

INHIBICIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 POR CEPAS *Lactobacillus* AISLADAS DE QUESO OVINO

Vallejo M, Etchechoury V, Horiszny C, Marguet E

Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew),
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Resumen: En el presente trabajo se estudió la actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli* O157:H7 de 6 cepas seleccionadas de *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. El efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas ensayadas no se inhibió por la actividad enzimática de la catalasa o la tripsina. En consecuencia, la producción de H₂O₂ o de un agente de naturaleza proteica, no se consideró como responsable del efecto inhibitorio. Por el contrario, la alcalinización neutralizó el efecto antibacteriano de los sobrenadantes, resultado que demostró que las cepas seleccionadas ejercieron la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7 debido a la producción de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico. La aplicación directa de cepas de bacterias ácido lácticas y/o sus metabolitos antimicrobianos para inhibir bacterias patógenas en alimentos se introdujo en el concepto de biopreservación. Estos resultados sugieren que las cepas de *Lactobacillus* estudiadas podrían ser utilizadas como cultivos iniciadores o adjuntos para mejorar la calidad microbiológica en la elaboración de queso ovino.

Palabras claves: *Escherichia coli* O157:H7, *Lactobacillus*, queso ovino

INHIBITION OF *Escherichia coli* O157:H7 BY *Lactobacillus* STRAINS ISOLATED FROM OVINE CHEESE

Abstract: In the present work the inhibitory activity on *Escherichia coli* O157:H7 of 6 selected *Lactobacillus* strains isolated from ovine cheese was studied. The antimicrobial effect of culture supernatants of assayed strains was not inhibited by enzymatic activity of catalase or trypsin. Therefore, the production of H₂O₂ or proteinase nature agent was not considered responsible for the inhibitory effect. On the other hand, the alcalinization abolished the antibacterial effect of the supernatants, result that demonstrated that the selected strains exert growth inhibition of *E. coli* O157:H7 due to production of organic acids, mainly lactic acid. The direct application of lactic acid bacteria strains and/or their antimicrobial metabolites to inhibit pathogenic bacteria in food was introduced in the concept of biopreservation. These results suggest that *Lactobacillus* strains studied could be used as starter or adjunct cultures to improve the microbiology safety in the manufacture of ovine cheese.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, *Lactobacillus*, ovine cheese

Fecha de recepción: 20/06/08

Fecha de aprobación: 01/09/08

Dirección para correspondencia: Emilio Marguet. Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Roca 115. (9100) Trelew.
E-mail: emarguet @yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (ECTS) es una enterobacteria comúnmente hallada en el tracto gastrointestinal (GI) de rumiantes, particularmente ganado bovino. *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) es un subtipo de ECTS que tiene la particularidad de colonizar el epitelio GI y producir severas enfermedades en el hombre, donde se destacan el síndrome urémico hemolítico (SUH), colitis hemorrágica (CH) y púrpura trombocitopénica (PT). Las toxinas Shiga Stx1, Stx2 y sus variantes son las responsables principales de la capacidad virulenta de estos microorganismos (1, 2). Otros factores como la intimina, responsable de la unión a eritrocitos y microvellosidades y la enterolisina, una citolisina formadora de poros, también contribuyen a su patogenicidad (3).

Muchos serotipos de *E. coli* productores de toxina Shiga han sido vinculados con SUH o CH en distintas regiones del mundo, sin embargo *E. coli* O157:H7 constituye el serotipo más prevalente asociado a casos esporádicos o brotes (2). Estas enfermedades infecciosas afectan especialmente a niños y se pueden producir como consecuencia del consumo de productos cárnicos sin adecuada cocción, leche cruda o derivados lácteos elaborados con leche sin un apropiado tratamiento térmico (4).

El SUH constituye un serio problema sanitario que ha sido reportado en todo el mundo, principalmente en países desarrollados del hemisferio norte. Argentina presenta la más alta incidencia de SUH (300-400 casos por año) por lo que ha sido considerado una patología endémica por la Organización Panamericana de la Salud.

Muchos estudios realizados en Argentina han demostrado una alta prevalencia de *E. coli* O157:H7 en ganado bovino (2, 3) y, aunque se ha demostrado su presencia en ganado ovino (5), no existen estudios que permitan establecer el estado actual en esta especie.

En la región patagónica, como en otras regiones del mundo con difíciles condiciones climáticas, lluvias escasas e irregulares y suelos erosionados, el ganado ovino constituye la especie dominante para la producción de fibras y carne. En los últimos años, en el Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh) se concretó la idea del desarrollo de una cuenca lechera ovina destinada principalmente a la elaboración de quesos, como una forma de diversificar la producción (6). Este tipo de explotación es llevado a cabo en pequeños establecimientos donde se elaboran los quesos en condiciones de higiene deficientes u omitiendo normas en puntos críticos del procesamiento, originando un producto de baja calidad sanitaria. En consecuencia existe la posibilidad de transmisión de enfermedades alimentarias, especialmente las producidas por *E. coli* O157:H7, mediante

el consumo de quesos de origen ovino (7).

La elaboración de quesos en el VIRCh se realiza de acuerdo a protocolos preestablecidos (6) y utilizando productos comerciales para el proceso de fermentación. Las bacterias ácido lácticas (BAL) del fermento se encuentran al comienzo de la maduración en un alto número que luego comienza a declinar a medida que el proceso avanza. En las últimas etapas de la maduración, la flora adjunta originaria del ambiente de las queserías o de la leche, resulta dominante en la masa casearia, destacándose por su elevada población las cepas del género *Lactobacillus* (8).

Las BAL son bien conocidas por su capacidad de producir inhibidores tales como ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, diacetilo y una serie de compuestos no identificados (9, 10,11). La aplicación directa de BAL o de metabolitos con capacidad antimicrobiana para inhibir bacterias indeseadas en alimentos podemos incluirla dentro del concepto de biopreservación (12).

En este trabajo se reporta la capacidad inhibitoria de 6 cepas del género *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos sobre cepas de *E. coli* O157:H7. También se presentan los resultados de los ensayos complementarios que se realizaron con el propósito de determinar los principios activos de la propiedad antibiótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS

Las cepas de *E. coli* O157:H7 (ETw4, ETw6 y ETw20) utilizadas en este estudio pertenecen al cepario de la Cátedra de Biología Celular y Molecular (Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco).

TOMA DE MUESTRAS

Se analizaron quesos elaborados con leche ovina de tipo semiduros provenientes de dos plantas queseras ubicadas en la zona del VIRCh. Las muestras de queso se obtuvieron con sacabocado estéril y se procesaron dentro de las 4 horas.

AISLAMIENTO

Las muestras se sembraron en caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Biokar, Francia) acidificado a pH 4,6 y 5,4 con ácido clorhídrico 0,2 N. Luego de 24 h de incubación a 35 °C los cultivos se repicaron a agar MRS suplementado con ácido nalidixico (40 µg/ml) y cicloheximide (10 µg/ml). Las cepas se conservaron, hasta el momento de su utilización, a -30°C en viales con leche descremada (10 %) y glicerol (10 %).

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

Las colonias sospechosas se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas:

- Coloración de Gram.
- Prueba de la catalasa.
- Fermentación de azúcares (13).
- Producción de gas (CO₂) a partir de glucosa.

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

Para determinar la actividad antagonista de las cepas aisladas se utilizó el método descrito por Reid con modificaciones (14). Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en caldo MRS a 30 °C durante 16 h, luego se inocularon 20 µl del cultivo en 500 µl de agar MRS y se sembraron 50 µl de la mezcla en pocillos practicados en placas con agar MRS. Se incubó durante 12-14 h a 30 °C y posteriormente se adicionó otra capa de 10 ml de agar cerebro-corazón (BHI, Biokar, Francia) conteniendo 50 µl de las cepas de *E. coli* O157:H7 y se dejó incubar durante 24 h a 35 °C. La actividad antagonista se detectó por la presencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos.

ENSAYOS ANTICROBIANOS DE LOS SOBRENANDANTES

Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en caldo MRS a 35 °C hasta alcanzar la fase logarítmica. Luego del período de incubación los medios se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. El ensayo antimicrobiano se realizó por el método de difusión en placa colocando 50 µl de sobrenadante en pocillos practicados en placas de agar BHI sembrados previamente con 50 µl de un cultivo de 12 hs de las cepas *E. coli* O157:H7 (15). Antes de la incubación a 35 °C durante 18-24 h, las placas se mantuvieron a 4-8 °C durante 2 h.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PH Y TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA

Los sobrenadantes crudos se trataron con NaOH 0,5 N hasta alcanzar la neutralidad. Los sobrenadantes neutralizados se sometieron posteriormente a una temperatura de 100 °C durante 5 min. En ambos casos la actividad residual se determinó por el procedimiento previamente descrito. La sensibilidad a enzimas se llevó a cabo, determinando la actividad residual luego de tratar los sobrenadantes con tripsina y catalasa (1mg/ml).

RESULTADOS

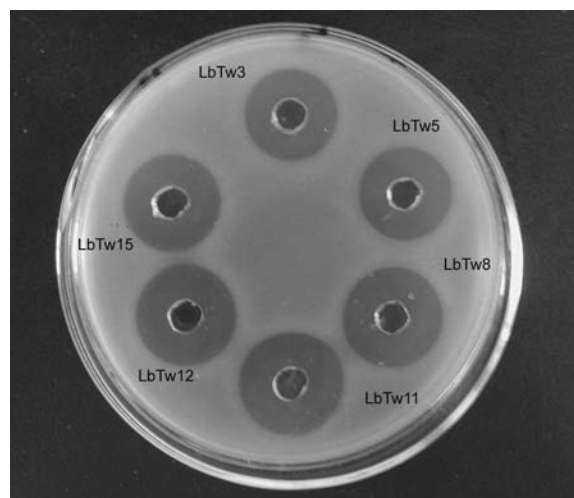
Se procesaron 47 muestras de queso ovino de las que se aislaron 22 cepas de *Lactobacillus*. Exceptuando 2 cepas, las restantes desarrollaron actividad antagonista contra las 3 cepas de *E. coli* O157:H7 estudiadas. Sobre la base de la más altas actividades determinadas, se seleccionaron las cepas *Lactobacillus* LbTw3, LbTw5, LbTw8,

LbTw11, LbTw12 y LbTw15 para realizar las pruebas complementarias. En la figura 1 se pueden observar los halos de inhibición de crecimiento de *E. coli* O157:H7 Tw4 debido a la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes crudos de las 6 cepas de *Lactobacillus* seleccionadas. Se incluye una sola figura debido a que las restantes cepas de *E. coli* O157:H7 exhibieron resultados similares. Este efecto se vio suprimido cuando los sobrenadantes se trataron con NaOH hasta alcanzar la neutralidad. Los mismos resultados se obtuvieron cuando los sobrenadantes neutralizados se sometieron al calentamiento de 100 °C durante 5 min.

El tratamiento con tripsina no modificó la actividad antagonista de los sobrenadantes crudos de las 6 cepas de *Lactobacillus*. El tratamiento enzimático llevado a cabo con catalasa tampoco alteró la inhibición ejercida por los sobrenadantes.

Fig. 1. Actividad inhibitoria de cepas de *Lactobacillus* sobre *E. coli* O157:H7 Tw4

Fig. 1. Inhibitory activity of *Lactobacillus* strains on *E. coli* O157:H7 Tw4



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio permiten aseverar que existe una alta frecuencia de cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos que exhiben actividad antibacteriana contra *E. coli* O157:H7. La presencia de altas poblaciones de *Lactobacillus* durante las etapas más avanzadas de la maduración de este tipo de quesos (8, 16), sugiere que ejercerían un control natural contra el desarrollo de este microorganismo.

En el caso de las 6 cepas seleccionadas se observó que la actividad inhibitoria se neutralizó cuando los sobrenadantes se alcalinizaron, lo que demuestra que esta propiedad es llevada a cabo por la producción de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico. Este metabolito no sólo exhibe capacidad para interferir en la esta-

bilidad de la membrana externa de las bacterias Gram negativas sino que permite que otras moléculas lipofílicas o de alto peso molecular, puedan evitar esta barrera biológica y ejercer su efecto bactericida o bacteriostático aún en bajas concentraciones (17, 18).

La actividad antagonista de los sobrenadantes no se vio afectada luego del tratamiento con tripsina resultado que demuestra la ausencia de péptidos o proteínas involucrados en el fenómeno. La actividad enzimática de la catalasa tampoco hizo variar la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes por lo que es posible afirmar que no existe una relación entre el fenómeno y la presencia de peróxido de hidrógeno como principio activo.

Los lactobacilos constituyen un género de BAL que se caracteriza por producir grandes concentraciones de ácido láctico, propiedad que es aprovechada para incluirlos en los fermentos utilizados en la fabricación de quesos. Las 6 cepas estudiadas se aislaron de la flora adjunta, la que se desarrolla durante las últimas etapas de la maduración. Estas cepas son heterofermentativas y producen cantidades variables de los isómeros D y L de ácido láctico (16). Se ha demostrado que la actividad del isómero L ejerce un mayor poder antimicrobiano sobre *E. coli* O157:H7 que el isómero D y que su modo de acción no se limita a disminuir el pH intracelular del patógeno, sino que actuaría interfiriendo su metabolismo en forma específica (19). En el caso de las cepas estudiadas los futuros ensayos deberían ser destinados a determinar las concentraciones relativas de ambos isómeros que se producen bajo distintas condiciones de crecimiento, especialmente las halladas en el período de maduración de quesos.

El uso de cultivos seleccionados en la elaboración de productos lácteos fermentados ha despertado gran interés en la industria alimentaria debido a que no sólo influyen en las características nutricionales del producto sino también en su calidad microbiológica (20). Este nuevo concepto denominado biopreservación (12), para diferenciarlo de la preservación química de alimentos, ha inducido a investigar características metabólicas de microorganismos que potencialmente se puedan utilizar en productos destinados al consumo humano o animal.

E. coli O157:H7 es un patógeno que exhibe una alta persistencia en el tracto GI de los ovinos (21) en consecuencia, es factible hallarlo en subproductos como el queso especialmente cuando estos se elaboran en forma artesanal en establecimientos con condiciones o infraestruc-

tura deficientes (5). Debería prestarse especial atención a este fenómeno debido que este microorganismo puede colonizar el tracto GI del huésped y expresar sus factores de virulencia aún en una baja población (22).

Se ha demostrado en este trabajo la alta actividad antagonista de las 6 cepas de *Lactobacillus* seleccionadas contra *E. coli* O157:H7. El método de aislamiento utilizado, también demuestra la alta tolerancia de estas BAL para desarrollarse a pH ácido, condición que se observa durante el proceso de maduración; ambas propiedades metabólicas resultan relevantes desde el punto de vista industrial. Las cepas estudiadas podrían ser utilizadas como fermentos o ser incluidas como bacterias adjuntas en la elaboración de quesos ovinos, con el propósito de ejercer un efecto bacteriostático, bactericida o inhibir la expresión de factores de virulencia (18, 20, 23), influyendo de esta manera en la calidad sanitaria del producto.

BIBLIOGRAFÍA

- Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Microbiol. Methods* 2008, doi:10.1016/j.mimet.2008.01.014.
- Guth BEC, Chinen I, Miliwebsky E, Cerqueira AMF, Chillemi G, Andrade JRC, Baschkiev A, Rivas M. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. *Vet. Microbiol.* 2003; 92:335-349.
- Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco AI, Etcheverria AI, Arroyo GH, Usera MA, Parma AE. Serotypes and virulence genes of bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* 2004; 100:3-9.
- Miliwebsky E, Deza N, Chinen I, Martínez Espinosa E, Gómez D, Pedroni E, Caprile L, Bashckier A, Manfredi E, Leotta G, Rivas M. Excreción prolongada de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños que concurren a jardines maternos de Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 2007; 39:90-92.
- Marguet ER, Ledesma P. Aislamiento de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en un tambo ovino. *Vet. Arg.* 1999; 16:170-174.
- Marguet ER. Tesis Doctoral. 2004. Actividad de proteinasas lácticas sobre caseínas ovinas. Universidad Nacional del Sur, Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia.
- Caro I, García-Armesto MR. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. *J. Food Microbiol.* 2007; 116:410-413
- Yvon M, Rijnen L. Cheese flavour formation by amino acid metabolism. *Int. Dairy J.* 2001; 11:185-201.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food pres-

- ervation. Int. J. Food Microbiol. 2001; 71:1-20.
10. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. Int. J. Food Microbiol. 2006; 106:1-24.
 11. Timmerman H, Koning CJM, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistain and multi-species probiotics. A comparison of functionality and efficacy. Int. J. Food Microbiol. 2004; 96:219-233.
 12. Stiles ME. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 1996; 70:331-345.
 13. Hammes WP, Vogel RF. The genus *Lactobacillus*. The genera of lactic acid bacteria, vol. 2. Wood, B.J.B. and W.H. Holzapfel (Eds.). Blackie Academic, London (UK), 1995; p19-54.
 14. Reid, G. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM™ as a possible probiotic for the urogenital tract. Inter. Dairy J. 2000; 10:415-419.
 15. Floriano B, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R. Purification and genetic characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64:4883-4890.
 16. Chamba JF, Irlinger F. Secondary and adjunct cultures. Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology, General Aspects, vol. 1. Fox, PF, McSweeney, PLH, Cogan, TM, Guinee, TP (Eds.), Elsevier Academic Press, London (UK), 2004; p. 191-206.
 17. Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66: 2001-2005.
 18. Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda T, Takeda Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. Inter. J. Food Microbiol. 2001; 68:135-140
 19. McWilliam Leitch EC, Stewart CS. *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates are more susceptible to l-lactate than to d-lactate. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68: 4676-4678.
 20. Sánchez Valenzuela A, Díaz Ruiz G, Omar NB, Abriouel H, Lucas López R, Martínez Cañamero M, Ortega E, Gálvez A. Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben saalga, both in a culture medium and in food. Food Control 2007; doi:10.1016/j.foodcont. 2007.08.009.
 21. Cornick NA, Booher SL, Casey TA, Moon HW. Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66: 4926-4934.
 22. Roldan ML, Chinen I, Otero JL, Miliwebsky ES, Alfaro N, Burns P, Rivas M. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Rev. Argent. Microbiol. 2007, 39(2):113-119.
 23. Medellín-Peña MJ, Wang H, Johnson R, Anand S, Griffiths MW. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 4259-4267.