta la capacidad de adhesión de ECEH, cobra gran importancia si consideramos que se ha demostrado que la fuerza de unión de un microorganismo a las superficies de la carne interfiere en los procesos de eliminación física y química utilizados contra el patógeno (Benedict y col., 1990; Fratamico y col., 1996; Tamblyn y Conner, 1997). Es decir, las diferentes estrategias aplicadas para la remoción del patógeno serán más efectivas cuanto menor sea la fuerza con la cual éste se encuentre unido a los componentes de la MEC.

Por su parte, *Ent. mundtii*, demostró óptima capacidad de unión a colágeno IV y laminina. Además, la presencia del patógeno no modificó dicha capacidad de unión, por el contrario, la unión a laminina mostró un incremento en presencia de ECEH. En este sentido, estudios previos indican que la proteína AceA media la unión de *E. faecalis* OG1RF a colágeno tipo IV, tipo I y laminina (Nallapareddy y col., 2000).

Estos resultados sugieren que *Ent. mundtii* desarrolla frente al patógeno un comportamiento de competencia efectiva siendo el proceso de adhesión una de las herramientas utilizadas por la cepa láctica para establecer una concreta ventaja competitiva en su coexistencia con el patógeno. Apoyando esta tendencia, cabe destacar, que en los resultados de los estudios proteómicos, *Ent. mundtii* sobreexpresó en presencia de ECEH la proteína multifunción enolasa. Esta proteína fue descrita por Peng y col. (2014) como una proteína de unión a actina en *Ent. faecalis* lo que estaría indicando una estrategia de competencia adicional durante la adhesión a la carne.

Todo lo expuesto refleja la importancia de comprender el proceso de unión bacteriana a proteínas de la matriz alimentaria, para el desarrollo de intervenciones que interrumpan la colonización del alimento, contribuyendo así a reducir la contaminación y aumentar también la efectividad de las estrategias utilizadas contra el patógeno.

Efecto de *Ent. mundtii* CRL35 sobre la inducción del fago W933

Resultados

A través de este ensayo se buscó conocer si el microambiente de competencia y estrés generado por la convivencia e interacción de ECEH con *Ent. mundtii* CRL35 podría funcionar como un agente inductor del fago W933 que codifica para la toxina Stx1 y en consecuencia inducir la producción y liberación de la misma, lo cual constituiría un factor negativo al momento de usar esta BL como bioprotector en el alimento cárnico.

Para ello fue necesario contar con una cepa portadora del fago ya que el modelo utilizado hasta el momento, *E. coli* NCTC 12900, es una cepa carente de dicho bacteriófago. Por ello, se utilizó la cepa *E. coli* C600 Δ tox, la cual presenta en su genoma la incorporación del fago W933 mediante recombinación homóloga (Gamage y col., 2003). En dicho fago incorporado el gen *stx* fue reemplazado por el gen *gfp* (*Green Fluorescent Protein*), y por lo tanto, no expresa la toxina, permitiéndonos estudiar el fenómeno de inducción sin asumir riesgos de bioseguridad.

Se monitoreó el proceso de inducción mediante la cuantificación del descenso de viabilidad (recuento de UFC/ml) producto de la lisis, como también la cuantificación de las partículas virales (recuento de ufp/ml) liberadas al

sobrenadante de cultivo luego del contacto con el potencial agente inductor. Ambos parámetros fueron evaluados durante las primeras 24 horas de contacto de *E. coli* C600 Δ tox con *Ent. mundtii* CRL35.

En la Figura 3.9 se observa el crecimiento de *E. coli* C600 Δ tox en forma individual, presentando una fase exponencial de crecimiento de aproximadamente 5 a 6 h, ingresando luego a su fase estacionaria manteniendo la viabilidad en aproximadamente 8,5 log UFC/ml hasta el final del tiempo de incubación. Por el contrario, cuando se agregó ciprofloxacina, un antibiótico con conocida capacidad de inducir el ciclo lítico del fago y por ende la producción de toxina en cepas toxigénicas de ECEH, el comportamiento de *E. coli* C600 Δ tox se modificó y luego de 3 h de crecimiento exponencial, se produjo un descenso abrupto de viabilidad registrándose una caída de aproximadamente 3 órdenes logarítmicos. Al evaluar el crecimiento de *E. coli* C600 Δ tox en presencia de *Ent. mundtii*, observamos que presenta la misma tendencia que aquella observada durante su crecimiento individual, no registrándose caídas en la viabilidad durante todo el periodo evaluado (Figura 3.9).

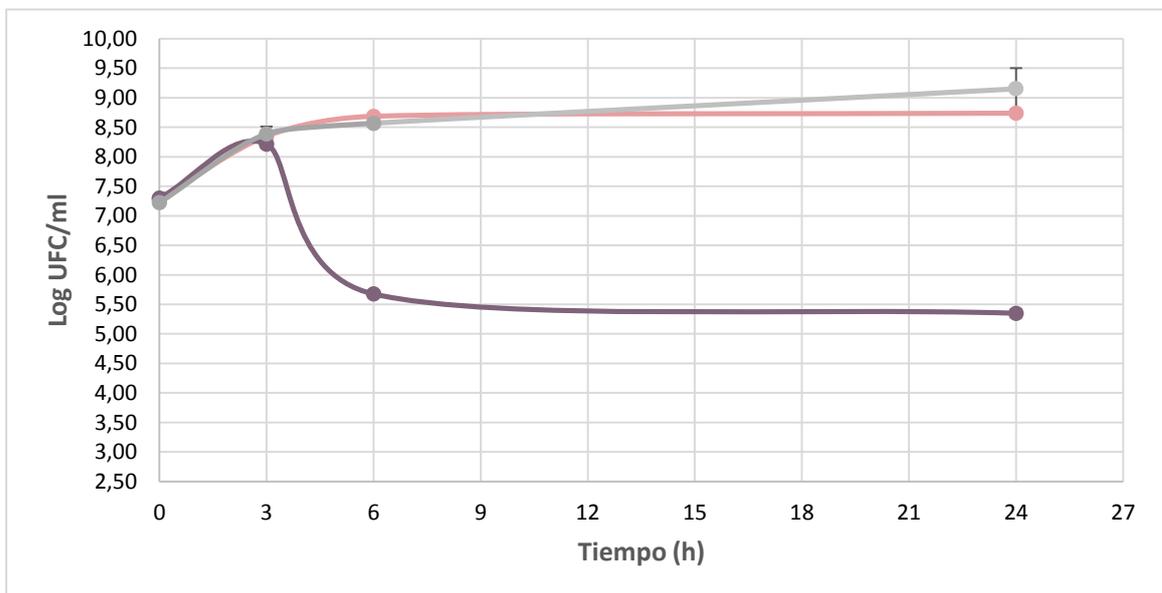


Figura 3.9. Crecimiento determinado mediante recuento de colonias de *E. coli* C600 Δ tox en LB a 37°C de forma individual (línea rosa), en presencia de ciprofloxacina (ATB) (línea violeta) y en presencia de *Ent. mundtii* (línea gris).

Con el fin de evidenciar el proceso de inducción en las diferentes condiciones estudiadas, se llevó a cabo la titulación del fago en el sobrenadante de cultivo

luego de 4 h de incubación para las diferentes condiciones estudiadas. También se analizó la concentración del fago a las 24 h para descartar un efecto inductor tardío de la BL

Según los resultados obtenidos no se detectaron partículas virales en aquellos sobrenadantes provenientes del crecimiento de *E. coli* C600Δtox en forma individual y tampoco en presencia de *Ent. mundtii* CRL35 en ambos tiempos estudiados. Sin embargo, en los sobrenadantes provenientes del crecimiento de *E. coli* C600Δtox con ciprofloxacina, se obtuvieron placas de lisis para ambos tiempos estudiados como se muestra en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Titulación del fago W933 mediante el recuento de placas de lisis presentes en el sobrenadante de cultivo de *E. coli* C600Δtox cuando se cultivó sola (control), en presencia del antibiótico o de *Ent. mundtii* CRL35, luego de 4 y 24 h de incubación a 30°C.

Tratamiento/Tiempo	Control	Ciprofloxacina 60 ng/ml	<i>Ent. mundtii</i> CRL35 (10 ⁷ UFC/ml)
T4	nd	6,7 Log UFP/ml	nd
T24	nd	7 Log UFP/ml	nd

nd: no detectado

Los resultados de este ensayo indican que la BL en estudio no activa el fenómeno de inducción del fago W933, es decir, que el efecto anti ECEH observado no sería acompañado por lisis y producción de toxina. Aunque estos ensayos deberán extrapolarse a escenario real, a partir de estos resultados se avizora el uso seguro de este cultivo bioprotector para la conservación de carnes frescas.

Discusión

Como se expuso anteriormente, la presencia de *Ent. mundtii* en SCM ejerce sobre el patógeno un efecto inhibitor que se ve reflejado en el descenso de su viabilidad. Sin embargo, resultaba necesario conocer si el efecto ejercido por *Ent. mundtii* era acompañado por la inducción del bacteriófago W933 que codifica las toxinas tipo shiga, es decir, si *Ent. mundtii* CRL35 funcionaba como un agente inductor de ese fago lisogénico.

Nuestros resultados indicaron que *Ent. mundtii* no ejerció un efecto inductor sobre *E. coli* C600Δtox, es decir no habría expresión y liberación de la toxina ni de partículas virales en presencia de la cepa láctica.

Estos hallazgos revisten gran importancia si consideramos que existen antecedentes que indican que ECEH tiene el potencial de producir toxina Shiga en los alimentos, y que la exposición a estas toxinas es generalmente a través del consumo de carnes rojas contaminadas, leche y sus productos derivados (Rangel y col., 2005). Weeratna y Doyle (1991) han demostrado que la inoculación de ECEH en alimentos produce altos niveles de la toxina en leche (306 ng / ml) y carne (452 ng / ml).

Además, se registraron brotes de SUH donde no se hallaron bacterias vivas en las muestras de alimentos (Goh y col., 2002), indicando que en ese contexto sería la toxina el agente desencadenante del brote. Respaldando esta idea, Rasooly y Do (2010), demostraron que la toxina Shiga 2 (Stx2) es estable al calor y que la pasteurización de la leche no reduciría la actividad biológica de Stx2. Por su parte, Robinson y col. (2006) hallaron que Stx no solo es capaz de afectar al hospedador a través de su unión a receptores Gb3 y posterior acción inhibitoria en la síntesis de proteínas, sino también que es capaz de incrementar la capacidad de EHEC para adherirse a las células epiteliales y colonizar los intestinos en ratones. Esto se produciría por estimulación en la expresión de nucleolina en la superficie celular, un receptor eucariótico para la intimina (principal proteína de ECEH que permite su adhesión al epitelio intestinal). Este aspecto agrava aún más la presencia de la toxina en alimentos.

Si bien el estudio de este fenómeno requiere estudios más exhaustivos y en escenario real, los resultados obtenidos avizoran el uso seguro de *Ent. mundtii* CRL35 como estrategia bioprotectora contra ECEH, sin contribuir a la producción de Stx en la matriz alimentaria.

Evaluación de la actividad antilisteria de *Ent. mundtii* CRL35 durante el cocultivo con ECEH en ambiente cárnico

Resultados

Se evaluó la producción de enterocina CRL35 por *Ent. mundtii* a lo largo del tiempo (T1 y T2), durante su crecimiento individual y en cocultivo en el sistema cárnico modelo a 30°C. Esto se llevó a cabo enfrentando un césped del microorganismo indicador *Listeria monocytogenes* a diferentes diluciones del sobrenadante del cultivo correspondiente, evidenciándose actividad antimicrobiana a través de la formación de un halo de inhibición del crecimiento.

En la Figura 3.10 puede observarse que el título de la enterocina CRL35 detectada en el SCM aumenta en valores absolutos a través del tiempo, tanto cuando la BL crece de forma individual como en cocultivo con el patógeno. Aunque se debe destacar que la producción de bacteriocina es de menor magnitud cuando *Ent. mundtii* se encuentra en cocultivo con ECEH lo que estaría relacionado con la menor concentración celular alcanzada por la BL en presencia de ECEH a ambos tiempos evaluados, estos valores reflejan una considerable producción aún en presencia del patógeno (> 1000 UA/ml) (Figura 3.10). Por lo tanto podemos decir que a pesar de producir menores títulos, *Ent. mundtii* conserva su capacidad de producir enterocina CRL35 en medio cárnico cuando crece con ECEH.

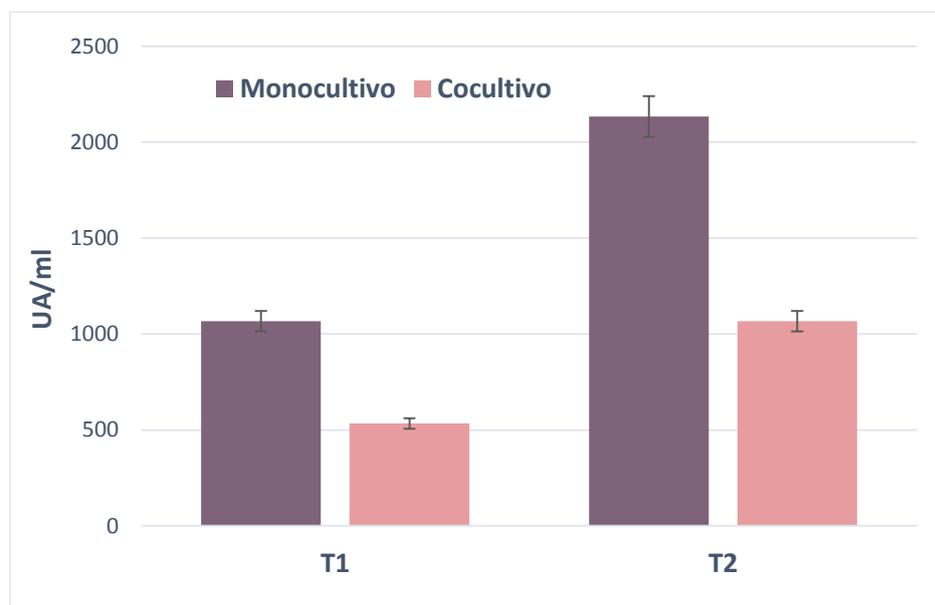


Figura 3.10. Título de enterocina CRL35 producida por *Ent. mundtii* CRL35 cuando crece de forma individual (barras violetas) y en cocultivo (barras rosas) a T1 (6 h) y T2 (30 h) en SCM a 30°C.

Discusión

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas han sido ampliamente estudiadas en los últimos años. Las mismas son activas frente a microorganismos Gram positivos filogenéticamente relacionados, mientras que aquellos microorganismos de deterioro y/o patógenos Gram negativos presentan resistencia intrínseca a éstos péptidos antimicrobianos. Reafirmando este concepto, nuestros estudios describieron un efecto inhibitorio de *Ent. mundtii* sobre ECEH no relacionado con la presencia de su bacteriocina (ver Ensayo de inhibición en placa, Capítulo 2). Sin embargo, desde el punto de vista tecnológico, la producción de enterocina CRL35 por *Ent. mundtii* en el ambiente cárnico estudiado sería de gran importancia ya que la misma es activa frente a *Listeria monocytogenes*, otro patógeno alimentario de gran preocupación para la industria nacional.

Por ello, con el objetivo de conocer la capacidad de *Ent. mundtii* de producir su bacteriocina específica en presencia de ECEH en el sistema cárnico estudiado (SCM), se llevó a cabo la titulación de dicho péptido en diferentes momentos (T1 y T2). Consolidando estudios previos de nuestro grupo, (Orihuel y col., 2018) se demostró que *Ent. mundtii* fue capaz de producir la enterocina CRL35 en el sistema cárnico modelo, incrementando su producción en valores absolutos a través del tiempo de incubación cuando creció individualmente. Por otro lado, si bien la presencia de ECEH actuó en detrimento de esta producción, registrándose descenso del título en presencia del patógeno, es de destacar que *Ent. mundtii* no perdió esta capacidad de forma completa.

La potencialidad para producir enterocina CRL35 en el sistema cárnico sería un atributo bioprotector adicional que posicionaría a *Ent. mundtii* CRL35 como una atractiva herramienta bioprotectora con un espectro de acción ampliado, presentando además de su acción comprobada contra ECEH, capacidad inhibitoria antilisteria gracias a la acción de la enterocina CRL35.

Atendiendo las necesidades entorno a la preservación de alimentos y teniendo en cuenta el limitado rango de acción de las bacteriocinas, generalmente restringido a especies filogenéticamente relacionadas con la cepa productora, diversos estudios se encuentran enfocados al desarrollo de estrategias adicionales a fin de ampliar el espectro de acción de estos péptidos antimicrobianos (Acuña y col., 2015). En este sentido, Acuña y col. (2015) demostraron que la bacteriocina híbrida de amplio espectro Ent35-MccV podría inhibir el crecimiento tanto de *Listeria*

monocytogenes (Gram positiva) como de *E. coli* (Gram negativa) en alimentos modelos (leche desnatada y empanadas). Por su parte, Belfiore y col. (2007) demostraron que la permeabilización de la membrana externa de las cepas de *E. coli* con EDTA y lactato de sodio combinado con lactocina 705 / AL705 producida por *L. curvatus* CRL 705, permitió inhibir el crecimiento de este patógeno. Sin embargo, se sabe que el complejo manosa fosfotransferasa (PTS-manosa) funciona como receptor específico de membrana para bacteriocinas de clase IIa, como lo es la enterocina CRL35 (Ramnath y col., 2004). Un análisis filogenético de 86 miembros de la familia PTS-manosa de una amplia gama de géneros bacterianos, agrupa al complejo PTS-manosa en tres grupos principales (grupos I, II y III). Solo los miembros del grupo I podrían servir como receptores para las bacteriocinas de clase IIa, y su eficiencia como receptor varía en un patrón directamente relacionado con sus posiciones filogenéticas (Kjos y col., 2009). Por esa razón en particular sumado a su incapacidad para atravesar la membrana externa, éstas bacteriocinas no actúan sobre las bacterias Gram negativas (Chalón y col., 2012).

En resumen, la combinación de la acción antilisteria, dada por la bacteriocina producida por *Ent. mundtii* CRL35, y su efecto anti ECEH ejercido por mecanismos independientes de bacteriocina, hacen el empleo de esta BL como cultivo bioprotector una estrategia de bioprotección tecnológicamente atractiva.

INTERACCIONES MICROBIANAS EN CONDICIONES TECNOLÓGICAS



CAPITULO

CAPITULO 4

INTERACCIONES MICROBIANAS EN CONDICIONES TECNOLÓGICAS

Introducción

Luego de conocer el comportamiento de ambos microorganismos en estudio (*Ent. mundtii* y ECEH) y su interacción en un sistema cárnico experimental (SCM), y con el objetivo de evaluar la acción bioprotectora de *Ent. mundtii* CRL35 en escenario real, se diseñó un sistema experimental constituido por carne molida obtenida en condiciones asépticas que nos permitió analizar comparativamente los estudios realizados *in vitro*. Si bien el SCM utilizado en los ensayos *in vitro* es una aproximación al ambiente cárnico, encontrándose allí una composición proteica y de carbohidratos similar a la presente en el alimento, las condiciones óptimas de tiempo y temperatura utilizadas hasta ahora, constituyen parámetros permisivos que podrían exacerbar los efectos observados. Por lo tanto, resulta fundamental el estudio de estos eventos en un escenario que reúna las características tecnológicas reales que enfrentarán ambos microorganismos. Con este objetivo, los ensayos previamente realizados *in vitro* (SCM), fueron extrapolados en un sistema *in situ* (carne molida) en el cual se disminuyó el tiempo de ensayo de 96 a 48 h que es el tiempo máximo que podría considerarse para la preparación y consumo de la carne molida. Además, se bajó la temperatura de 30°C usada en los ensayos *in vitro* a 16°C simulando condiciones de procesamiento y/o ruptura momentánea de la cadena de frío durante el traslado y conservación de la carne.

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

Resultados

Se realizó el crecimiento individual y en cocultivo de ambos microorganismos en el sistema experimental constituido por carne molida. La evaluación de la actividad inhibitoria de la cepa láctica se abordó usando tres aproximaciones diferentes relacionadas con los momentos en los cuales se produciría el enfrentamiento con el microorganismo patógeno y las posibles acciones de *Ent. mundtii* sobre ECEH en el alimento cárnico:

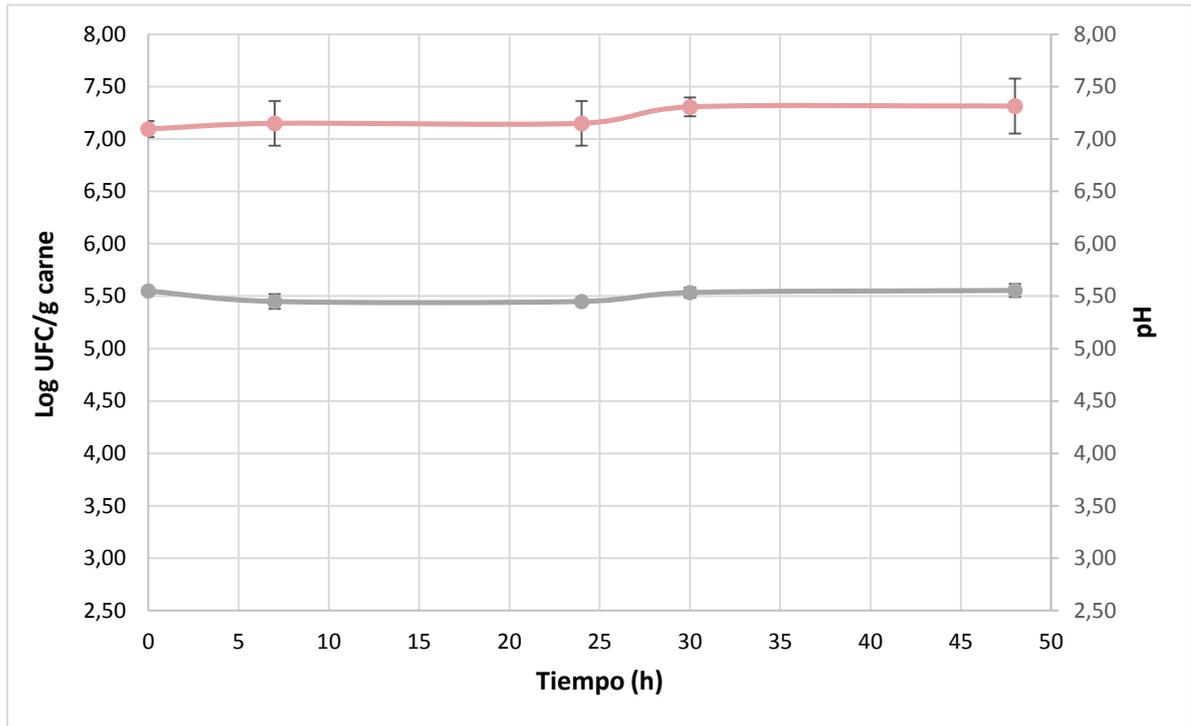
- **Efecto competitivo:** bajo la hipótesis de que el patógeno y la BL se enfrentan simultáneamente, por ejemplo, durante el procesamiento de la carne (despiece, troceado y/o molido) con la inmediata aplicación del cultivo bioprotector. Para simular esta situación se inocularon ambos microorganismos simultáneamente.
- **Efecto preventivo:** bajo el supuesto de que la contaminación de la carne se produce luego de la aplicación del cultivo bioprotector, es decir durante los pasos siguientes del procesamiento, envasado o distribución del producto. Para simular esta situación, se inoculó primero la carne con *Ent. mundtii* y luego de 6 horas de incubación se contaminó la misma con ECEH.
- **Efecto de desplazamiento:** bajo el supuesto de que la carne resultó contaminada con ECEH previamente a la aplicación del cultivo bioprotector, por ejemplo, durante la faena y manipulación de las canales incluyendo el despiece y troceado. Para simular estas circunstancias se contaminó primero la carne con ECEH y luego de 6 horas se inoculó la BL.

Cuando se evaluó el desempeño de *Ent. mundtii* CRL35 en carne molida, se observó que, en los tres desafíos llevados a cabo, la BL logró mantener su viabilidad inicial (7 log UFC/g) durante las 48 h que duró el ensayo, no observándose descenso del pH, el cual se mantuvo constante en valores cercanos a 5,5 durante todo el tiempo evaluado. *Ent. mundtii* se comportó de manera similar también cuando creció en forma individual en la carne molida. Por ello, en la Figura 4.1A, se encuentra graficado de forma unificada y mostrativa el crecimiento de *Ent. mundtii*, en carne molida, el cual presentó valores muy similares en todos los lotes estudiados. En base

a los resultados obtenidos, podemos inferir que, en las condiciones ensayadas, ECEH no influyó en el desarrollo de *Ent. mundtii* en carne molida.

Por otra parte, cuando se analizó el crecimiento de ECEH como cultivo individual, se observó que este ingresó en fase exponencial luego de 6 h de incubación, mostrando un crecimiento exponencial durante el período evaluado y un incremento en aproximadamente 3,5 log UFC/g a las 48 h respecto al inóculo inicial (Figura 4.1B, línea amarilla). En el ensayo de desplazamiento, cuando la BL se inóculó luego de 6 h, ECEH tuvo un crecimiento muy similar al presentado durante su incubación en forma individual, de manera que la BL no mostró acción bioprotectora en estas condiciones (Figura 4.1B, línea violeta). Sin embargo, cuando el patógeno creció en cocultivo con *Ent. mundtii* bajo un efecto preventivo (BL inóculada 6 h antes que ECEH) o competitivo (ambos microorganismos inóculados en forma simultánea), el patógeno ingresó a su fase exponencial a las 6 h, pero a las 24 h entró de manera anticipada a fase estacionaria, lo que no se observó en los tratamientos anteriores, alcanzando, luego de 48 h, 2 log UFC/g menos de crecimiento que en ausencia de la BL (Figura 4.1B líneas gris y rosa, respectivamente). De manera que *Ent. mundtii* CRL35 ejerció un efecto bacteriostático sobre EHEC en carne molida (a 16°C, 48h) cuando fue inóculada de forma previa o simultáneamente con el patógeno en la matriz alimentaria.

A



B

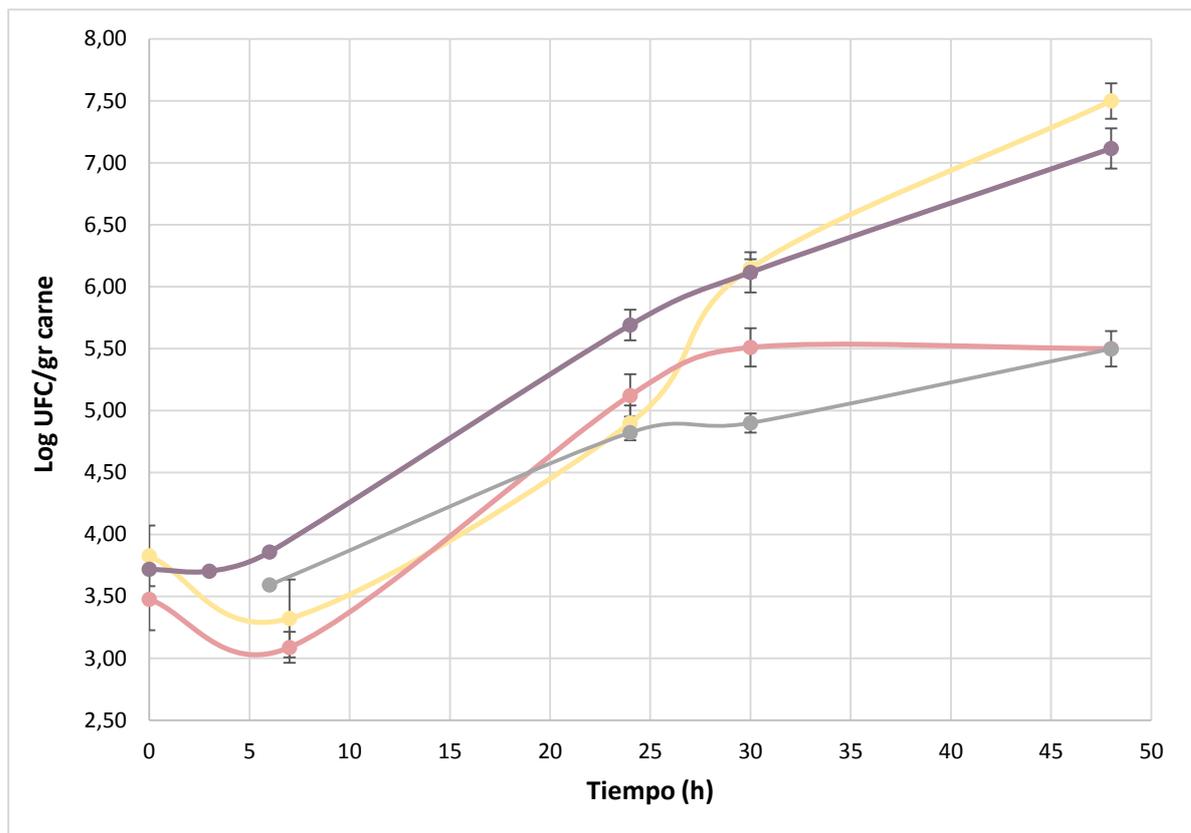


Figura 4.1. (A) Crecimiento de *Ent. mundtii* CRL35 en carne molida (crecimiento individual y en cocultivo con ECEH) (línea rosa) y pH desarrollado durante la incubación (línea gris). (B) Crecimiento de ECEH en carne molida a 16°C durante 48 h de incubación en forma individual (línea amarilla) y en cocultivo con *Ent. mundtii* bajo los diferentes efectos evaluados: efecto competitivo (línea rosa), efecto preventivo (línea gris), efecto de desplazamiento (línea violeta).

Por otro lado, y debido a la importancia que reviste contar con una cepa de amplio espectro de acción, durante esta etapa de estudios *in situ*, se llevó a cabo la titulación de enterocina CRL35 producida por *Ent. mundtii* durante su incubación en carne molida tanto de forma individual como en cocultivo. Sin embargo, en estas condiciones, la bacteriocina no pudo detectarse. Estos resultados no descartan la producción del péptido por la cepa láctica en el alimento, sino más bien, reflejan una limitación de la técnica utilizada para su detección, ya que probablemente una fracción significativa del péptido podría estar asociada o adsorbida por la grasa y partículas de la carne con la consiguiente subestimación de la misma (Orihuel y col., 2018). Este obstáculo fue registrado en trabajos anteriores y fue resuelto mediante la valoración de viabilidad del patógeno en la matriz alimentaria (Orihuel y col., 2018). Es por ello que en estas condiciones ensayadas, sería correcto evaluar la actividad antimicrobiana de *Ent. mundtii* mediante ensayos de viabilidad con la cepa sensible *Listeria monocytogenes*, objetivo que forma parte de las proyecciones inmediatas de la presente tesis.

Además, se intentaron reproducir los ensayos proteómicos anteriormente concretados en SCM, con el objetivo de conocer si aquél comportamiento descrito mediante el análisis diferencial de proteínas para cada microorganismo *in vitro*, se presentaba también en condiciones tecnológicas, o bien, evidenciar si en escenario real la expresión de proteínas de los microorganismos en interacción era diferente. Se decidió estudiar el proteoma de ambos microorganismos creciendo de forma individual y en cocultivo (efecto competitivo) luego de 7 y 48 h de incubación. Luego del procesamiento completo de las muestras, éstas fueron enviadas para su análisis e identificación por espectrometría de masas. Sin embargo, los resultados indicaron que las proteínas pertenecientes a los microorganismos en estudio no pudieron identificarse con niveles aceptables de confianza, ya que las mismas se encontraban solapadas por proteínas de origen bovino, ampliamente mayoritarias, que actuaron como un potente interferente en la identificación de proteínas bacterianas. Concretar este ensayo demanda una laboriosa y específica puesta a punto entorno a la técnica de obtención y tratamiento de muestras para eliminar las proteínas cárnicas y enriquecer las de nuestro interés, las del proteoma de ambos microorganismos en estudio, objetivo que forma parte de futuros estudios de nuestro grupo.

Discusión

Los ensayos *in situ* llevados a cabo se diseñaron con el objetivo de aproximar los parámetros de estudio a un escenario real, bajo condiciones de abuso de temperatura, situación ineludible desde un punto de vista pragmático ya que constituye un importante factor que favorece la proliferación y contaminación de la carne con este patógeno a lo largo de la cadena de producción: desde la granja hasta la mesa. También, la temperatura de almacenamiento se considera el factor más importante que rige el deterioro de la carne (Mataragas y col., 2006; Doulgeraki y col., 2012). A pesar que la mayoría de los países cuentan con regulaciones que establecen los límites de temperatura máxima para el almacenamiento refrigerado de la carne, en la práctica, a menudo son excedidos (Koutsoumanis y col., 2006). Estudios previos demostraron que condiciones de temperatura superiores a 10°C no son inusuales durante el transporte, almacenamiento por menor y manejo por parte del consumidor (Giannakourou y col., 2001). Atendiendo a estas situaciones se llevaron a cabo los diferentes ensayos en carne molida a una temperatura de incubación de 16°C durante 48 h, tiempo más allá del cual se afectarían distintos parámetros relacionados a la calidad sensorial de la carne, lo cual impediría su comercialización.

Estos ensayos evidenciaron que *Ent. mundtii* CRL35 ejerció un efecto bacteriostático sobre ECEH en carne molida cuando fue inoculada de forma previa (efecto preventivo) o simultáneamente (efecto competitivo) con el patógeno, logrando una reducción concreta de dos unidades log de ECEH. Por su parte, Sparo y col. (2013) al estudiar los mismos efectos en cocultivo (preventivo, competitivo y de desplazamiento) de la cepa *Enterococcus faecalis* CECT7121 sobre *E. coli* O157:H7 en carne molida, obtuvieron también mayor efectividad durante el tratamiento preventivo del patógeno, mientras que el efecto competitivo y de desplazamiento fueron menos eficientes. Sin embargo, en nuestros estudios, los efectos preventivo y competitivo mostraron la misma eficacia contra ECEH; no así la inoculación previa del patógeno, o efecto de desplazamiento, en donde *Ent. mundtii* no demostró actividad inhibitoria. Desde un punto de vista práctico, estos resultados indicarían la posible utilización del cultivo láctico en aquellas situaciones donde ocurra la inoculación de la BL en el alimento de forma previa o concomitante al patógeno. En este sentido debemos considerar que la calidad microbiológica de la carne es altamente dependiente de la contaminación inicial de las canales (80%),

mientras que el resto de la carga contaminante (20%) surge como resultado esencialmente de la contaminación cruzada durante el curso del procesamiento industrial. Por lo tanto, de acuerdo los resultados obtenidos la acción bioprotectora de *Ent. mundtii* podría centrarse en prevenir eventos de contaminación cruzada, cuando fuera aplicada en canales de buena calidad microbiológica protegiéndolas de futuras contaminaciones tanto durante las etapas de procesamiento como así también durante la manipulación de la carne desde la góndola hasta antes de su cocción.

Los resultados obtenidos en esta etapa de trabajo evidencian un efecto antagónico de menor magnitud que aquél observado durante los ensayos *in vitro*. Esto podría relacionarse con la implementación de condiciones de temperatura y tiempo (16°C, 48 h), que difieren a los aplicados durante los estudios *in vitro* (30°C, 96 h), siendo éstos últimos capaces de exacerbar los efectos de las interacciones existentes entre ambos microorganismos. Además, cabe destacar que en la utilización de una matriz sólida, como lo es la carne, existe una mayor dificultad de interacción entre ambos microorganismos ya que las propias partículas de carne así como partículas de grasa, ejercen un efecto de tipo estérico que dificulta el íntimo contacto entre microorganismos así como también la difusión de otros compuestos solubles.

Este efecto antagónico exacerbado y previsible cuando se ensayan condiciones *in vitro* fue descrito también por Smith y col. (2005) cuando estudiaron la capacidad de cuatro cepas lácticas para inhibir *E. coli* O157:H7 *in vitro* (medio de cultivo comercial tripticase soja) a 5°C, donde obtuvieron una reducción de 3 a 5 log luego de 12 días de almacenamiento, mientras que al reproducir este ensayo en carne molida fresca lograron una reducción de 1,5 log luego del mismo tiempo de incubación.

Cabe destacar, en favor del efecto bioprotector esperado, que la carga microbiana del patógeno encontrada normalmente en alimentos contaminados no supera las 100 cél/gr de carne, número considerablemente menor al utilizado en este estudio. Por lo cual la BL en realidad enfrentaría una carga microbiana de aproximadamente 1,5 a 2 unidades logarítmicas menor en el alimento, lo que significaría un importante factor de competencia favorable para la BL en el ejercicio de su efecto inhibitorio

Asimismo, los resultados obtenidos durante los ensayos *in situ*, demuestran la necesidad de optimizar los parámetros y estrategias tecnológicas implementadas, a

fin de potenciar el efecto inhibitorio de la cepa láctica sobre ECEH en el alimento. En este sentido la tecnología de obstáculos, introducida por Leistner, propone implementar obstáculos de acción subletal combinados estratégicamente para conseguir un efecto sinérgico final superior, y al mismo tiempo preservar la calidad del alimento. Sumado a esto, la tendencia actual hacia la aplicación de barreras naturales para la preservación de alimentos es una corriente firme impulsada por las exigencias de los consumidores. Así, diversas plantas y sus aceites esenciales se han evaluado como fuentes naturales para controlar el deterioro de alimentos por microorganismos contaminantes. Skandamis y Nychas (2000) informaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano contra *E. coli* en ensalada de berenjena, mientras que Moghimi y col. (2016) lo hicieron para el aceite esencial de *Thymus daenensis* (tomillo). Por su parte Zhang y col. (2017) sugieren al aceite esencial de pimienta negra como agente antibacteriano natural contra *E. coli* para uso en la industria cárnica. Este enfoque realza la posibilidad de utilizar el cultivo bioprotector estudiado, *Ent. mundtii* CRL35, como obstáculo para la preservación de alimentos cárnicos, donde podría ser estratégicamente combinado y fortalecido con otras tácticas de control de ECEH, constituyendo así, un conjunto de barreras naturales debidamente aplicadas para impedir la sobrevida del patógeno.

Por otro lado, y debido a los resultados favorables obtenidos al evaluar la cepa *L. plantarum* CRL681, se prevé profundizar los estudios de interacción entre ésta y el patógeno, como así también, el efecto conjunto de ambas cepas lácticas (*Ent. mundtii* CRL35 y *L. plantarum* CRL681) contra el desarrollo de ECEH (Baillo, 2018), con el fin de evaluar un posible efecto sinérgico entre ambas y diseñar de esa forma el cultivo bioprotector más eficiente.

En resumen, el abordaje *in situ* realizado vislumbra la posible utilización de *Ent. mundtii* como cultivo bioprotector bacteriostático contra ECEH de forma preventiva o competitiva en carne molida; efecto que se espera potenciar ajustando condiciones tecnológicas mediante la combinación con obstáculos adicionales y/o complementando con la acción de otra cepa láctica como *L. plantarum* CRL681, a fin de lograr un efecto contundente sobre el patógeno.

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES



CAPITULO

CAPÍTULO 5

CONCLUSIÓN Y PROYECCIONES

Conclusión

En este trabajo de tesis doctoral, se abordan por primera vez estudios de interacción entre una BL y un patógeno como *E. coli* enterohemorrágica constituyendo un importante aporte al conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la inhibición llevada a cabo por la BL estudiada sobre este patógeno alimentario. El estudio incluyó estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares *in vitro*, extrapolando los mismos a la matriz alimentaria (estudios *in situ*). Parte de los ensayos de interacción se llevaron a cabo gracias al desarrollo y puesta a punto de una nueva metodología que permitió analizar el proteoma de ambos microorganismos durante su interacción en el sistema experimental cárnico. Los resultados obtenidos han demostrado el verdadero potencial inhibidor de *Ent. mundtii* CRL35 contra un patógeno de gran preocupación como *E. coli* O157:H7. Dicha inhibición no se debió a la producción de ácido o bacteriocina sino probablemente a una relación célula-célula más compleja durante la interacción microbiana. Los resultados proteómicos respaldaron las observaciones fisiológicas, demostrando un metabolismo global activo de *Ent. mundtii* mediante la sobreexpresión de numerosas proteínas metabólicas, permitiéndole mantener su viabilidad y contribuyendo así a la competencia efectiva con ECEH. Por el contrario el patógeno presentó represión proteica generalizada en cocultivo, reflejando un metabolismo abatido frente a la cepa láctica que logró precipitar su ingreso a fase de muerte. Además, la adhesión diferencial a las proteínas de la matriz extracelular cárnica (MEC) sugiere que habría una ventaja competitiva de *Ent. mundtii* CRL35 sobre EHEC durante la adhesión/colonización del alimento. Asimismo, la cepa láctica demostró ser una alternativa bioprotectora segura ya que no actuaría como agente inductor estimulando la liberación de la toxina shiga. Al analizar el efecto antagónico contra el patógeno en escenario real (estudios *in situ*), nuestros resultados demostraron tener la misma tendencia que la observada *in vitro*, evidenciando un efecto de tipo bacteriostático de *Ent. mundtii* sobre ECEH en las

condiciones ensayadas en carne molida que requerirán el ajuste tecnológico necesario para su aplicación en la industria.

Los estudios llevados a cabo en esta tesis constituyen un aporte a la tecnología de alimentos cárnicos ya que se propone por primera vez un cultivo láctico bioprotector específico contra ECEH con demostrada actividad antilisteria, abriendo nuevas perspectivas para la aplicación de BL como estrategia biológica para el control de un patógeno alimentario que demanda soluciones urgentes en nuestro país.

Proyecciones

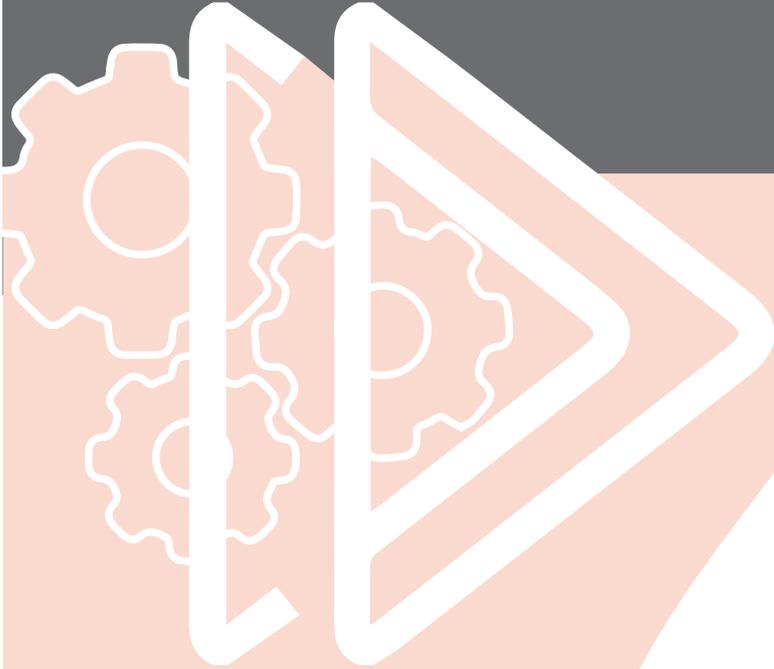
Con el fin de profundizar el conocimiento acerca de la interacción BL-ECEH y con perspectivas de alcanzar el diseño de un cultivo bioprotector efectivo contra el patógeno, se propone, en base a los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis doctoral, los siguientes objetivos futuros:

- Considerando los resultados favorables obtenidos al utilizar la cepa *L. plantarum* CRL681 (Baillo, 2018) se pretende profundizar los estudios de interacción entre ésta y el patógeno, así como también, evaluar el efecto de ambas cepas lácticas (*Ent. mundtii* CRL35 + *L. plantarum* CRL681) contra ECEH, con el fin de determinar un posible efecto sinérgico entre ambas y optimizar de esa forma la estrategia bioprotectora a utilizar.
- Desarrollar un análisis proteómico de expresión diferencial en el alimento contaminado y bioprotegido. Esto implica la puesta a punto de la técnica empleada, principalmente en la etapa de recolección de muestra donde será necesario eliminar la interferencia ocasionada por las proteínas de origen bovino. Este análisis nos permitirá conocer el desempeño de ambas cepas estudiadas en el ambiente real.
- Estudiar con mayor profundidad el fenómeno de inducción del fago 933W por la presencia del cultivo bioprotector. Por ello es necesario, poner a punto la detección de la fluorescencia emitida por la proteína GFP codificada por la cepa *E. coli* C600 Δ tox en reemplazo del gen *stx*. Esto funcionaría como

una medida indirecta de la expresión de la toxina en presencia de agentes inductores. Asimismo se propone luego llevar a cabo este análisis utilizando una cepa de *E. coli* O157:H7 productora de la toxina shiga y evaluando de forma directa la producción de la misma mediante ensayos de ELISA.

- Evaluar la actividad antilisteria de *Ent. mundtii* CRL35 durante su crecimiento *in situ* en presencia de ECEH y *Listeria monocytogenes* mediante el análisis de viabilidad a lo largo del tiempo.
- Reproducir los ensayos fisiológicos desarrollados hasta el momento utilizando una cepa patogénica productora de la toxina, así como también frente a un conjunto de cepas de *E. coli* O157:H7, para explorar el poder bioprotector de *Ent. mundtii* CRL35 hacia otras cepas toxigénicas del patotipo estudiado.

MATERIALES Y MÉTODOS



CAPITULO

CAPITULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

GENERALES

Las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la siguiente tabla:

Tabla 6.1. Cepas utilizadas en este trabajo. Se describe su origen y utilidad.

Cepa	Origen	Principales características - Utilidad	Referencia
<i>Lactobacillus curvatus</i> CRL705	Embutidos artesanales argentinos	Productora de dos tipos de bacteriocinas, AL 705 (antilisteria) y Lactocina 705 (activa contra <i>Brochotrix thermosfacta</i> , y otras BL) Capacidad proteolítica, peptidogénica.	Vignolo y col. (1988)
<i>Enterococcus mundtii</i> CRL35	Queso artesanal (Tafi del Valle)	Productora de bacteriocina, enterocina CRL35, con actividad antagónica frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y con propiedades antivirales	Farias y col. (1996)
<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL681	Embutidos artesanales argentinos	Buen potencial acidogénico, actividad proteolítica y peptidogénica, capacidad para degradar aminos biógenas <i>in vitro</i> .	Vignolo y col. (1988) Fadda y col. (1999) Fadda y col. (2010)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 NCTC 12900	Aislado de muestra clínica en Austria (1992)	Cepa patógena modelo en este trabajo	Best y col. (2003)
<i>Escherichia coli</i> C600::Δtox	Cepa construida a partir de la cepa salvaje C600	Derivada de C600 con el gen <i>gfp</i> reemplazando al gen <i>stx</i>	Gamage y col. (2003)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	Carne de hamburguesa cruda implicada en un brote de colitis hemorrágica	Aislado clínico virulento utilizado como control positivo en la detección de genes de virulencia	ATCC® 43895
<i>Listeria monocytogenes</i> FBUNT	Líquido cefalorraquídeo de recién nacido (San Luis, Argentina 1996)	Utilizada como cepa sensible para evaluar actividad antilisteria de enterocina 35	Laciar y col. (2011)
<i>Escherichia coli</i> B	Descendiente clonal de <i>Bacillus coli</i>	Cepa sensible al fago W933 utilizada para la titulación del mismo.	Daegelen y col. (2009)

Conservación de cepas

Para la conservación de las cepas de BL utilizadas, las mismas fueron transferidas dos veces en MRS (Merck, Buenos Aires, Argentina) (De Man y col., 1960) e incubadas a 30°C durante 16 h (fase estacionaria). Las células fueron centrifugadas (10.000 xg, 5 min) y resuspendidas en medio de cultivo protector Leche Extracto de Levadura (LEL)-Glicerol estéril; el cultivo se concentró 10 veces y se fraccionó en viales estériles almacenados a -70°C hasta su uso.

Para la conservación de las distintas cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo, cultivos crecidos en caldo LB (Sambrook y col., 1989) hasta fase estacionaria, fueron centrifugados (2300 xg, 5 min) y resuspendidos en LB con glicerol (20% v / v) y almacenados a -70°C hasta su uso.

Para la conservación de *Listeria monocytogenes* FBUNT, la cepa desarrollada en caldo TSB hasta fase estacionaria, se centrifugó (2300 xg, 5 min), y resuspendió en TSB blando (agar 0,7%) y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Propagación

Para obtener cultivos activos de las cepas lácticas utilizadas se realizaron dos pasajes sucesivos de las mismas en caldo MRS incubados a 30°C durante 16-18 h (inóculo al 6%).

En el caso de las cepas de *E. coli*, fueron transferidas dos veces en caldo LB y se incubó a 37°C en agitación (220 xg) durante 8 h, en la primera transferencia, y durante 16 h en la segunda.

Listeria monocytogenes FBUNT fue transferida a caldo TSB realizando dos pasajes sucesivos en dicho medio e incubando a 37°C durante 16 h, para obtener de esa forma un cultivo activo.

Medios de cultivo

MRS

El medio Man Rogosa y Sharpe (De Man y col., 1960) se compone de peptona de carne 10 g/l; extracto de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, glucosa 20 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, acetato de sodio 5 g/l, citrato triamónico 2 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,2 g/l, MnSO₄·H₂O 0,05 g/l y Tween 80 1 g/l. Se esterilizó en autoclave a 1 atm de

presión y 121°C durante 20 min. Para obtener MRS agarizado, se agregó agar 1,5% al caldo y se esterilizó en las mismas condiciones.

LB

El medio Luria Bertani (Sambrook y col., 1989) se compone de tripteína 10 g/l, cloruro de sodio 10 g/l y extracto de levadura 5 g/l. Se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión y 121°C durante 20 min. Para obtener LB agar blando se agregó agar 0,7% al caldo y se esterilizó en las mismas condiciones.

Mac Conkey Agar

El medio Mac Conkey agar (MacFaddin, 1985) se compone de peptona de carne 1,5 g/l, peptona de gelatina 17 g/l, tripteína 1,5 g/l, lactosa 10 g/l, sales biliares 1,5 g/l, cloruro de sodio 5 g/l, rojo neutro 0,03 g/l, cristal violeta 0,001 g/l, agar 13,5 g/l. Se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión y 121°C durante 20 min. En este medio desarrollan bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos y todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo.

Mac Conkey Sorbitol Agar

El medio Mac Conkey sorbitol (Ratman y March, 1986) se compone de peptona 20 g/l, sorbitol 10 g/l, sales biliares 1,5 g/l, cloruro de sodio 5 g/l, rojo neutro 0,03 g/l, cristal violeta 0,001 g/l, agar 15 g/l. Se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión y 121 °C durante 20 min. Constituye un medio selectivo y diferencial para el crecimiento de *E. coli* O157:H7. Esta cepa de *E. coli* fermenta lactosa como todas las cepas del género, pero a diferencia de éstas, no es capaz de fermentar sorbitol. Por lo tanto los medios que contienen lactosa no permiten la diferenciación entre ellas. Este medio de cultivo reemplaza la lactosa por sorbitol, por lo cual los microorganismos fermentadores de sorbitol se desarrollan dando colonias de color rojizo-rosadas por descenso del pH y viraje del indicador, mientras que los microorganismos no fermentadores de éste azúcar (*E. coli* O157:H7) se desarrollan dando colonias incoloras.

LEL-Glicerol

El medio LEL se compone de leche descremada en polvo 10,0 g, extracto de levadura 0,5 g, glucosa 1,0 g y agua destilada en c.s.p. 1000 ml.

Este medio se esterilizó a 115°C (0,6-0,7 atm de presión) durante 20 min. Luego, se agregó glicerol, esterilizado previamente (121°C, 20 min), con una concentración final del 15% (v/v).

TSB

El medio caldo tripteína de soja del inglés *Tryptein Soy Broth* (TSB) se compone de tripteína 17 g, peptona de soya 3 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato dipotásico 2,5 g y glucosa 2,5 g y agua destilada en c.s.p. 1000 ml. Se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión y 121°C durante 20 min. Es un medio nutritivo que favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, en especial las bacterias anaerobias facultativas y aerobias comunes.

PCA

El medio PCA, del inglés *Plate Count Agar* se compone de tripteína 5 g, extracto de levadura 2,5 g, glucosa 1 g, agar 14 g y agua destilada en c.s.p. 1000 ml. Se esterilizó en autoclave a 1 atm de presión y 121°C durante 20 min. Es un medio nutritivo poco selectivo usado para el crecimiento de mesofilos aerobios totales.

Sistema Cárnico Modelo (SCM)

El SCM utilizado como medio de cultivo se preparó de acuerdo a Fadda y col. (1998) con algunas modificaciones. Brevemente, se homogeneizaron 10 g de músculo *semimembranosus* bovino con 100 ml de agua desionizada durante 8 minutos en un mezclador Stomacher 400 (Stomacher, Londres, Reino Unido). El homogeneizado se centrifugó (14.000 xg, 20 min a 4°C). El sobrenadante que contenía proteínas sarcoplásmicas entre otros compuestos solubles, se filtró a través de papel Whatman, se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm (diámetro del poro) (Steritop GP, Biopore, Buenos Aires, Argentina) y se suplementó con glucosa 0,5% (p/v) y 0,01% (v/v) de Tween 80. La esterilidad del sistema se confirmó por plaqueo en PCA.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INHIBIDOR DE CEPAS LÁCTICAS PRESELECCIONADAS

Caracterización de factores de virulencia de la cepa modelo *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 mediante PCR

Extracción de ADN cromosómico de *E. coli*

La extracción de ADN cromosómico se llevó a cabo según Ausubel (1999). Se utilizaron células provenientes de 5 ml de un cultivo en fase logarítmica. Las células se cosecharon por centrifugación (8.000 xg, 10 min), se resuspendieron en 500 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, pH 8) Luego se agregaron 50 µl de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% (p/v), 3µl de proteinasa K (20 µg/ml) y se incubó durante 1 h a 37°C, mezclando periódicamente por inversión. A continuación, se agregaron 100 µl de NaCl 5M y 1 vol de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) preparada en el momento y se incubó 30 min a temperatura ambiente, mezclando periódicamente por inversión. Luego se centrifugó (10.000 xg, 10 min) y se recuperó el ADN de la fase acuosa mediante precipitación con 0,6 vol de isopropanol. Se centrifugó (10.000 xg, 10 min) y el precipitado (ADN) se lavó con 300 µl etanol 70% (v/v) centrifugando inmediatamente (10.000 xg, 3 min). El ADN obtenido se dejó secar en baño seco (termobloque) a 37°C durante ~20 min. El ADN fue resuspendido en 50 µl de agua Milli-Q esterilizada.

PCR

Las reacciones de PCR, se realizaron en un termociclador MyCycler™ Thermal Cycler System with Gradient Option (Bio-Rad Laboratories Inc.). Cada reacción contenía: 5 µl de buffer 5X; 2,5 µl de cada cebador 10 µM; 1 µl de desoxiribonucleósido trifosfato (dNTPs) 5 mM; 0,1 µl de ADN polimerasa GoTaq® (Promega Co.); 50 ng de ADN molde y 11,9 µl de agua Milli-Q, en un volumen final de 25 µl. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 3 min a 95°C; 30 ciclos de: 30s a 95°C, 30s a 50°C y 30s a 72°C; seguido de una extensión final de 5 min a 72°C.

A continuación, en la Tabla 6.2, se detallan los cebadores utilizados.

Tabla 6.2. Se detalla la secuencia de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

Gen	Proteína	Secuencia de cebadores utilizados 5' → 3'	Tamaño del producto amplificado (pb)	Referencias
<i>gadA</i>	Glutamato descarboxilasa alfa	F- GATGAAATGGCGTTGGCAAG R- GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC	373	Nadya y col. (2016)
<i>stx1</i>	Verotoxina	F- ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R - AGAACGCCCCACTGAGATCATC	180	
<i>eaeA</i>	Intimina	F- GACCCGGCACAAGCATAAGC R - CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	Paton y Paton (1998)
<i>hlyA</i>	Hemolisina	F- GCATCATCAAGCGTACGTTCC R - AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	

Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se utilizó para visualizar el ADN cromosómico y aquellos fragmentos amplificados por PCR. La velocidad de migración de las moléculas de ADN en un gel de agarosa está determinada por el tamaño molecular, la concentración de agarosa, la conformación de la molécula y el voltaje usado, entre otros factores. Se utilizaron geles horizontales de agarosa aplicando un potencial eléctrico de 80 V durante 60 min y un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen™, Life Technologies Co.) para geles al 1,5% (p/v) de agarosa. Para la tinción del ADN se utilizó el colorante fluorescente GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, Estados Unidos) (dilución 1/10.000).

Purificación y secuenciación de los fragmentos amplificados

Los fragmentos de ADN obtenidos en las reacciones de PCR se purificaron usando el kit AccuPrep, *Gel Purification Kit*, Bioneer (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina), y fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación de CCT-CONICET-Tucumán. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron usando BLASTn (*The Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se tomaron como parámetros de análisis un porcentaje de identidad $\geq 50\%$ y un *e-value* $\leq 1e-10$.

Selección de cepa BL con capacidad inhibitoria sobre ECEH

Ensayos de inhibición en placa

El ensayo se llevó a cabo según Salvucci y col. (2007) con algunas modificaciones. A fin de dilucidar los potenciales mecanismos de inhibición hacia ECEH involucrados, se evaluaron las siguientes condiciones para cada cepa: **(1) células intactas/viables**, los cultivos celulares se lavaron con solución fisiológica eliminando los efectos de los factores solubles del sobrenadante; **(2) células no viables**, los cultivos celulares se lavaron con agua destilada y se calentaron durante 15 minutos a 95°C; **(3) células tratadas**, los cultivos celulares se lavaron con solución fisiológica y se resuspendieron en 1 mg/ml de solución de lisozima para ser incubados durante 2 horas, a fin de evaluar si la estructura de la pared celular estaba implicada en la inhibición del patógeno; **(4) cultivo activo directo**, para evaluar la totalidad de componentes (células viables más productos metabólicos) presentes en el medio; **(5) sobrenadante libre de células calentado** (5 min, 95°C), para evaluar la inhibición bacteriana debido a ácido, bacteriocinas y otros compuestos solubles termoestables; **(6) sobrenadante exento de células calentado** (5 min, 95°C) **y neutralizado** a pH 7 con NaOH 1N, para neutralizar los ácidos producidos; **(7) sobrenadante libre de células sin tratar**, para evaluar factores solubles adicionales que podrían inhibir el patógeno; **(8) solución de ácido láctico al 4%** como control del efecto ácido. Se colocaron gotas de 5 µl de cada condición de cultivo de BL sobre una placa conteniendo MRS agar. El césped indicador se preparó añadiendo 100 µl de un cultivo activo de ECEH a 10 ml de LB agar blando (0,7%), el cual fue vertido sobre el MRS agar inoculado con los distintos tratamientos del cultivo láctico en estudio. Las placas se incubaron a 30°C durante 24 h. La presencia de halos de inhibición alrededor de los spots inoculados en el agar MRS se consideró inhibición positiva de *E. coli* NCTC 12900.

Cocultivos en sistema cárnico modelo

Los cultivos de cada cepa de BL con ECEH se llevaron a cabo en SCM para evaluar el desempeño de ambos microorganismos tanto en cocultivo como en forma individual. Cincuenta ml del SCM se inocularon con aproximadamente 10^6 UFC/ml de BL y 10^4 UFC/ml de ECEH y se incubaron en condiciones estáticas a 30°C durante 96 h. Además, cada microorganismo se cultivó individualmente en las mismas

condiciones (30°C, 96 h, mismo inóculo) para evaluar el comportamiento de cada cepa sin competencia. Se tomaron muestras a las 0, 3, 6, 8, 24, 48, 72 y 96 h de incubación a partir de las cuales se realizó determinación de pH y análisis de la viabilidad de ambos grupos microbianos utilizando medios agarizados selectivos. Para el recuento bacteriano, se prepararon diluciones decimales y se plaquearon en el medio correspondiente, agar MRS para BL y agar Mac Conkey (Britania, Buenos Aires, Argentina) para ECEH, y se incubaron a 30°C durante 48 y 24 h, respectivamente. Las mediciones de pH se determinaron usando pHmeter Altronix TPX I (Nueva York, EE. UU.). Se llevaron a cabo tres réplicas biológicas independientes para cada cultivo (mixto e individuales).

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN BL-ECEH *in vitro*

Estos estudios se realizaron con la cepa seleccionada, *Ent. mundtii* CRL35.

Los ensayos de titulación de bacteriocina y ensayos proteómicos se focalizaron en dos momentos puntuales de la interacción *Ent. mundtii* – ECEH en SCM: **T1**, correspondiente a la fase de crecimiento exponencial de ambos microorganismos, lo cual se evidencia luego de 6 h de incubación tanto en cultivos individuales como en cocultivos, y **T2** correspondiente a la fase de crecimiento estacionaria de *Ent. mundtii* y fase de muerte de ECEH, lo cual se produce luego de 30 h de incubación en cocultivo, mientras que en cultivos individuales, dichas fases del crecimiento se presentan a las 30 h para *Ent. mundtii* y 96 h para ECEH (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Tiempo de colecta en horas (*Ent. mundtii*/ECEH) correspondientes a T1 y T2 en cultivo individual y en cocultivo.

	T1	T2
Cultivo Individual	6/6 (fase exponencial)	30 (fase estacionaria) /96 (fase de muerte)
Cocultivo	6/6 (fase exponencial)	30 (fase estacionaria) /30 (fase de muerte)

Estudio proteómico

Se abordó un análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional (E2D) a fin de evaluar la interacción *Ent. mundtii* – ECEH en SCM. El sistema fue estudiado a T1 y T2, en cocultivo y cultivos individuales como fue detallado anteriormente.

Recuperación de células para análisis proteómicos

Ent. mundtii se incubó individualmente y en cocultivo con ECEH, en 100 ml del SCM para lograr una cantidad suficiente de células para el análisis proteómico. Como se explicó anteriormente se estudiaron las condiciones T1 y T2. Las células de diferentes cultivos se recogieron por centrifugación a 8.000 xg durante 10 min a

20°C y se lavaron dos veces con 40 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5. Los *pellets* resultantes se almacenaron a -20°C hasta su lisis para la extracción de proteínas. Se realizaron tres réplicas biológicas independientes para cada condición.

Preparación de extractos de proteínas libres de células para análisis proteómicos

Los precipitados celulares obtenidos de ECEH y *Ent. mundtii* correspondientes a sus cultivos individuales a T1 fueron mezclados antes de la lisis realizándose el mismo procedimiento para T2 (Figura 6.1). Este procedimiento se llevó a cabo para estandarizar la técnica y evitar las diferencias en la eficacia de ruptura celular entre mono y cocultivos y por ende diferencias en el enriquecimiento proteico de cada microorganismo en geles 2D, lo cual afectaría las comparaciones proteómicas. Las proporciones celulares de cada cultivo individual utilizado para dichas mezclas se establecieron de acuerdo con los recuentos celulares obtenidos en el cocultivo respectivo (T1 o T2) de manera que en la mezcla exista una relación similar entre los dos microorganismos. De esta forma, se asegura que se coloquen 600 µg de proteínas en la tira de IPG (del inglés *immobilized pH gradient*), con la misma proporción de proteína de cada microorganismo que en las tiras de IPG con muestras del cocultivo. Cada una de estas mezclas sintéticas (MS) constituirá los controles respectivos en T1 y T2 (ver la Figura 6.1 para más detalles). Los precipitados celulares provenientes de estas MS así como los provenientes de los cocultivos, tanto para T1 como para T2, fueron sometidos al siguiente proceso de ruptura celular

Ruptura celular: Los *pellets* celulares obtenidos se mezclaron con perlas de vidrio (150 ± 212 µm de diámetro, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.) y se resuspendieron en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5 en una relación 1: 2: 1 (*pellet*: tampón: perla). Luego, las células se rompieron usando un disruptor celular Mini-BeadBeater-8 (BiospecProducts Inc., Bartlesville, OK, EE. UU.) durante 10 min (10 ciclos de 1 min cada uno, con intervalos de 1 minuto en hielo entre ciclos). Para eliminar restos celulares, células intactas y perlas de vidrio, las muestras se centrifugaron a 14.500 xg, 5 min, 15°C. El sobrenadante obtenido constituye el extracto libre de células. La concentración de proteínas totales de los extractos se determinó utilizando un reactivo de Bradford concentrado comercial (Bio-Rad Laboratories Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando albúmina sérica bovina como estándar (0,05-0,50 mg/ml). Se agregó 10 µl de muestra a 200 µl de la solución de Bradford. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se

determinó la concentración de proteínas espectrofotométricamente usando un lector de microplacas VERSAmax™ (Sunnyvale, CA, EE.UU.) midiendo la absorbancia a 595 nm. Los resultados se expresaron en mg/ml. Finalmente, se almacenaron alícuotas de 600 µg de proteína a -70°C, hasta su posterior análisis de E2D.

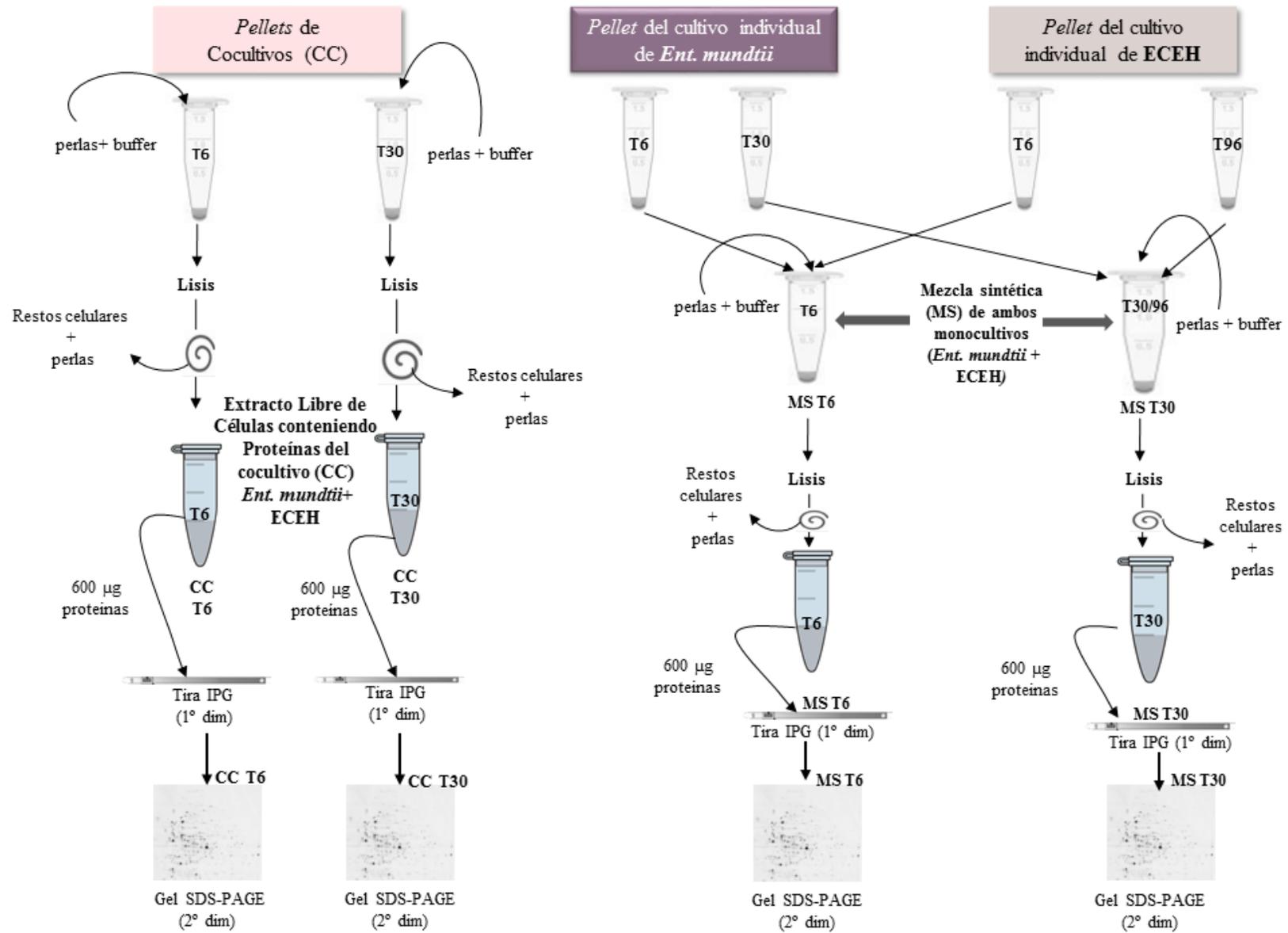


Figura 6.1. Descripción esquemática de la preparación de extractos libres de células para el análisis proteómico.

Isoelectroenfocado

Las muestras fueron tratadas con las soluciones de desnaturalización (Tabla 6.4) y solubilización (Tabla 6.5) y luego se realizó la rehidratación pasiva (sin corriente eléctrica) de las tiras en el equipo IPGphor durante 20-24 h empleando el tampón de rehidratación que se detalla en la Tabla 6.6. Todas las soluciones se prepararon en el momento de utilizar.

Tabla 6.4. Componentes para realizar 10 ml de solución de desnaturalización.

Solución de desnaturalización	
Urea (6,5 M)	3,94 g
Tiourea (0,17 M)	1,65 g
Agua (MQ) csp	10 ml

Luego de la solubilización de la urea/tiourea, se agregó 0,1 g de amberlita para desionizar en agitación suave 1 h.

Tabla 6.5. Componentes de la solución de solubilización.

Solución de solubilización (S) - 12 muestras	
CHAPS (4% final)	20 mg
DTT (100mM)	8 mg
Tampón Tris-HCl 2 M pH 8.8	10 µL
Solución de desnaturalización	0,5 ml

Tabla 6.6. Componentes de la solución de rehidratación.

Solución de rehidratación (R) - 12 muestras	
CHAPS (4% final)	240 mg
DTT (100mM)	96 mg
IPG (pH 4-7)	120 µL
Azul de bromofenol (0,002%)	punta de espátula
Solución de desnaturalización	6 ml

Preparación de la muestra (Grosu-Tudor y col., 2016)

Para preparar la muestra se añadió 1 µl de benzonasa para la digestión del ADN y 1 µl de MgSO₄ 1 M (o MgCl₂ 1 M). Se incubó 30 min a 37°C. Para la precipitación de proteínas, se agregó 2 volúmenes de acetona por volúmenes de muestra. Se homogeneizó muy bien en vortex y se dejó reposar a -20°C durante toda

la noche. Luego, se recuperó el *pellet* por centrifugación (15.600 $\times g$, 15 min) y se eliminó la acetona. Se secó en baño seco a 95°C (1-3 min).

Siembra en las tiras de isoelectroenfocado (IEF) para la rehidratación

Se solubilizaron las proteínas concentradas y secas, obtenidas en el punto anterior en 40 μl de la solución de solubilización (S), se diluyó con 300 μl de la solución de rehidratación (R) (para las tiras de 17 cm utilizadas). Se centrifugó a 1.100 $\times g$ por 10 min. Luego, se niveló el dispositivo de hidratación (*Reswelling tray*). A continuación se depositaron las muestras en los canales, se quitó el film protector de las tiras y con pinzas se colocaron con el gel hacia abajo sobre las muestras. Se eliminaron las burbujas y se cubrieron las tiras con 3-4 ml de aceite mineral para evitar deshidratación. Luego, se dejaron tapadas con papel de aluminio a temperatura ambiente durante 18-20 h para su hidratación e incorporación de la muestra a la tira de IPG (Figura 6.2).

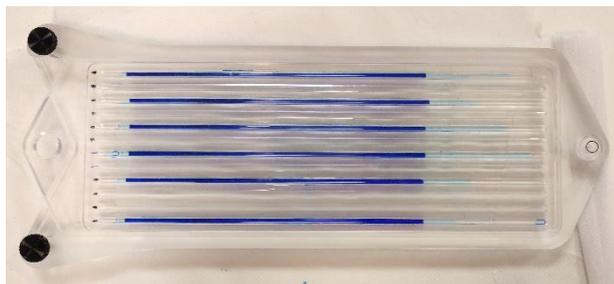


Figura 6.2. Tiras de isoelectroenfoco con la solución de hidratación. Las muestras se incorporaron a las tiras de isoelectroenfoco por hidratación pasiva.

Luego de la rehidratación se preparó el sistema para el IEF: se niveló correctamente el equipo Ettan IPGphor (nivel de burbuja), y se posicionó el Manifold sobre el equipo. Se agregaron 108 ml de aceite mineral (Dry Strip Cover Fluid, GE, Pittsburgh, EEUU) para cubrir todas las calles del Manifold (Figura 6.3). A continuación se transfirieron las tiras, escurridas previamente en papel de filtro, al Manifold con el lado gel hacia arriba y extremo anódico (+) hacia el extremo en T.



Figura 6.3. Manifold. En cada uno de los canales del manifold se colocaron las tiras del isoeléctrofocado con el gel hacia arriba.

Primera dimensión IEF horizontal

Se humedecieron las almohadillas de papel precortadas (2 por tira, una en cada extremo) con 150 µl de agua bidestilada. Se colocaron en los extremos de las tiras para que queden solapados con el extremo del gel. Luego, se ubicaron los ensamblajes de los electrodos en posición *open* sobre las almohadillas y se controlaron que las puntas de los electrodos estén en contacto con la base de oro del equipo. Se cerró el equipo (Figura 6.4) y se corrió el programa de IEF. Este programa tiene los pasos que se detallan en la Tabla 6.7.

Tabla 6.7. Condiciones de electroforesis usadas.

	Modalidad	Voltaje (Vh)	Tiempo (h)	Voltaje total (V)
1	Lineal	500	1:00	500
2	Gradiente	1000	8:00	6000
3	Gradiente	8000	6:00	27000
4	Lineal	10000	2:00	20000
				Total: 53500



Figura 6.4. Equipo Ettan IPGphor para correr la primera dimensión. Se puede observar el detalle de la pantalla donde se van reportando todas las etapas de las condiciones utilizadas durante la corrida.

Una vez finalizado el programa, se detuvo el equipo y se recuperaron las tiras escurriéndolas cuidadosamente en papel de filtro. Se las colocó en los tubos con tapa rosca cuidando que el gel no quede en contacto con el vidrio. Se conservaron las tiras a -70°C hasta el momento de la segunda dimensión. Se lavó el equipo con detergente suave (Cleaning solution GE, Pittsburgh, EEUU), agua tibia ($40-50^{\circ}\text{C}$) y agua destilada.

Segunda dimensión SDS-PAGE con sistemas de electroforesis vertical

Preparación del dispositivo para los geles

Se limpiaron los vidrios y las juntas con alcohol, se secó con papel tipo *tissue* compatible con proteómica. Se niveló y completó el dispositivo con los vidrios y entre los mismos se colocaron hojas plásticas de separación. Se cerró el sistema con tornillos y pinzas. Se niveló el sistema y posteriormente se llenó con solución acrilamida-bisacrilamida.

Los geles se prepararon con una solución de Acrilamida-Bis acrilamida (30%T-0,5% C) al 12,5% como se detalla a continuación en la Tabla 6.8.

Tabla 6.8. Componentes de la solución de separación para 6 geles.

Componentes	Gel Separación (6 geles) (12.5%)
Solución Acrilamida + bisacrilamida (S)	172 ml
Tris 3 M pH 8.8	106,53 ml
SDS 20% (p/v)	4,31 ml
H ₂ O	57,46 ml
Glicerol 50% (v/v)	86,21 ml
Persulfato 10% (p/v)	2,7 ml
TEMED	0,354 ml
TOTAL (ml)	429,56 ml

El TEMED y el persulfato se agregaron al último por ser los catalizadores. Se evitó la formación de burbujas tanto en la preparación de la solución como en el agregado de la solución para su solidificación en el dispositivo. Se agregó de manera constante y continua la solución hasta 1 cm antes del extremo final del vidrio más corto.

Posteriormente se agregaron 2 ml de isopropanol/H₂O (2/3) por cada gel a lo largo del mismo. Se dejó polimerizar durante 2 h (mínimo), para luego eliminar el isopropanol y enjuagar y lavar con H₂O destilada.

Los geles solidificados se cubrieron en la parte superior con Tampón de migración 1X, se colocaron en cámara fría hasta su uso, y se cubrieron con envoltura plástica.

Equilibrado de las tiras isoelectroenfocadas a sembrar

Previamente a la siembra en los geles de SDS PAGE, las tiras se trataron con DTT (ditiotreitól) y con iodoacetamida a fin de reducir y alquilar, respectivamente, los puentes disulfuro presentes y de esa forma evitar la renaturalización de las proteínas. Se preparó la solución base como se detalla en la Tabla 6.9. Las tiras se enjuagaron dos veces con 5 ml de la solución base.

Tabla 6.9. Solución base (preparar en el momento) (para 6 tiras).

Solución base	
Componentes	Cantidad para 6 tiras
Tris 1M pH 6,8	15 ml
Urea	108 g
SDS	3 g
H2O miliQ	105 ml
Se mezcló hasta obtener una solución homogénea (~ 20 min)	
Glicerol (87%)	90 ml
Volúmen total: 300 ml	

Luego se procedió a agregar 10 ml de una solución de equilibrado N°1 (Tabla 6.10) en un tubo de vidrio con tapa a rosca y se colocó la tira cuidando que el gel no quede en contacto con el vidrio. Se incubó en agitación suave (en vaivén) con el tubo bien cerrado durante 15 min.

Tabla 6.10. Componentes de la solución de equilibrado 1 para 6 tiras de isoelectroenfocado.

Solución de equilibrado N°1	
Componentes	Cantidad para 6 tiras
Ditiotreitól (DTT)	501 mg
Solución base	60 ml

Se enjuagaron las tiras con solución de base y se agregaron 10 ml de la solución de equilibrado N°2 (Tabla 6.11), colocando la tira con el gel en el lado superior, de forma que no quede en contacto con el vidrio y se incubó en agitación suave durante 15 min. Luego, se enjuagó con la solución base, se escurrió y se

sembraron las tiras. Para ello se pesó 0,16 g de agarosa NuSIEVE y agregó 20 ml de *buffer* (Tris 1 M pH 6,8), se fundió 1-2 min en microondas y se guardó a 55°C hasta su uso, las tiras ya equilibradas se colocaron con el extremo positivo hacia la izquierda. Se agregó solución de agarosa embebiendo la tira para ayudarla a descender, de manera que quede en la base del gel asentada y sin burbujas.

Tabla 6.11. Componentes y cantidades para 6 tiras de la solución de equilibrado N°2.

Solución de equilibrado N°2	
Iodoacetamida	1,8 g
Solución de base	60 ml
Azul de bromofenol	Punta de espátula

Migración

Se utilizó 5,7 l de *buffer* de corrida 2X (50 mM Tris, 384 mM glicina, 0,2% SDS p/v). Los mismos se prepararon con 2 h de anticipación y fueron conservados a 4°C, para llenar ambos compartimentos: cámara superior (1,2 l *buffer* 2X) y la cámara inferior (4,5 l de *buffer* 1X). Se llenó la unidad de electroforesis con los 4,5 l de *buffer* de corrida 1X y se prendió la bomba de la cuba, conectada al baño termostatzado a 16°C. Se agregó el *buffer* 2X a este compartimiento y se agregó *buffer* 1X al compartimiento inferior, hasta alcanzar idénticos niveles de *buffer* en ambas cámaras. Se conectó la cuba a la fuente para comenzar la electroforesis (Figura 6.5).

Tabla 6.12. Condiciones de corrida. Se especifican los dos pasos.

Condiciones de corrida		
Paso 1	20°C, 10 mA /gel, durante 1 h	60 mA p/ 6 geles
Paso 2	20°C, 20 mA/gel, durante 17 h o hasta que el frente de corrida llegue al final del gel	120 mA p/ 6 geles

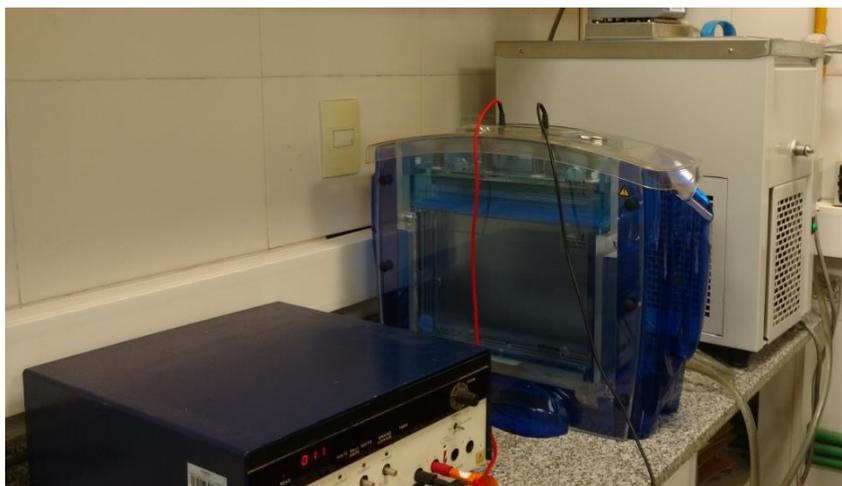


Figura 6.5. Cuba de corrida conectada a la fuente

Recuperación de los geles: coloración/decoloración

Una vez que el frente de corrida indicado por el azul de bromofenol llegó al final de los vidrios, se detuvo el equipo. Se recuperaron cuidadosamente los geles con ayuda de los soportes planos y se los colocó en los recipientes. Se agregaron aproximadamente 250 ml del colorante Coomassie Blue G250 (Candiano y col., 2004). Se incubó por 1 h (mínimo) en agitación suave y luego se decoloró con agua destilada (3 recambios con intervalos de 30 min cada uno o hasta visualización adecuada de las manchas o *spots*).

Digitalización de los geles y análisis de datos

Para el escaneo de los geles se utilizó el Image Scanner III (GE, Health Care, Pittsburgh, EEUU) y se analizaron las diferencias de expresión entre las condiciones de estudio anteriormente descritas con el programa Prodigy SameSpots version 1.0.3400.25570 (TOTALLAB, Newcastle, Reino Unido). Los geles para cada condición se realizaron por triplicado.

La cuantificación y normalización del volumen de los *spots* sobre las imágenes digitalizadas de los geles (600 dpi) se realizó utilizando el software Prodigy SameSpots como se mencionó anteriormente. El volumen de cada *spot* se calculó y normalizó al referir los valores a la suma del volumen total de *spots* dentro de cada gel. Se aplicó el test de *Student* para muestras no pareadas. Una proteína fue considerada diferencialmente expresada si el volumen promedio de *spots*

normalizados variaba al menos 1,5 veces entre los *spots* comparados. El efecto fue confirmado por el análisis de varianza a un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los *spots* de proteínas que mostraron una variación significativa entre las condiciones estudiadas se recortaron manualmente de los geles utilizando un bisturí. Los mismos fueron colocados en tubos Eppendorfs para su identificación.

El análisis espectrométrico de masas se llevó a cabo en CEQUIBIEM (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires, Argentina) y en LIST Instituto de Ciencia y Tecnología de Luxemburgo "Investigación e Innovación Ambiental" (ERIN), utilizando un espectrómetro de masas en tándem MALDI-TOF / TOF ABI4700 (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.) Grosu-Tudor y col. (2016) y un equipo MALDI 5800 (Sciex, Foster City, EE. UU.), respectivamente.

El software MASCOT (Matrix Science Inc., Boston, MA; http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) fue utilizado para analizar los resultados obtenidos en la identificación.

La secuencias de referencias para *Ent. mundtii* corresponde a la cepa en estudio CRL35 y se encuentra depositada en el GenBank del NCBI bajo el número de acceso JDFT000000000 descrita en Bonacina y col. (2014).

Análisis Funcional de Interacción de Proteínas sobreexpresadas

El estudio funcional de las proteínas identificadas y su clasificación en categorías funcionales se realizó con las bases de datos Universal Protein Resource (UniProt) (UniProt, 2015) y COGNITOR para identificar los Clusters de Grupos Ortólogos de proteínas (COG) (Galperin y col., 2015). Para analizar las interacciones entre proteínas de una misma condición que han mostrado expresión diferencial, se realizó un análisis *in silico* utilizando STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) versión 10.05 disponible públicamente (Szkarczyk y col., 2015). Para cada conjunto de proteínas diferencialmente expresadas, se determinó el número de interacciones proteína-proteína documentadas en la base de datos. Se construyó una red que vincula cada proteína (representadas por nodos) con el resto de las proteínas diferencialmente expresadas en la misma condición. Fue seleccionado 0,4 como nivel de confianza y se utilizaron todos los métodos de predicción disponibles en STRING: interacciones conocidas de bases de datos curadas, interacciones determinadas experimentalmente, interacciones predichas mediante genes vecinos, fusión de genes,

coocurrencia de genes y otras, como basadas en bibliografía, coexpresión y homología de proteínas. (Szklarczyk y col., 2015). Los resultados arrojados por esta base de datos, fueron incorporados en el *software* Cytoscape versión 3.6.1 de libre acceso (Shannon y col., 2003), el cual permitió la creación y visualización de nuevas redes de mayor complejidad.

Ensayos de unión a Matriz Extracelular (MEC)

Se analizó la capacidad de adhesión de *Ent. mundtii* CRL35 y *E. coli* NCTC12900 a proteínas de la matriz extracelular cárnica (MEC), según la metodología de Chagnot y col. (2013). Para ello se utilizó colágeno tipo IV (C6745, Sigma Aldrich) y laminina (L2020, Sigma Aldrich). Las condiciones a estudiar fueron las siguientes:

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

Se preparó una solución 50 µg/ml de cada proteína en buffer carbonato 0,1M pH 9,6. El ensayo se llevó a cabo utilizando una microplaca de poliestireno de 96 pocillos, en la cual los pocillos se cubrieron con 250 µl de la solución de proteína de MEC que corresponda y los pocillos control con el mismo volumen de solución de BSA (Albúmina Sérica Bovina) 1% con el objeto de valorar la unión inespecífica que pudiera existir. Se permitió la incubación de la microplaca durante toda la noche a 4°C para lograr tapizar el fondo del pocillo con las proteínas utilizadas. Luego se lavaron tres veces los pocillos con 200 µl de buffer PBST (buffer PBS + Tween 0,05% (v/v)) y fueron saturados con 250 µl de solución de BSA al 1% (w/v) en PBST. Se incubó durante 2 horas a 37°C y se lavaron tres veces los pocillos con 200 µl de PBST. A continuación se preparó una suspensión de 10⁸ UFC/ml de cada microorganismo (*Ent. mundtii* y ECEH) a partir del cultivo correspondiente en fase exponencial. Se agregó a cada suspensión bacteriana cloranfenicol 90 µg/ml con el objeto de prevenir la síntesis de proteínas *de novo* y el crecimiento bacteriano durante el tiempo del ensayo. Se adicionó en los pocillos 200 µl de la suspensión

bacteriana de 10^8 UFC/ml de *Ent. mundtii* o ECEH cuando se estudió su capacidad de adhesión de forma individual. En aquellas condiciones donde se estudió la capacidad de adhesión en cocultivo se colocó 100 μ l de la suspensión 10^8 UFC/ml de *Ent. mundtii* y 100 μ l de la suspensión 10^8 UFC/ml de ECEH, de manera tal que el volumen final sea también 200 μ l. Se incubó durante 2 h a 30°C. Luego se lavó cada pocillo 3 veces con TS (agua triptona) y fueron tratados con 250 μ l de Tritón X-100 0,05% (v/v) para desorber las bacterias y recuperar de esa forma las células adheridas. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se extrajo 100 μ l de cada pocillo y realizaron diluciones seriadas al décimo (1:10). Las diluciones fueron sembradas en placas de agar (MRS y/o LB según corresponda) para recuento bacteriano. Las placas fueron incubadas 18-24 horas a 30°C para luego realizar el recuento bacteriano de células adheridas. El porcentaje de células adheridas se calculó en función de las células totales colocadas, es decir, la cantidad de células adheridas se calculó como el porcentaje de células remanentes con respecto al total agregado a cada pocillo. Cada condición evaluada se realizó por triplicado y el ensayo cuenta con tres replicas biológicas.

Evaluación del efecto inductor de *Ent. mundtii* CRL35 sobre el fago W933

Para realizar estos estudios se utilizó la cepa modelo *E. coli* C600 Δ tox (Gamage y col., 2003), cedida gentilmente por la Dra. Alison A. Weiss (Departamento de Genética Molecular, Bioquímica y Microbiología, Universidad de Cincinnati, Ohio), en la cual los genes para Stx2 presentes en el fago W933 se reemplazaron por intercambio alélico con los genes que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) y la resistencia al cloranfenicol mediante el uso de secuencias corriente arriba de los genes stx2 (STX2-UP, pb 20467 a 21393) y corriente abajo de los genes stx2 (STX2-DOWN, pb 22752 a 23744) en el genoma del fago W933. Por lo tanto, durante la activación del ciclo lítico del fago (proceso llamado Inducción), se produce de manera concomitante, la liberación de partículas virales y la expresión de la proteína verde fluorescente.

Se realizaron dos réplicas biológicas de los siguientes ensayos:

Determinación de la concentración inductora óptima de ciprofloxacina

Aquella concentración de ciprofloxacina capaz de actuar como agente inductor del fago activando su ciclo lítico, constituyó el control positivo de lisis. Para

determinar dicha concentración se utilizó un cultivo de toda la noche de *E. coli* C600Δtox en LB, a partir del cual se preparó 50 ml de una dilución 1/100 del mismo, en presencia de CaCl₂ 10 mM y permitiendo su crecimiento a 37°C en agitación hasta lograr una DO₆₀₀= 0.1. Esto asegura la presencia de un microorganismo en activo crecimiento al momento de recibir el estímulo inductor. Luego, dicha suspensión de *E. coli* en crecimiento fue distribuida en 5 tubos, conteniendo 5 ml del cultivo cada uno, a los cuales se adicionó ciprofloxacina en cantidad necesaria para obtener una concentración final de: 7.5, 15, 30, 60 y 120 ng/ml. Se trabajó con una solución stock 10 µg/ml de ciprofloxacina. Dichos tubos fueron incubados a 37°C en agitación hasta observar visualmente franca lisis del microorganismo.

Estudio de *Ent. mundtii* CRL35 como agente inductor

Se evaluó el rol de *Ent. mundtii* como potencial agente inductor del fago W933 presente en la cepa C600Δtox mediante la detección de partículas virales y evidencia de lisis de *E. coli* C600Δtox cuando crece en presencia de la cepa láctica.

Se llevó a cabo un proceso de inducción según la metodología de Gamage y col. (Gamage y col., 2003) con algunas modificaciones. A partir de un cultivo toda la noche de *E. coli* C600Δtox se prepararon 20 ml de una dilución 1/100 en LB con el agregado de CaCl₂ 10mM. Se incubó a 37°C en agitación durante 1 hora hasta llegar a DO₆₀₀= 0.1. Dicho cultivo en crecimiento activo fue dividido en tres tubos, conteniendo 5 ml cada uno, los cuales recibieron los siguientes tratamientos: 1) sin adición de agentes inductores (control negativo de inducción), 2) adición de ciprofloxacina 60 ng/ml (control positivo de inducción), 3) adición de *Ent. mundtii* CRL35 (10⁷ UFC/ml). Los mismos fueron incubados a 37°C en agitación durante 24 h. Para cada tratamiento se tomaron muestras a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas de incubación a partir de las cuales se realizó análisis de la viabilidad de ambos grupos microbianos utilizando medios agarizados selectivos. Para el recuento bacteriano, se prepararon diluciones decimales y se plaquearon en el medio correspondiente, agar MRS para LAB y agar Mac Conkey (Britania, Buenos Aires, Argentina) para *E. coli*, y se incubaron a 30°C durante 48 y 24 h, respectivamente. Además, a las 4 y 24 h de incubación, se tomaron 2 ml de cada tratamiento y fueron centrifugados a 5000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido, conteniendo las partículas virales, se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm (diámetro del poro) y se almacenó a 4°C para su posterior titulación.

Titulación del fago W933

La titulación de las partículas virales producidas durante el proceso de inducción se llevó a cabo según Gamage y col. (2003). Se preparó una dilución 1/100 en LB a partir de un cultivo de toda la noche de la cepa *E. coli* B la cual funciona como cepa indicadora por ser sensible a la infección con el fago W933. Se permitió el crecimiento de dicha suspensión bacteriana hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.5$. Luego se adicionó 200 μ l del cultivo activo de *E. coli* B y 30 μ l solución stock 1M de $CaCl_2$ (concentración final 10 mM) a 3 ml de LB blando (0,7 % agar) fundido y mantenido a 45°C. Esta mezcla se homogenizó y se vertió inmediatamente sobre una placa conteniendo LB agar solidificado. Se dejó solidificar la capa superior que contendrá el césped del microorganismo indicador (*E. coli* B). Paralelamente se realizaron diluciones al décimo de cada uno de los sobrenadantes obtenidos anteriormente durante el proceso de inducción. Se colocó sobre el agar ya solidificado una gota (5 μ l) de cada dilución. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche para luego realizar el recuento de las placas de lisis. Se determinó el número de unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro mediante la siguiente fórmula:

$$UFP/ml = \text{número de placas de lisis/volumen de inóculo} \times \text{dilución}$$

Influencia del cocultivo con ECEH en la producción de bacteriocina por *Ent. mundtii* CRL35: titulación de enterocina CRL35

Esta técnica permite la detección de la actividad antimicrobiana del sobrenadante de cultivo correspondiente a la presencia de enterocina CRL35 frente a un microorganismo indicador (*Listeria monocytogenes* FBUNT). La actividad se detecta mediante la formación de un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador dado por la difusión de la bacteriocina (Saavedra, 2004). Mediante esta técnica se determinó la actividad antimicrobiana del sobrenadante de cultivo obtenido por centrifugación (12.200 xg 10 min) de *Ent. mundtii* creciendo en SCM de forma individual y en cocultivo con ECEH a T1 y T2. Brevemente, se preparan diluciones seriadas (1:2) del sobrenadante libre de células. Se mezcla 10 μ l de un cultivo toda la noche de la cepa indicadora (1×10^8 UFC/ml) con 10 ml de TSB agar blando (0,7% agar p/v) atemperado a 45°C y se agrega sobre la

superficie de una placa de Petri que contiene 10 ml de TSB agar 1,5% sólido. Una vez solidificada esta capa de agar blando (aprox. 15 min) se realizan orificios de 5 mm con sorbetes estériles y se siembran en cada uno de ellos 30 µl de las diluciones realizadas. Se incuban las placas sin invertir por 24 h a 37°C.

El título de la bacteriocina se expresa como unidades arbitrarias por ml (UA/ml) y se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{UA}{ml} = \frac{1}{ml \text{ sembrados}} \times \text{inversa de la máxima dilución con actividad}$$

INTERACCIONES MICROBIANAS EN CONDICIONES TECNOLÓGICAS

Procesado y obtención de carne molida

Se trabajó con una pieza de carne vacuna de 5 kg de origen comercial, la cual fue procesada en condiciones asépticas (con guantes en flujo laminar). Previo a su utilización tanto la superficie de los materiales utilizados como la superficie de la pieza de carne fueron rociadas con alcohol 96° y secadas en flujo laminar. Luego se sometieron a radiación ultravioleta durante 15 minutos. La pieza de carne se colocó sobre una tabla para su procesamiento. Utilizando un bisturí estéril y regularmente flameado, se descartó la capa superior de carne (aproximadamente 2 cm de capa superficial). La pieza de carne restante se cortó en pequeños trozos con bisturí, y fueron colocados en el recipiente de una procesadora de cocina. Dichos trozos se procesaron hasta obtener carne suficientemente triturada, simil carne molida (CM). Este proceso de triturado se repitió hasta agotar la pieza de carne. La carne ya triturada se colocó en bolsas de muestreo estériles, conteniendo cada una de ellas aproximadamente 200 gramos de carne (se realizó la pesada en flujo). Se tomó una pequeña cucharada de carne de cada bolsa fraccionada y se colocó en una bolsa de Stomacher estéril. Se agregó solución fisiológica para obtener una dilución 1/10 de la muestra (ejemplo: a 5 gramos de carne pesadas se agrega solución fisiológica hasta obtener 50 gramos de peso). La muestra se homogeneizó mediante Stomacher, Stomacher 400 (Stomacher, Londres, Reino Unido) durante 2 ciclos de 120 s. Del extracto obtenido se realizaron diluciones al décimo en solución fisiológica que fueron sembradas en medio PCA agarizado a fin de obtener un recuento basal de la microbiota presente. Se incubaron las placas a 30°C durante 48 h. Finalmente las bolsas conteniendo la carne molida fueron selladas bajo vacío (Selladora de polietileno por impulso Lipari CC400) y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

Estudios fisiológicos en carne molida

Se descongelaron las bolsas de carne molida necesarias según los lotes a estudiar (50 gr/lote). Se pesaron asépticamente porciones de 50 gr de carne molida para cada lote y se colocaron en bolsas de muestreo. Cada bolsa con 50 gr de carne fue inoculada con 5 ml de solución fisiológica conteniendo el inóculo (UFC/gr carne) correspondiente según la condición a estudiar (ver Tabla 6.13). Además a cada lote se agregó 5 ml de solución de glucosa 0,5% (p/v). Se mezcló manualmente la carne inoculada para permitir el íntimo contacto entre el inóculo y la carne. Los diferentes lotes fueron incubados a 16°C durante 72h. En los tiempos T 0, 7, 24, 48, 72 h se tomaron asépticamente 5 gr de carne de cada lote y se colocaron en una nueva bolsa estéril para Stomacher, agregando solución fisiológica hasta lograr dilución 1/10. Cada muestra luego se pasó por el digestor (Stomacher Blender, UK) en 2 ciclos de 1 minuto cada uno. Se tomaron 3 ml de la muestra homogeneizada, se colocaron en recipiente adecuado y realizó medición de pH en pHmeter Altronix TPX I (Nueva York, EE. UU.). A partir del homogeneizado (el cual constituye la primera dilución de la muestra) se realizaron diluciones 1/10 en solución fisiológica y 20 µl de cada dilución fueron sembrados por duplicado en medios de cultivos agarizados, aplicando el método de la gota (Miles y col., 1938). Los medios de cultivo utilizados fueron agar Mac Conkey Sorbitol para ECEH, MRS para *Ent. mundtii* y PCA como control para el recuento de mesófilos totales. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 h. Se realizó finalmente recuento bacteriano.

Tabla 6.13. Se detalla la carga microbiana y el tiempo de inoculación para cada lote de carne molida estudiado. T0: inoculación al inicio de incubación. T6: inoculación luego de 6 horas de incubación a 16°C.

N° lote	Lotes	Inóculo (UFC/gr)
1	Control	Sin inóculo
2	ECEH crecimiento individual	T0: 10 ⁴
3	<i>Ent. mundtii</i> crecimiento individual	T0: 10 ⁷
4	Cocultivo - Efecto competitivo	T0: 10 ⁷ <i>Ent. mundtii</i> + 10 ⁴ EHEC
5	Cocultivo - Efecto preventivo	T0: 10 ⁷ <i>Ent. mundtii</i> T6: 10 ⁴ EHEC
6	Cocultivo - Efecto desplazamiento	T0: 10 ⁴ EHEC T6: 10 ⁷ <i>Ent. mundtii</i>

BIBLIOGRAFÍA



CAPITULO

CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA

A

- Acuña, L., Corbalan, N.S., Fernandez-No, I.C., Morero, R.D., Barros-Velazquez, J. y Bellomio, A. (2015). "Inhibitory effect of the hybrid bacteriocin Ent35-MccV on the growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in model and food systems". *Food and Bioprocess Technology* 8, 1063-1075.
- Aguilera, J. y Chirife, J. (1994). "Combined methods for the preservation of foods in Latin America and the CYTED-D project," in *Water in Foods*. Elsevier, 433-444.
- Angmo, K., Kumari, A. y Bhalla, T.C. (2016). "Antagonistic activities of lactic acid bacteria from fermented foods and beverage of Ladakh against *Yersinia enterocolitica* in refrigerated meat". *Food Bioscience* 13, 26-31.
- Atassi, F. y Servin, A.L. (2010). "Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120 1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens". *FEMS microbiology letters* 304, 29-38.
- Ausubel, F. (1999). "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, FM, Brent, R., Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA, and Struhl, K., eds) John Wiley & Sons. Inc, New York.
- Ayaz, N.D., Gencay, Y.E. y Erol, I. (2014). "Prevalence and molecular characterization of sorbitol fermenting and non-fermenting *Escherichia coli* O157: H7+/H7-isolated from cattle at slaughterhouse and slaughterhouse wastewater". *International Journal of Food Microbiology* 174, 31-38.

B

- Bae, Y.M., Yoon, J.H., Kim, J.Y. y Lee, S.Y. (2018). "Identifying the mechanism of *Escherichia coli* O157: H7 survival by the addition of salt in the treatment with organic acids". *Journal of Applied Microbiology* 124, 241-253.
- Baillo, A.A. (2018). "Interacción entre Bacterias Lácticas y *Escherichia coli* enterohemorrágica: estudios fisiológicos y moleculares". Tesis de grado, UNT.
- Barco, L., Belluco, S., Roccató, A. y Ricci, A. (2015). "A systematic review of studies on *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* on beef carcasses at the slaughterhouse". *International Journal of Food Microbiology* 207, 30-39.

- Bearson, B.L., Lee, I.S. y Casey, T.A. (2009). "Escherichia coli O157:H7 glutamate- and arginine-dependent acid-resistance systems protect against oxidative stress during extreme acid challenge". *Microbiology* 155, 805-812.
- Belfiore, C., Castellano, P. y Vignolo, G. (2007). "Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators". *Food Microbiology* 24, 223-229.
- Benedict, R., Schultz, F. y Jones, S. (1990). "Attachment and removal of *Salmonella* spp. on meat and poultry tissues". *Journal of Food Safety* 11, 135-148.
- Best, A., La Ragione, R.M., Cooley, W.A., O'connor, C.D., Velge, P. y Woodward, M.J. (2003). "Interaction with avian cells and colonisation of specific pathogen free chicks by Shiga-toxin negative *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900)". *Vet Microbiol* 93, 207-222.
- Bi, X., Wang, Y., Hu, X. y Liao, X. (2017). "iTRAQ-Based Proteomic analysis of sublethally injured *Escherichia coli* O157: H7 cells induced by high pressure carbon dioxide". *Frontiers in microbiology* 8, 2544.
- Bolton, D.J., Doherty, A.M. y Sheridan, J.J. (2001). "Beef HACCP: intervention and non-intervention systems". *International Journal of Food Microbiology* 66, 119-129.
- Bonacina, J. (2017). "Genomic and functional analysis of enterococci isolated from food". Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Tucumán.
- Bonacina, J., Saavedra, L., Suarez, N.E. y Sesma, F. (2014). "Draft genome sequence of the nonstarter bacteriocin-producing strain *Enterococcus mundtii* CRL35". *Genome Announc* 2.
- Boontim, N., Khanongnuch, C., Pathom-Aree, W., Niamsup, P. y Lumyong, S. (2018). "Production of L-lactic acid by thermotolerant lactic acid bacteria". *Chiang Mai Journal of Science* 45, 68-76.
- Branchu, P., Matrat, S., Vareille, M., Garrivier, A., Durand, A., Crépin, S., Harel, J., Jubelin, G. y Gobert, A.P. (2014). "NsrR, GadE, and GadX interplay in repressing expression of the *Escherichia coli* O157: H7 LEE pathogenicity island in response to nitric oxide". *PLoS pathogens* 10, e1003874.

C

- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. y Righetti, P.G. (2004). "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis". *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H. y Oswald, E. (2005). "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission". *Veterinary research* 36, 289-311.
- Carlson, B.A., Ruby, J., Smith, G.C., Sofos, J.N., Bellinger, G.R., Warren-Serna, W., Centrella, B., Bowling, R.A. y Belk, K.E. (2008). "Comparison of antimicrobial efficacy of multiple

- beef hide decontamination strategies to reduce levels of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella*". *Journal of Food Protection* 71, 2223-2227.
- Castaldo, C., Vastano, V., Siciliano, R.A., Candela, M., Vici, M., Muscariello, L., Marasco, R. y Sacco, M. (2009). "Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein". *Microbial Cell Factories* 8, 14.
- Castellano, P., Belfiore, C. y Vignolo, G. (2011). "Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157: H7 in frozen ground-beef patties". *Food Control* 22, 1461-1465.
- Castellano, P., Gonzalez, C., Carduza, F. y Vignolo, G. (2010). "Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics". *Meat Sci* 85, 394-401.
- Castellano, P., Pérez Ibarreche, M., Blanco Massani, M., Fontana, C. y Vignolo, G. (2017). "Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: a focus on meat ecosystems and industrial environments". *Microorganisms* 5, 38.
- Castellano, P., Raya, R. y Vignolo, G. (2003). "Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705". *International Journal of Food Microbiology* 85, 35-43.
- Castellano, P. y Vignolo, G. (2006). "Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins". *Letters in Applied Microbiology* 43, 194-199.
- Cohen, D.P., Renes, J., Bouwman, F.G., Zoetendal, E.G., Mariman, E., De Vos, W.M. y Vaughan, E.E. (2006). "Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database". *Proteomics* 6, 6485-6493.
- Cortés-Sánchez, A.D.J. y Salgado-Cruz, M.D.L.P. (2017). "*Escherichia coli* O157: H7 in the context of foodborne diseases and public health". *Environmental and Experimental Biology* 15, 191-200.
- Chagnot, C., Agus, A., Renier, S., Peyrin, F., Talon, R., Astruc, T. y Desvaux, M. (2013). "In vitro colonization of the muscle extracellular matrix components by *Escherichia coli* O157: H7: the influence of growth medium, temperature and pH on initial adhesion and induction of biofilm formation by collagens I and III". *PLoS One* 8, e59386.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.-M., Dudez, A.-M., Martin, V., Beauflis, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R. y Loux, V. (2005). "The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K". *Nature biotechnology* 23, 1527-1533.
- Chalón, M.C., Acuña, L., Morero, R.D., Minahk, C.J. y Bellomio, A. (2012). "Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods: Are they the definite hurdle?". *Food Research International* 45, 735-744.

Champomier-Vergès, M.-C., Zagorec, M. y Fadda, S. (2010). "Proteomics: A Tool for Understanding Lactic Acid Bacteria Adaptation to Stressful Environments," in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications*, ed. Raúl Ricardo Raya Fernanda Mozzi, Graciela M. Vignolo. (2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA), 57-72.

D

Daegelen, P., Studier, F.W., Lenski, R.E., Cure, S. y Kim, J.F. (2009). "Tracing ancestors and relatives of *Escherichia coli* B, and the derivation of B strains REL606 and BL21 (DE3)". *Journal of Molecular Biology* 394, 634-643.

De Angelis, M., Calasso, M., Cavallo, N., Di Cagno, R. y Gobbetti, M. (2016). "Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*". *Proteomics* 16, 946-962.

De Man, J., Rogosa, D. y Sharpe, M.E. (1960). "A medium for the cultivation of lactobacilli". *Journal of Applied Microbiology* 23, 130-135.

Delahay, R.M., Frankel, G. y Knutton, S. (2001). "Intimate interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface". *Current Opinion in Infectious Diseases* 14, 559-565.

Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F. y Nychas, G.-J.E. (2012). "Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions". *International Journal of Food Microbiology* 157, 130-141.

Durruthy, J.C., Pérez, M.C.L., Suárez, Y.B., Hinojosa, M.R. y Reyes, I.E. (2018). "Problemas medioambientales y transmisión de enfermedades por alimentos". *Revista de Información Científica* 97, 387-397.

E

Efsa (2004). "Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry". *The EFSA Journal* 1 14, 1-74.

Eymann, A., Coccia, P., Raddavero, C., Lafi, G., Ferraris, V., Ramírez, J. y Ferraris, J. (2016). "Prevalence and clinical course of typical hemolytic uremic syndrome among siblings". *Archivos argentinos de pediatría* 114, 553-556.

F

Fadda, S., Lopez, C. y Vignolo, G. (2010). "Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers". *Meat Sci* 86, 66-79.

Fadda, S., Saavedra, L., Belfiore, C. y Vignolo, G. (2012). "Lactic Acid Bacteria in Meat and Fish" in *New Approaches for Traditional Applications Lactobacillus: Classification, Uses and Health Implications*, eds. Perez Campos Alba I. y Mena Arturo Leon. Nova Publishers), 147-176.

- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M., Oliver, G. y Toldra, F. (1999). "Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*". *Applied and Environmental Microbiology* 65, 578-584.
- Fadda, S., Vignolo, G., Holgado, A.P. y Oliver, G. (1998). "Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dryfermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins". *Meat Science* 49, 11-18.
- Farias, M., Farías, R., Holgado, A.D.R. y Sesma, F. (1996). "Purification and N-terminal amino acid sequence of Enterocin CRL 35, a 'pediocin-like' bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL 35". *Letters in Applied Microbiology* 22, 417-419.
- Fernández-Brando, R.J., Bentancor, L.V., Mejías, M.P., Panek, A.C., Cabrera, G.G., Exeni, R.A. y Palermo, M.S. (2011). "Actualización en el tratamiento del síndrome urémico hemolítico endémico: Patogénesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga". *Medicina (Buenos Aires)* 71, 383-389.
- Frank, J.F. (2001). "Microbial attachment to food and food contact surfaces". *Advances in Food and Nutrition Research* 43, 319-370.
- Fraser, M.E., Fujinaga, M., Cherney, M.M., Melton-Celsa, A.R., Twiddy, E.M., O'brien, A.D. y James, M.N. (2004). "Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7". *Journal of Biological Chemistry*.
- Fratamico, P.M., Schultz, F.J., Benedict, R.C., Buchanan, R.L. y Cooke, P.H. (1996). "Factors influencing attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to beef tissues and removal using selected sanitizing rinses". *Journal of Food Protection* 59, 453-459.

G

- Galperin, M.Y., Makarova, K.S., Wolf, Y.I. y Koonin, E.V. (2015). "Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database". *Nucleic Acids Research* 43, D261-269.
- Gamage, S.D., Strasser, J.E., Chalk, C.L. y Weiss, A.A. (2003). "Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin". *Infection and Immunity* 71, 3107-3115.
- García-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J. y Devlieghere, F. (2007). "High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future". *International Journal of Food Microbiology* 117, 1-28.
- García, A., Fox, J.G. y Besser, T.E. (2010). "Zoonotic enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a One Health perspective". *ILAR journal* 51, 221-232.
- Giannakourou, M., Koutsoumanis, K., Nychas, G. y Taoukis, P. (2001). "Development and assessment of an intelligent shelf life decision system for quality optimization of the food chill chain". *Journal of Food Protection* 64, 1051-1057.

- Gil, C. y Monteoliva, L. (2014). "Trends in microbial proteomics". *Journal of Proteomics* 97, 1-2.
- Goh, S., Newman, C., Knowles, M., Bolton, F., Hollyoak, V., Richards, S., Daley, P., Counter, D., Smith, H. y Keppie, N. (2002). "E. coli O157 phage type 21/28 outbreak in North Cumbria associated with pasteurized milk". *Epidemiology & Infection* 129, 451-457.
- Graham, C.W. (1996). "The SOS response of *Escherichia coli*". *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology*, 1400-1416.
- Graham, R.L., Graham, C. y McMullan, G. (2007). "Microbial proteomics: a mass spectrometry primer for biologists". *Microbial Cell Factories* 6, 26.
- Grosu-Tudor, S.-S., Brown, L., Hebert, E.M., Brezeanu, A., Brinzan, A., Fadda, S., Mozzi, F. y Zamfir, M. (2016). "S-layer production by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 under environmental stress conditions". *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 4573-4583.

H

- Hebert, E.M., Saavedra, L., Taranto, M.P., Mozzi, F., Magni, C., Nader, M.E., Font De Valdez, G., Sesma, F., Vignolo, G. y Raya, R.R. (2012). "Genome sequence of the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CRL705". *Journal of Bacteriology* 194, 538-539.

J

- Jeffery, C.J. (2015). "Why study moonlighting proteins?" *Frontiers in Genetics* 6.
- Jin, L., Marquardt, R. y Zhao, X. (2000). "A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus". *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4200-4204.
- Johansen, B.K., Wasteson, Y., Granum, P.E. y Brynstad, S. (2001). "Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157: H7 indicates frequent gene exchange between lambdaoid phage genomes". *Microbiology* 147, 1929-1936.
- Jordan, K., Dalmasso, M., Zentek, J., Mader, A., Bruggeman, G., Wallace, J., De Medici, D., Fiore, A., Prukner-Radovic, E. y Lukac, M. (2014). "Microbes versus microbes: control of pathogens in the food chain". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 3079-3089.

K

- Kassem, A., Meade, J., Gibbons, J., McGill, K., Walsh, C., Lyng, J. y Whyte, P. (2017). "Evaluation of chemical immersion treatments to reduce microbial populations in fresh beef". *International Journal of Food Microbiology* 261, 19-24.
- Kjos, M., Nes, I.F. y Diep, D.B. (2009). "Class II one-peptide bacteriocins target a phylogenetically defined subgroup of mannose phosphotransferase systems on sensitive cells". *Microbiology* 155, 2949-2961.

- Kocharunchitt, C., King, T., Gobius, K., Bowman, J.P. y Ross, T. (2012). "Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the physiological response of *Escherichia coli* O157:H7 Sakai to steady-state conditions of cold and water activity stress". *Molecular & Cellular Proteomics* 11, M111. 009019.
- Koistinen, K.M., Plumed-Ferrer, C., Lehesranta, S.J., Karenlampi, S.O. y Von Wright, A. (2007). "Comparison of growth-phase-dependent cytosolic proteomes of two *Lactobacillus plantarum* strains used in food and feed fermentations". *FEMS Microbiology Letters* 273, 12-21.
- Konowalchuk, J., Speirs, J. y Stavric, S. (1977). "Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*". *Infection and Immunity* 18, 775-779.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P. y Nychas, G.-J. (2006). "Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions". *Applied and Environmental Microbiology* 72, 124-134.

L

- Laciar, A.L., Ruiz, M.L.V. y Le Monnier, A. (2011). "Neonatal *Listeria*-meningitis in San Luis, Argentina: a three-case report". *Revista Argentina de Microbiología* 43, 45-47.
- Leistner, L. (1978). Hurdle effect and energy saving. *Food quality and nutrition*, 553-557.
- Leistner, L. (1994). "Food design by hurdle technology and HACCP". Adalbert-Raps-Foundation.
- Leistner, L. (1995). "Principles and applications of hurdle technology" in *New methods of food preservation*. ed. G. W. Gould. Springer, Boston, MA 1-21.
- Leistner, L. (1999). "Combined methods for food preservation". *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker-*, 457-486.
- Lezzi, S., Sallovitz, J.M. y Purslow, P. (2016). "Eficacia de la aspersion de ácido láctico (4%) en el descenso de enterobacterias totales y *Escherichia coli* en reses bovinas". *Revista veterinaria* 27, 41-44.
- Liebler, D. (2002). "Introduction to Proteomics: Tools for the new biology". Totowa, NJ: Humana Press, Inc.
- Lilley, K.S., Razzaq, A. y Dupree, P. (2002). "Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation". *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 46-50.
- Lim, J.Y., Yoon, J. y Hovde, C.J. (2010). "A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157". *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 5-14.

M

- Macfaddin, J. (1985). "Mannitol salt agar (MSA). *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*". Baltimore: Williams & Wilkins, 483-486.

- Magasanik, B. y Rothstein, D.M. (2012). "The Role of Glutamine Synthetase in the Regulation of Bacterial Nitrogen Metabolism," in *Glutamine: metabolism, enzymology, and regulation*, eds. Jaime Mora y Rafael Palacios. (Mexico: Elsevier).
- Masana, M.O., Barrio, Y.X., Palladino, P.M., Sancho, A.M. y Vaudagna, S.R. (2015). "High pressure treatments combined with sodium lactate to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 and spoilage microbiota in cured beef carpaccio". *Food microbiology* 46, 610-617.
- Mataragas, M., Drosinos, E., Vaidanis, A. y Metaxopoulos, I. (2006). "Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions". *Journal of Food Science* 71, M157-M167.
- Mehr, K.S., Mousavi, S.L., Rasooli, I., Amani, J. y Rajabi, M. (2012). "A DNA Vaccine against *Escherichia coli* O157:H7". *Iranian Biomedical Journal* 16, 133.
- Miles, A.A., Misra, S. y Irwin, J. (1938). "The estimation of the bactericidal power of the blood". *Epidemiology & Infection* 38, 732-749.
- Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A. y McClements, D.J. (2016). "Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*". *Food Chemistry* 194, 410-415.
- Mukherjee, J., Chios, K., Fishwild, D., Hudson, D., O'donnell, S., Rich, S.M., Donohue-Rolfe, A. y Tzipori, S. (2002). "Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection". *Infection and Immunity* 70, 612-619.

N

- Nadya, S., Delaquis, P., Chen, J., Allen, K., Johnson, R.P., Ziebell, K., Laing, C., Gannon, V., Bach, S. y Topp, E. (2016). "Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from surface waters and sediments in a Canadian urban-agricultural landscape". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6, 36.
- Nallapareddy, S.R., Qin, X., Weinstock, G.M., Höök, M. y Murray, B.E. (2000). "*Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I". *Infection and Immunity* 68, 5218-5224.
- Nørrung, B. y Buncic, S. (2008). "Microbial safety of meat in the European Union". *Meat Science* 78, 14-24.

O

- O'brien, A.D., Laveck, G.D., Thompson, M.R. y Formal, S.B. (1982). "Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*". *The Journal of Infectious Diseases* 146, 763-769.

O'brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.K., Smith, H.W. y Formal, S.B. (1984). "Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea". *Science* 226, 694-696.

Orihuel, A., Bonacina, J., Vildoza, M.J., Bru, E., Vignolo, G., Saavedra, L. y Fadda, S. (2018). "Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a meat model using a combination of a bacteriocinogenic strain with curing additives". *Food Research International* 107, 289-296.

P

Paton, A.W. y Paton, J.C. (1998). "Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx 1, stx 2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfb O111, and rfb O157". *Journal of Clinical Microbiology* 36, 598-602.

Peng, Z., Krey, V., Wei, H., Tan, Q., Vogelmann, R., Ehrmann, M.A. y Vogel, R.F. (2014). "Impact of actin on adhesion and translocation of *Enterococcus faecalis*". *Archives of Microbiology* 196, 109-117.

Pingitore, E.V., Todorov, S.D., Sesma, F. y De Melo Franco, B.D.G. (2012). "Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese". *Food Microbiology* 32, 38-47.

Prudêncio, C.V., Dos Santos, M.T. y Vanetti, M.C.D. (2015). "Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology". *Journal of Food Science and Technology* 52, 5408-5417.

R

Ramnath, M., Arous, S., Gravesen, A., Hastings, J.W. y Hechard, Y. (2004). "Expression of mptC of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*". *Microbiology* 150, 2663-2668.

Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M. y Swerdlow, D.L. (2005). "Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, united states, 1982-2002". *Emerging Infectious Diseases* 11, 603.

Rasooly, R. y Do, P.M. (2010). "Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization". *International Journal of Food Microbiology* 136, 290-294.

Ratman, S. y March, S. (1986). "Sporadic occurrence of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* in New-foundland". *Canadian Medical Association Journal* 134, 43-49.

Repetto, H.A. (2005). "Long-term course and mechanisms of progression of renal disease in hemolytic uremic syndrome". *Kidney International* 68, S102-S106.

Rich, A.R., Jepson, A.N., Luebke, M.K., Erickson, G.E., Klopfenstein, T.J., Smith, D.R. y Moxley, R.A. (2010). "Vaccination to reduce the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in

- feedlot cattle fed wet distillers grains plus solubles". *Nebraska Beef Cattle Reports* 580.
- Rios-Covián, D., Sánchez, B., Martínez, N., Cuesta, I., Hernández-Barranco, A.M., De Los Reyes-Gavilán, C.G. y Gueimonde, M. (2016). "A proteomic approach towards understanding the cross talk between *Bacteroides fragilis* and *Bifidobacterium longum* in coculture". *Canadian journal of microbiology* 62, 623-628.
- Rios-Covian, D., Sánchez, B., Salazar, N., Martínez, N., Redruello, B., Gueimonde, M. y De Los Reyes-Gavilán, C.G. (2015). "Different metabolic features of *Bacteroides fragilis* growing in the presence of glucose and exopolysaccharides of bifidobacteria". *Frontiers in Microbiology* 6.
- Rivas, L., Dykes, G.A. y Fegan, N. (2006a). "Attachment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* to beef muscle and adipose tissue". *Journal of Food Protection* 69, 999-1006.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N. y Leotta, G.A. (2006b). "Epidemiología del síndrome uremico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión". *Medicina* 66, 27-32.
- Rivero, M., Passucci, J., Rodriguez, E. y Parma, A. (2012). "Seasonal variation of HUS occurrence and VTEC infection in children with acute diarrhoea from Argentina". *European Journal of Clinical Microbiology & infectious diseases* 31, 1131-1135.
- Rivero, M.A., Passucci, J.A., Rodriguez, E.M. y Parma, A.E. (2010). "Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina". *Journal of Medical Microbiology* 59, 345-352.
- Robinson, C.M., Sinclair, J.F., Smith, M.J. y O'Brien, A.D. (2006). "Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9667-9672.
- Rojas-Herrera, R.A. y González-Flores, T. (2006). "Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa". *Bioquímica* 31, 69-76.
- Römer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegl, B., Tenza, D., Aly, M.R., Fraissier, V., Florent, J.-C. y Perrais, D. (2007). "Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells". *Nature* 450, 670.

S

- Saavedra, L., Castellano, P., Sesma, F. (2004). "Purificación de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas," in *Microbiología de Salud Pública. Métodos y protocolos*, ed. J.F.T. Spencer Y A.L. Ragout De Spencer. (Humana Press. Totowa, New Jersey, USANew Jersey, USA), 331-336.
- Saeedi, P., Yazdanparast, M., Behzadi, E., Salmanian, A.H., Mousavi, S.L., Nazarian, S. y Amani, J. (2017). "A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals". *Microbial Pathogenesis* 103, 186-195.

- Salvucci, E., Saavedra, L. y Sesma, F. (2007). "Short peptides derived from the NH₂-terminus of subclass IIa bacteriocin enterocin CRL35 show antimicrobial activity". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59, 1102-1108.
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual", 3 vols. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Schlundt, J., Toyofuku, H., Jansen, J. y Herbst, S. (2004). "Emerging food-borne zoonoses". *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 23, 513-534.
- Semanjski, M. y Macek, B. (2016). "Shotgun proteomics of bacterial pathogens: advances, challenges and clinical implications". *Expert Rev Proteomics* 13, 139-156.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. y Ideker, T. (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks". *Genome Research* 13, 2498-2504.
- Signorini, M., Costa, M., Teitelbaum, D., Restovich, V., Brasesco, H., García, D., Superno, V., Petrolí, S., Bruzzone, M. y Arduini, V. (2018). "Evaluation of decontamination efficacy of commonly used antimicrobial interventions for beef carcasses against Shiga toxin-producing *Escherichia coli*". *Meat Science* 142, 44-51.
- Skandamis, P.N. y Nychas, G.-J.E. (2000). "Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations". *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1646-1653.
- Smith, L., Mann, J., Harris, K., Miller, M. y Brashears, M. (2005). "Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in ground beef using lactic acid bacteria and the impact on sensory properties". *Journal of Food Protection* 68, 1587-1592.
- Sofos, J.N. (2008). "Challenges to meat safety in the 21st century". *Meat Science* 78, 3-13.
- Sparo, M., Confalonieri, A., Urbizu, L., Ceci, M. y Sánchez Bruni, S. (2013). "Bio-preservation of ground beef meat by *Enterococcus faecalis* CECT7121". *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 43-49.
- Sperandio, V. y Pacheco, A.R. (2012). "Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2, 81.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L.J. y Von Mering, C. (2015). "STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life". *Nucleic Acids Res* 43, D447-452.

T

- Tamblyn, K.C. y Conner, D.E. (1997). "Bactericidal Activity of Organic Acids against *Salmonella typhimurium* Attached to Broiler Chicken Skint". *Journal of Food Protection* 60, 629-633.

Tarr, P.I., Gordon, C.A. y Chandler, W.L. (2005). "Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome". *The lancet* 365, 1073-1086.

Thelen, J.J. (2007). "Introduction to proteomics: "A brief historical perspective on contemporary approaches" in *Plant Proteomics*. Springer, 1-13.

Thomson, D.U., Loneragan, G.H., Thornton, A.B., Lechtenberg, K.F., Emery, D.A., Burkhardt, D.T. y Nagaraja, T.G. (2009). "Use of a siderophore receptor and porin proteins-based vaccine to control the burden of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle". *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 871-877.

U

Uniprot, C. (2015). "UniProt: a hub for protein information". *Nucleic Acids Res* 43, D204-212.

V

Vignolo, G.M., Ruiz Holgado, A.P.D. y Oliver, G. (1988). "Acid production and proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry sausages". *Journal of Food Protection* 51, 481-484.

Visvalingam, J. y Holley, R.A. (2018). "Evaluation of chlorine dioxide, acidified sodium chlorite and peroxyacetic acid for control of *Escherichia coli* O157:H7 in beef patties from treated beef trim". *Food Research International* 103, 295-300.

W

Wachsman, M.B., Farías, M.a.E., Takeda, E., Sesma, F., De Ruiz Holgado, A.P., De Torres, R.A. y Coto, C.E. (1999). "Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses". *International Journal of Antimicrobial Agents* 12, 293-299.

Weeratna, R.D. y Doyle, M.P. (1991). "Detection and production of verotoxin 1 of *Escherichia coli* O157:H7 in food". *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2951-2955.

Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E.B., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. y Von Wright, A. (2004). "The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation". *Trends in Food Science & Technology* 15, 498-505.

Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwathana, A., Benjakul, S. y Visessanguan, W. (2016). "Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products". *Meat Science* 120, 118-132.

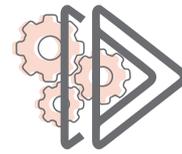
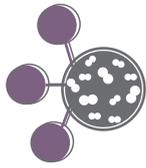
Y

Yadav, A.K., Tyagi, A., Kumar, A., Saklani, A.C., Grover, S. y Batish, V.K. (2015). "Adhesion of indigenous *Lactobacillus plantarum* to gut extracellular matrix and its physicochemical characterization". *Archives of Microbiology* 197, 155-164.

- Yang, D., Wu, X., Yu, X., He, L., Shah, N.P. y Xu, F. (2017). "Mutual growth-promoting effect between *Bifidobacterium bifidum* WBB103 and *Listeria monocytogenes* CMCC 54001". *Journal of Dairy Science* 100, 3448-3462.
- Yang, Y., Hu, M., Yu, K., Zeng, X. y Liu, X. (2015). "Mass spectrometry-based proteomic approaches to study pathogenic bacteria-host interactions". *Protein & cell* 6, 265-274.
- Yousef, A.E. y Courtney, P.D. (2003). "Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods". *Microbial Stress Adaptation and Food Safety* 1, 1-30.

Z

- Zhang, J., Ye, K.-P., Zhang, X., Pan, D.-D., Sun, Y.-Y. y Cao, J.-X. (2017). "Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*". *Frontiers in Microbiology* 7, 2094.
- Zulfakar, S.S., White, J.D., Ross, T. y Tamplin, M.L. (2012). "Bacterial attachment to immobilized extracellular matrix proteins in vitro". *International Journal of Food Microbiology* 157, 210-217.



Escherichia coli enterohemorrágico (ECEH)

es un patógeno alimentario, transmitido principalmente a través de productos cárnicos y causante del Síndrome Urémico Hemolítico, principal causa de insuficiencia renal aguda en niños en Argentina, siendo a nivel mundial, el país con mayor incidencia de esta patología. Por ello, **ECEH** constituye una gran preocupación para la sostenibilidad de la industria de la carne y una grave amenaza para la salud pública. En este contexto surge la necesidad de aportar, desde el ámbito científico, soluciones inmediatas para prevenir riesgos futuros.

Los estudios fisiológicos, proteómicos y tecnológicos llevados a cabo en esta tesis sientan las bases para la utilización de un cultivo láctico bioprotector como estrategia biológica para el control de este patógeno, constituyendo un importante aporte a la tecnología de alimentos cárnicos, con impacto positivo en salud pública.

Bioq. Alejandra Orihuel
2018