

**EFFECTO INHIBITORIO DE SOBRENADANTES DE UN CULTIVO DE EXCLUSIÓN COMPETITIVA SOBRE EL CRECIMIENTO DE ALGUNOS PATÓGENOS INTESTINALES****INHIBITORY EFFECT OF SUPERNATANTS FROM A COMPETITIVE EXCLUSION CULTURE OVER GROWTH OF SOME INTESTINAL PATHOGENS**C. Aguilar-Rivera¹, M.E. Hume², B.F. Klotz-Ceberio^{3*}¹Universidad de La Sabana, Facultad de Ingeniería, Doctorado en Biociencias, Km. 7, Autopista Norte de Bogotá. Chía, Colombia.²US Department of Agriculture, ARS, SPARC, College Station, Tx, USA.³Instituto Alpina de Investigación, Alpina Corporativo S.A., Km 3 Vía Briceño-Sopó, Sopó, Cundinamarca, Colombia.

Recibido: 23 de agosto de 2015; Aceptado: 26 de marzo de 2016

Resumen

Los cultivos de exclusión competitiva (CEC), que utilizan comunidades bacterianas enteras derivadas directamente del tracto gastrointestinal, han sido efectivos para el control de patógenos en animales, pero su aplicación a nivel humano no ha sido ampliamente estudiada. En este trabajo se cuantificó el efecto inhibitorio de sobrenadantes de un CEC desarrollado a partir de muestras fecales de individuos sanos, sobre el crecimiento de patógenos intestinales de importancia en salud pública. El Modelo de Baranyi se ajustó ($R^2 > 0.947$) a las curvas de crecimiento de *Shigella sonnei*-(SF1), *E. coli* EPEC-(EC6) y *Salmonella* Enteritidis-(SE3) tratadas con sobrenadantes, para estimación de parámetros cinéticos. La tasa de crecimiento y la concentración de los patógenos, se redujeron significativamente ($p < 0.01$) por acción de los sobrenadantes en 89.89% y 86.80% respectivamente, para la bacteria más sensible (SF1) y en 23.21% y 36.86% para la más resistente (SE3). Un retraso de más de 14 horas en el crecimiento de SF1 y EC6 se presentó con los tratamientos. La sensibilidad térmica y enzimática (proteínasa K y tripsina) de los sobrenadantes, indicaron que el antagonismo estuvo mediado por sustancias tipo bacteriocinas. El CEC desarrollado tiene potencial biotecnológico para la producción de sustancias antimicrobianas de interés en industria alimentaria y farmacéutica.

Palabras clave: cultivo de exclusión competitiva, bacteriocinas, parámetros cinéticos, patógenos intestinales, efecto inhibitorio.

Abstract

Competitive exclusion cultures (CEC), which use whole bacterial communities derived directly from the gastrointestinal tract, have been effective to control of pathogens in animals, but its application in humans has not been widely studied. In this work, the inhibitory effect of supernatants obtained from a CEC developed from fecal samples of healthy individuals, was quantified over the growth of intestinal pathogens of public health significance. Baranyi Model was adjusted ($R^2 > 0.947$) to growth curves of *Shigella sonnei*-(SF1), *E. coli* EPEC-(EC6) y *Salmonella* Enteritidis-(SE3) treated with supernatants, in order to estimate kinetic parameters. Both, growth rate and pathogen concentrations were significantly reduced by the action of supernatants in 89.89% and 86.80%, respectively, for the most sensitive bacteria (SF1) and 23.21% and 36.86%, for the most resistant (SE3). A growth delay of more than 14 hours was presented by SF1 and EC6 with the treatments. Thermal and enzymatic (proteinase K and trypsin) sensitivity of supernatants indicate that antagonism was mediated by bacteriocin-like substances. The CEC developed, have biotechnological potential for the production of antimicrobial substances of interest in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: competitive exclusion culture, bacteriocins, kinetic parameters, intestinal pathogens, inhibitory effect.

* Autor para la correspondencia. E-mail: bernadette.klotz@alpina.com
Tel. (57-1) 423-86-00

1 Introducción

Los llamados *Terapéuticos del Ecosistema Microbiano* (MET, por sus siglas en inglés), utilizan comunidades bacterianas enteras derivadas directamente del tracto gastrointestinal, que pueden ser utilizados a nivel biotecnológico para la producción de probióticos, metabolitos con actividad biológica (postbióticos) y fármacos (Petrof y col., 2013). El potencial bioterapéutico de los MET se basa principalmente en la diversidad de beneficios atribuidos a la microbiota intestinal entre los que se encuentra su función protectora contra patógenos gastrointestinales (O'Hara y Shanahan, 2006; Chassard y col., 2014).

Dentro de los MET, los cultivos de exclusión competitiva (CEC), son evidencia del papel bioterapéutico de la microbiota intestinal (Kerr y col., 2013). Los CEC o cultivos microbianos de alimentación directa obtenidos a partir de heces de animales sanos, fueron descritos inicialmente por Nurmi y Rantala (1973) y desde entonces se ha estudiado su efectividad para controlar y tratar la colonización de bacterias enteropatógenas en el tracto gastrointestinal de pollos, cerdos y animales de granja (Schneitz, 2005; Callaway y col., 2008; Kerr y col., 2013).

Se han propuesto tres mecanismos asociados a la actividad antimicrobiana de los CEC. Uno de ellos es la obstrucción física de los sitios de unión de la bacteria patógena con el intestino, lo que evita la colonización del epitelio. El segundo, consiste en la competición por nutrientes esenciales, donde el CEC de manera conjunta impide que los patógenos se alimenten del sustrato que ingresa al tracto gastrointestinal, generando su muerte. Por último la flora de los CEC produce altas concentraciones de metabolitos antimicrobianos como ácidos orgánicos que reducen el pH del medio, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y sustancias tipo bacteriocinas que limitan el crecimiento de enterobacterias patógenas que son sensibles a estos compuestos (Mead, 2000; Schneitz, 2005; Callaway y col., 2008).

Debido a la robustez y estabilidad que posee este tipo de ecosistemas microbianos (Allen-Vercoe y col., 2012; Petrof y col., 2013), se ha reportado que bajo condiciones ambientales apropiadas, es posible replicar *in vitro* las características metabólicas y funcionales de la microbiota, cultivando las heces en un biorreactor (Petrof y col., 2013; Venema y Van den Abbeele, 2013; Feria-Gervasio y col., 2014). El estudio de la actividad inhibitoria de metabolitos

producto de las interacciones microbianas, así como de sobrenadantes obtenidos de los procesos fermentativos de la microbiota benéfica, representan una oportunidad no sólo para entender los mecanismos de acción de consorcios como los CEC, sino también para plantear estrategias farmacológicas eficaces y alternativas a los tratamientos con probióticos (Cicenia y col., 2014), lo que puede generar a futuro el desarrollo de nuevos productos tipo postbióticos de interés para la industria alimentaria y farmacéutica (Foligne y col., 2013; Gosálbez y Ramón, 2015).

La efectividad de probióticos, bioterapéuticos y sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de bacterias con potencial probiótico es dosis y cepa dependiente (Wolvers y col., 2010; Hartmann y col., 2011), por lo que se hacen necesarios más estudios que permitan un mayor entendimiento de su papel frente a enfermedades infecciosas gastrointestinales. Son pocos los trabajos en los que se evalúa la actividad antimicrobiana de CEC frente a patógenos de enfermedades humanas (Donskey y col., 2001; Pultz y col., 2004), ya que la gran mayoría de los estudios encontrados están encaminados a comprobar el efecto de los CEC frente a patógenos en animales (Schneitz, 2005; Kerr y col., 2013).

Teniendo en cuenta este marco de referencia y con el fin de desarrollar a futuro un bioterapéutico contra patógenos intestinales, se propuso en este estudio cuantificar el efecto inhibitorio de sobrenadantes provenientes de un CEC desarrollado a partir de muestras fecales de individuos sanos, sobre el crecimiento de cepas patógenas de *Shigella sonnei*, *E. coli* EPEC y *Salmonella enterica serovar* Enteritidis, asociadas a infecciones intestinales y de importancia en salud pública.

2 Materiales y métodos

2.1 Desarrollo y seguimiento del cultivo de exclusión competitiva (CEC)

El CEC se desarrolló a partir de muestras fecales de niños menores de cinco años sanos ($n = 7$), sin historial de enfermedad diarreica ni consumo de antibióticos en los últimos dos meses, siguiendo la metodología reportada por Donskey y col. (2001). Un pool de 10 gramos de heces enriquecido con 100 mL del caldo Viande Levure modificado (VLM) (Nisbet y col., 2000) se transfirió a un biorreactor de sistema

continuo (BioFlo 0-30, New Brunswick Scientific Co., Edison, USA) que contenía 900 mL de caldo VLM, para un volumen total de 1 Litro. El cultivo instalado en el biorreactor se mantuvo a 37 °C, en agitación constante (200 rpm) y con suministro de CO₂ durante todo el ensayo. Por medio de flujo de alimentación continua, al CEC se le administró caldo VLM a una velocidad de flujo de 0.69 mL/min con adición de NaOH 0.1N estéril para mantener un rango de pH entre 6.0 y 6.5.

Aproximadamente a los 8 días de su instalación, el cultivo alcanzó la fase estacionaria y presentó altas concentraciones bacterianas que se mantuvieron estables por más de un año en el biorreactor. Siguiendo la metodología de recuento en placa reportada por Donskey y col. (2001), se encontró que la concentración total de mesófilos anaerobios fue en promedio de 10.81 ± 0.92 Log UFC mL⁻¹ y la de aerobios facultativos fue de 9.17 ± 0.92 Log UFC mL⁻¹, con lo que se comprobó la viabilidad del CEC.

La estabilidad en la densidad bacteriana también fue demostrada mediante PCR en tiempo real bajo la metodología reportada por Solano-Aguilar y col (2013), encontrándose que la abundancia total de bacterias presentes en el biorreactor permaneció estable a lo largo de un año de seguimiento con una concentración de $9.31E+10 \pm 0.17$ copias g⁻¹. Adicionalmente, debido a su reconocido historial de producción de metabolitos antimicrobianos (Boesten y de Vos, 2008; Kos y col., 2011; Hatzioanou y col., 2013), los géneros *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., también fueron cuantificados bajo esta misma metodología, presentando concentraciones de $1.80 \times 10^8 \pm 0.24$ copias g⁻¹ y de $2.13 \times 10^9 \pm 0.33$ copias g⁻¹, respectivamente en el CEC.

2.2 Obtención de sobrenadantes a partir del CEC

Luego de la estabilización bacteriana del CEC en el biorreactor (como se indicó en el punto anterior), muestras del CEC se centrifugaron a 8000 gravedades durante 20 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se separaron del pellet y se filtraron a través de membranas de 0.22 μm (Millipore, Billerica, USA). Finalmente se conservaron a -20 °C en alícuotas de 1.0 mL hasta su uso.

2.3 Cuantificación de proteínas en los sobrenadantes

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el kit PierceTM BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA) con lecturas de absorbancia a 562 nm y se siguieron las instrucciones del fabricante. Una curva estándar (coeficiente de correlación =0.99), realizada a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (incluida en el kit), sirvió para calcular los valores de proteína presente en las muestras. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Con las muestras analizadas se realizó un pool de sobrenadantes que presentó una concentración promedio de 1875 ± 96 μg mL⁻¹ de proteína; a partir de este pool se realizaron los ensayos de inhibición.

2.4 Evaluación de la actividad antibacteriana de los sobrenadantes

2.4.1. Cepas patógenas retadas

Para los ensayos se utilizaron cepas de *Shigella sonnei* (SF1), *E. coli* EPEC (EC6) y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE3), asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos que se aislaron de muestras fecales de niños con diarrea aguda y que presentaron resistencia a antibióticos como la tetraciclina, el ácido nalidíxico y la ampicilina. Las cepas fueron identificadas bioquímicamente mediante API 20E (bioMérieux, Durham, USA) y por secuenciación del gen 16s rRNA con nivel de confianza ≥ 99.0 %, mediante tecnología 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems®).

Las tres cepas (SF1, EC6 y SE3) se conservaron a -70 °C hasta su uso en viales de crio-conservación con perlas CryoBankTM (Copan Diagnostics Inc., Corona, USA) según instrucciones del fabricante. Para su activación se sembraron en caldo Selenito (Difco Laboratories, Detroit, USA) a 37 °C en aerobiosis.

2.4.2. Ensayos de inhibición

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos del CEC, se analizó el comportamiento de las tres bacterias (SF1, EC6 y SE3), en función de su densidad óptica a través del tiempo y bajo diferentes condiciones de tratamiento (Tabla 1). Para esto se utilizó un Bioscreen FP-1100-C (GrowthCurves USA®), ajustado a lecturas de absorbancia (420-580 nm) cada 30 minutos, durante 48 horas a 37 °C.

Tabla 1. Diseño experimental para los ensayos de inhibición con los sobrenadantes del CEC.

Microorganismos patógenos retados	<i>Shigella sonnei</i> SF1
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis SE3
	<i>E. coli</i> EPEC EC6
Inóculos bacterianos evaluados	6.0 Log UFC mL ⁻¹
	4.0 Log UFC mL ⁻¹
	2.0 Log UFC mL ⁻¹
Tratamientos aplicados	T1: Sobrenadante tratado a 121°C por 15 minutos
	T2: Sobrenadante tratado con proteinasa K (0.1mg mL ⁻¹)
	T3: Sobrenadante tratado con tripsina (0.1mg mL ⁻¹)
	T4: Sobrenadante al 100 % (concentración promedio de proteína 1875±96 µg mL ⁻¹)
	T5: Sobrenadante diluido ^a al 75 % (concentración promedio de proteína 1406±65 µg mL ⁻¹)
	T6: Sobrenadante diluido al 50 % (concentración promedio de Proteína 935±45 µg mL ⁻¹) y tratado con proceso de autoclavado.
Medio de cultivo en el que se realizaron los ensayos reto	Caldo Mueller Hinton (Scharlau Chemie SA., Barcelona, España)
Controles positivos	<i>Shigella sonnei</i> SF1 sin ningún tratamiento
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis SE3 sin ningún tratamiento
	<i>E. coli</i> EPEC EC6 sin ningún tratamiento
Controles negativos	Sobrenadantes sin inóculos bacterianos
	Medio de cultivo del CEC, caldo Viande Levure modificado (Nisbet y col., 2000)
	Caldo Mueller Hinton sin sobrenadantes y sin inóculos
Tiempo de observación	48 horas
Tiempo de muestreo	Cada 30 minutos
Réplicas	3
Método de evaluación	OD 420-580 nm mediante Bioscreen FP-1100-C (GrowthCurves USA®)

^a La dilución de los sobrenadantes se realizó en condiciones asépticas utilizando phosphate buffered saline (PBS, Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

Antes del ensayo, a los sobrenadantes se les ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1N estéril para eliminar el efecto inhibitorio asociado a los ácidos orgánicos y se les adicionó catalasa (Sigma Aldrich, Milwaukee, USA) a una concentración final de 0.1 mg mL⁻¹, para eliminar el peróxido de hidrógeno de acuerdo con lo reportado por Ramírez-Romero y col. (2013). Adicionalmente, la sensibilidad de los compuestos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes se evaluó mediante (1) proceso térmico a 121 °C durante 15 minutos (Sterilizer JSAC-100, JS Research Inc.(R) Korea), (2) adición de Proteinasa K (Sigma-Aldrich,Steinheim, Alemania) y (3) Tripsina (Sigma-Aldrich,Steinheim,

Alemania) a concentraciones finales de 0.1 mg mL⁻¹, según el protocolo de Todorov y col. (2013). En la Tabla 1 se presenta un resumen del diseño experimental del ensayo.

2.4.3. Estimación de parámetros cinéticos para las cepas patógenas retadas con los sobrenadantes

Con los datos de absorbancia obtenidos en los ensayos de inhibición, se generaron curvas de crecimiento que presentaron comportamiento sigmoidal. A los datos experimentales normalizados se les ajustó el modelo de crecimiento primario de Baranyi

(Baranyi y Roberts, 1994) definido por la Ec. (1). El ajuste se realizó mediante el método de mínimos cuadrados, utilizando el software DMfit (<http://modelling.combase.cc/DMFit.aspx>) como lo reportaron Rodríguez-Bernal y col. (2014). Los parámetros cinéticos estimados fueron: (1) concentración celular inicial, (2) máxima concentración celular alcanzada (γ_{\max}), (3) tiempo de duración de la fase Lag y (4) tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}). Para evaluar la bondad de ajuste de los modelos predictivos se tuvieron en cuenta los siguientes criterios: error estándar (SE), coeficiente de determinación (R^2) y análisis de los estimados de los parámetros cinéticos (Baranyi y col., 1999).

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m\mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(\gamma_{\max} - \gamma_0)}} \right) \quad (1)$$

donde: $y_0 = \ln x(t_0)$: logaritmo natural de la concentración celular en el $t = t_0$.

$\gamma_{\max} = \ln x_{\max}$: logaritmo natural de la máxima concentración celular.

$A(t)$: función para el retraso gradual en el tiempo (Fase Lag).

μ_{\max} : tasa máxima de crecimiento.

Finalmente, los parámetros cinéticos estimados a partir de los modelos matemáticos generados, se analizaron mediante ANOVA de un factor con prueba de Fisher (nivel de significancia del 5 %), para encontrar diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, a través del programa SPSS (versión 13.0, SSPS Inc, Chicago, USA).

3 Resultados y discusión

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición con los sobrenadantes del CEC, se generaron en total 63 curvas de crecimiento para cada una de las cepas estudiadas (SF1, EC6 y SE3). Cada curva incluyó un total de 25 puntos de muestreo a lo largo de las 48 horas de seguimiento que duró el ensayo. El modelo de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994) se ajustó adecuadamente a los datos experimentales para la estimación de parámetros cinéticos y presentó en todos los casos una bondad de ajuste con un R^2 mínimo de 0.947 y un SE máximo de 0.089.

El análisis de los parámetros cinéticos estimados con el modelo, mostró que los tratamientos T1, T2 y T3, (sobrenadantes sometidos a proceso térmico, tratados con proteinasa K y tripsina, respectivamente), fueron inefectivos para inhibir el

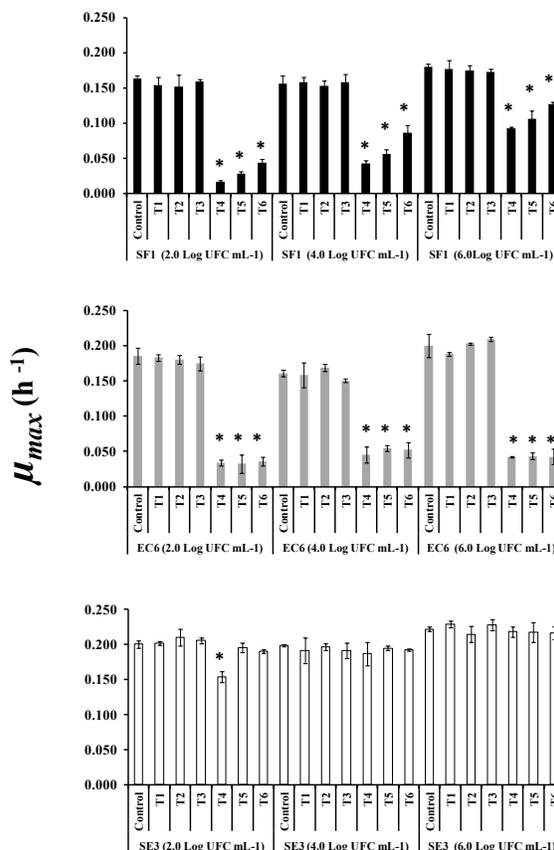


Fig. 1. Tasa máxima de crecimiento estimada por el modelo Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994) para los ensayos de inhibición realizados con sobrenadantes del CEC. En negro: *Shigella sonnei* SF1; En gris: *E. coli* EPEC EC6; En blanco: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis SE3. Los (*) representan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los tratamientos y el control.

crecimiento de las cepas patógenas retadas, ya que no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos y controles (cultivos individuales de los patógenos). Esto se observó independientemente de la concentración inicial bacteriana con la que se estandarizaron los ensayos (Figs. 1-3). Por el contrario, los sobrenadantes sin proceso térmico, ni tratamiento enzimático T4, T5 y T6 (no diluidos y diluidos al 75 % y al 50 %, respectivamente), sí mostraron actividad antimicrobiana importante frente a las cepas patógenas retadas. Adicionalmente se observó que la concentración de los inóculos iniciales, así como la concentración de los sobrenadantes evaluados, afectaron la respuesta de las bacterias a los tratamientos, al igual que lo describieron Cheng

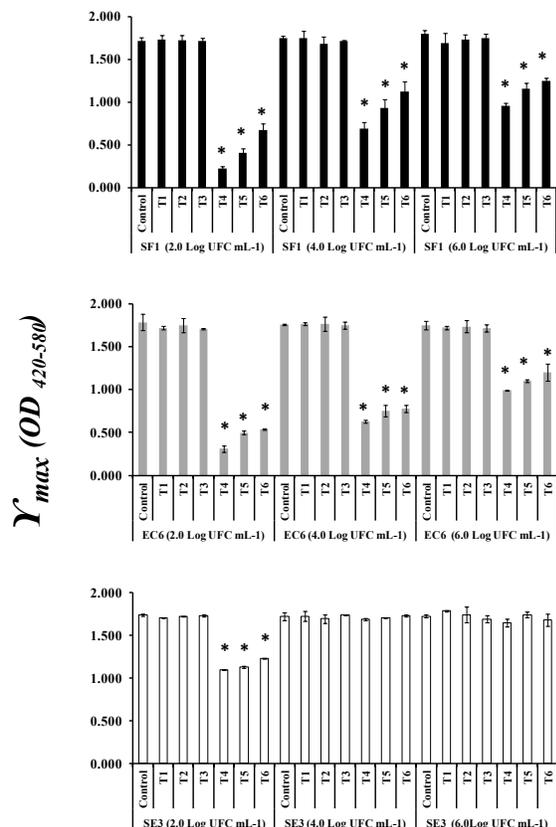


Fig. 2. Máxima concentración celular estimada por el modelo Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994) para los ensayos de inhibición realizados con sobrenadantes del CEC. En negro: *Shigella sonnei* SF1; En gris: *E. coli* EPEC EC6; En blanco: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis SE3. Los (*) representan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los tratamientos y el control.

y Hoover (2003). En este caso, el sobrenadante más concentrado (T4) y la menor concentración bacteriana inicial (2.0 Log UFC mL⁻¹), fueron las condiciones bajo las cuales se presentó un mayor nivel de inhibición.

Se encontró que los tratamientos con T4, T5 y T6 redujeron significativamente ($p < 0.01$) la μ_{max} y γ_{max} de SF1, y aumentaron significativamente ($p < 0.01$) su fase Lag. Con el tratamiento más efectivo (T4), y a concentraciones iniciales de 2.0 Log UFC mL⁻¹, la μ_{max} (0.163±0.004 h⁻¹) de la bacteria se redujo en un 89.89 %, y su γ_{max} (1.711±0.044 (OD₄₂₀₋₅₈₀)) se redujo en un 86.80 %. El análisis de la fase Lag, mostró que SF1 tardó en promedio 8.8±0.2 horas en empezar a crecer, pero cuando se cultivó con T4, este tiempo aumentó en 55.24 %, retardando el crecimiento

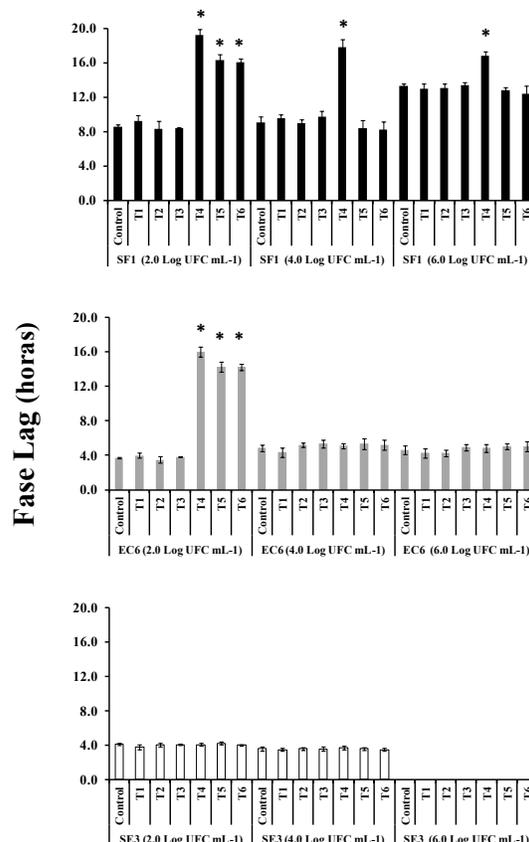


Fig. 3. Fase Lag estimada por el modelo Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994) para los ensayos de inhibición realizados con sobrenadantes del CEC. En negro: *Shigella sonnei* SF1; En gris: *E. coli* EPEC EC6; En blanco: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis SE3. Los (*) representan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los tratamientos y el control.

del patógeno en más de 16 horas. Mientras que a la mayor concentración celular evaluada (6.0 Log UFC mL⁻¹) y con el sobrenadante más diluido (T6), la μ_{max} (0.180±0.005 h⁻¹) de SF1 se redujo en un 29.55 %, su γ_{max} (1.797±0.041 (OD₄₂₀₋₅₈₀)) se redujo en un 30.66 % y su fase Lag (13.3±0.3) aumentó solo en un 21.02 % (Figs. 1-3, Tabla 2).

Para EC6 (2.0 Log UFC mL⁻¹) se encontró que con el sobrenadante más concentrado (T4), la μ_{max} (0.185±0.011 h⁻¹) y la γ_{max} (1.782±0.095 (OD₄₂₀₋₅₈₀)) de la bacteria se redujeron significativamente ($p < 0.01$) en 81.85 % y 82.67 %, respectivamente. Y su fase Lag (4.4±0.6 horas) aumentó significativamente ($p < 0.01$) en un 76.71 %, retardando el crecimiento de la cepa en promedio (Fig. 3, Tabla 2).

Tabla 2. Cambios expresados en porcentaje, para los parámetros cinéticos estimados por el modelo Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994) en los ensayos de inhibición realizados con sobrenadantes del CEC.

	T4			T5			T6			
	Log UFC/mL	μ_{max} (%)	γ_{max} (%)	Fase Lag (%)	μ_{max} (%)	γ_{max} (%)	Fase Lag (%)	μ_{max} (%)	γ_{max} (%)	Fase Lag (%)
SF1	2.0	↓89.89	↓86.80	↑55.24	↓82.84	↓76.19	↑47.18	↓73.06	↓60.64	↑46.52
	4.0	↓73.05	↓60.50	↑48.90	↓64.32	↓46.83	N.C.	↓44.68	↓36.11	N.C.
	6.0	↓48.75	↓46.68	↑21.02	↓41.15	↓35.52	N.C.	↓29.55	↓30.66	N.C.
EC6	2.0	↓81.85	↓82.67	↑76.71	↓82.53	↓72.16	↑73.83	↓80.56	↓69.97	↑73.82
	4.0	↓71.77	↓64.26	N.C.	↓66.29	↓57.17	N.C.	↓78.73	↓55.91	N.C.
	6.0	↓78.90	↓43.36	N.C.	↓78.27	↓36.94	N.C.	↓67.62	↓31.21	N.C.
SE3	2.0	↓23.21	↓36.86	N.C.	N.C.	↓34.94	N.C.	N.C.	↓29.06	N.C.
	4.0	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	↓N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	6.0	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.

En la tabla se presenta el incremento (↑) o la reducción (↓) en porcentaje, de los parámetros cinéticos estimados por el modelo cuando las cepas SF1, EC6 y SE3 se retaron con sobrenadantes del CEC (T4, T5 y T6). μ_{max} : Tasa máxima de crecimiento; γ_{max} : Máxima concentración alcanzada; N.C.: No cambios significativos ($p > 0.05$) en los parámetros cinéticos estimados cuando las cepas se retaron con los sobrenadantes.

En contraste, con el sobrenadante más diluido (T6) y con inóculos iniciales de 6.0 Log UFC mL⁻¹, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el control y los tratamientos para la fase Lag (Fig. 3). Bajo estas mismas condiciones de tratamiento, la μ_{max} y la γ_{max} de EC6 se redujeron significativamente ($p < 0.01$) en un 67.62 % y en un 31.21 %, respectivamente (Tabla 2).

Para SE3, solo cuando las concentraciones iniciales del patógeno fueron de 2.0 Log UFC mL⁻¹, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los controles y los tratamientos en la μ_{max} y la γ_{max} estimadas. El sobrenadante más concentrado (T4) redujo la μ_{max} (0.200 ± 0.011 h⁻¹) y la γ_{max} (1.735 ± 0.011 (OD₄₂₀₋₅₈₀)) en un 23.21 % y 36.86 %, respectivamente (Figs. 1-2, Tabla 2). Pero la fase Lag de la bacteria no presentó cambios significativos ($p > 0.05$) con ninguno de los tratamientos (Fig. 3, Tabla 2). Adicionalmente, el sobrenadante más diluido (T6) no tuvo un efecto significativo ($p > 0.05$) en el comportamiento de EC6, siendo esta bacteria la más resistente a los tratamientos y SF1 la más sensible.

Aunque se han publicado diversos trabajos en donde se cuantifica la actividad inhibitoria de sobrenadantes obtenidos del cultivo de bacterias con potencial probiótico frente a patógenos intestinales (Martín y col., 2009; Yan y col., 2010; Aguilar y Klotz, 2010), en el estado del arte no se encontraron estudios donde se utilicen modelos matemáticos para estimar parámetros cinéticos asociados al crecimiento de patógenos en co-cultivo con CEC o con sus

sobrenadantes. Comparado con lo reportado por dichos autores, en este estudio se obtuvieron mayores porcentajes de reducción en el crecimiento de patógenos (superiores al 35.0 %), cuando se evaluaron concentraciones iniciales similares de las bacterias reto. Estas diferencias pueden deberse a las características morfofisiológicas de las cepas retadas, pero principalmente a la composición de los sobrenadantes utilizados, ya que se ha reportado que probióticos multicepa y consorcios microbianos, pueden ejercer mecanismos de acción más diversos que redundan en una mayor eficacia en cuanto su actividad antimicrobiana (Timmerman y col., 2004; Chapman y col., 2011; Foligne y col., 2013; Petrof y col., 2013; Henao-Ardila y col., 2015), por lo que los sobrenadantes del CEC podrían ser promisorios para el control de estos patógenos en el campo clínico e industrial.

Por otro lado, la pérdida de la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes tratados mediante proceso térmico y con enzimas proteolíticas, indican que los metabolitos implicados en el proceso de inhibición con los sobrenadantes son de naturaleza proteica y podrían ser bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos de síntesis ribosomal, producidos principalmente por bacterias ácido lácticas, que se caracterizan por tener un espectro de inhibición específico y no generar una respuesta frecuente de resistencia microbiana (Garneau y col., 2002; Sanz y col., 2006). Aunque su mecanismo de acción está ligado a su peso molecular y a su estructura química (Cotter y col., 2005; Monroy

y col., 2009), la mayoría de las bacteriocinas ejercen una acción inhibitoria que involucra la formación de agregados proteicos en las estructuras externas (pared, membrana) de las bacterias blanco, lo que resulta en la formación de poros. Esta poración genera la salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos, con lo que también se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía, dando como resultado la muerte celular (Zacharof y Lovitt, 2012). Se ha propuesto que las bacteriocinas activas contra bacterias Gram negativas tienen adicional a los mecanismos de acción expuestos anteriormente, un sistema de transporte especializado que les permite alcanzar los receptores de membrana de las células blanco, atravesando la capa externa de este tipo de bacterias (Balciunas y col., 2013). Por otro lado, algunos trabajos han demostrado que la mayoría de las bacteriocinas se inactivan a 121°C por 15 minutos (Todorov y col., 2013) y pierden su actividad biológica cuando se tratan con enzimas como proteínasa K y tripsina (Ramírez-Romero y col., 2013; Todorov y col., 2013; Woraprayote y col., 2015), así como se encontró en este estudio.

Bacterias como *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., que hacen parte de la microbiota intestinal sana (Hill y Artis, 2010; Claesson y col., 2011) y que fueron detectadas en el CEC desarrollado, han sido reportadas como productoras de bacteriocinas con actividad antimicrobiana frente a enterobacterias (Boesten y de Vos, 2008; Kos y col., 2011; Hatzioanou y col., 2013) y contra diferentes patógenos Gram negativos (Messouadi y col., 2013; O'Connor y col., 2015). Así mismo, se ha encontrado que las bacteriocinas Bifidin, Bifidin I, Bifilong, Bifilact Bb-46 y Bifilact Bb-12, producidas por diferentes especies de *Bifidobacterium* spp., poseen actividad antagonica frente a *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*, bacterias que también fueron inhibidas en este trabajo (Martinez y col., 2013). Lo anterior sugiere que las sustancias antimicrobianas presentes en los sobrenadantes evaluados, son producto de la actividad metabólica de bacterias benéficas presentes en el CEC, dentro de las que se encuentran *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., ya que en ningún caso, el medio de cultivo utilizado para la realización de los ensayos, ni el medio de cultivo en el que se desarrolló el CEC (controles negativos), presentaron actividad inhibitoria frente a los tres patógenos estudiados, confirmando que dichas sustancias no son inherentes a estos medios de cultivo sino que provienen del consorcio microbiano.

Conclusiones

Se comprobó que los sobrenadantes libres de células obtenidos de un cultivo de exclusión competitiva desarrollado a partir de muestras fecales de individuos sanos, tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de patógenos asociados a infecciones gastrointestinales (*Shigella sonnei*, *E. coli* EPEC y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis). El análisis de los parámetros cinéticos mostró que tanto la tasa de crecimiento como la máxima concentración alcanzada por los patógenos se redujeron significativamente por acción de los sobrenadantes. Un retraso en el crecimiento de los patógenos también se observó por el incremento de su fase Lag en los cultivos tratados. Se encontró también que la inhibición fue dosis y cepa dependiente, siendo los sobrenadantes con mayor concentración de proteínas los más efectivos y *Shigella sonnei* la bacteria más sensible. Adicionalmente, la sensibilidad térmica y enzimática de los sobrenadantes evaluados indicaron que el antagonismo estuvo mediado por sustancias tipo bacteriocinas. Los resultados encontrados son promisorios para el desarrollo a futuro de postbióticos para el control de patógenos de importancia en salud pública, donde comunidades bacterianas enteras derivadas directamente del tracto gastrointestinal, pueden ser utilizados a nivel biotecnológico para la producción de sustancias de interés en la industria alimentaria y farmacéutica. La cuantificación del efecto inhibitorio realizada en este trabajo, constituye un aporte importante para establecer las mejores condiciones de utilización de este tipo de productos. Se requieren más estudios de caracterización de los sobrenadantes, para garantizar su efectividad y seguridad durante su producción y aplicación.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de La Sabana y al US Department of Agriculture, ARS, SPARC, Food and Feed Safety Research Unit, por la financiación de este estudio.

Referencias

- Aguilar, C. y Klotz, B. (2010). Effect of the temperature on the antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Safety* 30, 996-1015.

- Allen-Vercoe, E., Reid, G., Viner, N., Gloor, G. B., Hota, S., Kim, P., Lee, C., O'Doherty, K. C., Vanner, S. J., Weese, J. S. y Petrof, E. O. (2012). A Canadian Working Group report on fecal microbial therapy: microbial ecosystems therapeutics. *Canadian Journal of Gastroenterology* 26, 457-462.
- Balciunas, E. M., Martinez, F. A. C., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., Converti, A. y de Souza Oliveira, R. P. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control* 32, 134-142.
- Baranyi, J. y Roberts, T.A. (1994). Review paper: A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Baranyi, J., Pin, C. y Roos, T. (1999). Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology* 48, 159-166.
- Boesten, R. J. y de Vos, W. M. (2008). Interactomics in the human intestine: Lactobacilli and Bifidobacteria make a difference. *Journal of Clinical Gastroenterology* 42, 163-167.
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Harvey, R. B., Genovese, K. J., Kennedy, C. N., Venn, D. W. y Nisbet, D. J. (2008). Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Animal Health Research Reviews* 9, 217-225.
- Chapman, C. M., Gibson, G. R. y Rowland, I. (2011). Health benefits of probiotics: Are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition* 50, 1-17.
- Chassard, C., De Wouters, T. y Lacroix, C. (2014). Probiotics tailored to the infant: a window of opportunity. *Current Opinion in Biotechnology* 26, 141-147.
- Cheng, H. y Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 82-100.
- Cicenia, A., Scirocco, A., Carabotti, M., Pallotta, L., Marignani, M., y Severi, C. (2014). Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. *Journal of Clinical Gastroenterology* 48, 18-22.
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G. Stanton, C., van Sinderen, D., O'Connor, D., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., Twomey, C., Hill, C., Ross, R. P. y O'Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4586-4591.
- Cotter, P. D., Hill, C. y Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3, 777-788.
- Donskey, C.J., Hume, M.E., Callaway, T.R., Das, S.M., Hoyen, C.K. y Roce, L.B. (2001). Inhibition of vancomycin-resistant Enterococci by an *in vitro* continuous-flow competitive exclusion culture containing human stool flore. *Journal of Infectious Diseases* 184, 1624-1627.
- Feria-Gervasio, D., Tottey, W., Gaci, N., Alric, M., Cardot, J. M., Peyret, P., Martin, J. F., Pujos, E., Sébédio, J. L. y Brugère, J. F. (2014). Three-stage continuous culture system with a self-generated anaerobia to study the regionalized metabolism of the human gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods* 96, 111-118.
- Foligne, B., Daniel, C. y Pot, B. (2013). Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology* 16, 284-292.
- Garneau, S., Martin, N. I. y Vederas, J. C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577-592.
- Gosálbez, L. y Ramón, D. (2015). Probiotics in transition: novel strategies. *Trends in Biotechnology* 33, 195-196.
- Hartmann, H. A., Wilke, T. y Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology* 146, 192-199.
- Hatzioanou, D., Mayer, M. J., Duncan, S. H., Flint, H. J. y Nrabad, A. (2013). A representative of the dominant human colonic

- firmicutes, *Roseburia faecis* M72/1, forms a novel bacteriocin-like substance. *Anaerobe* 23, 5-8.
- Henao-Ardila, A., Quintanilla-Carvajal, M. X., Klotz-Ceberio, B. F. y Serna-Jiménez, J. A. (2015). Evaluación de la inhibición de *Candida intermedia* por efecto de sobrenadantes de bioprotectores y su efecto sinérgico. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 373-381.
- Hill, D. A. y Artis, D. (2010). Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annual Review of Immunology* 28, 623-67.
- Kerr, A. K., Farrar, A. M., Waddell, L. A., Wilkins, W., Wilhelm, B. J., Bucher, O., Wills, R. W., Bailey, R. H., Varga, C., McEwen, S. A. y Rajić, A. (2013). A systematic review-meta-analysis and meta-regression on the effect of selected competitive exclusion products on *Salmonella* spp. prevalence and concentration in broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine* 111, 112-125.
- Kos, B., Beganović, J., Jurašić, L., Švadumović, M., Leboš Pavunc, A., Uroić, K. y Šušković, J. (2011). Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. *MLjekarstvo* 61, 273-282.
- Martín, R., Delgado, S., Maldonado, A., Jiménez, E., Olivares, M., Fernández, L., Sobrino, O.J. y Rodríguez, J.M. (2009). Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential. *Journal of Dairy Research* 76, 418-425.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D. y de Souza Oliveira, R. P. (2013). Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances* 31, 482-488.
- Mead, G. C. (2000). Prospects for ?competitive exclusion? treatment to control *Salmonellas* and other foodborne pathogens in poultry. *The Veterinary Journal* 159, 111-123.
- Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J. M. y Dousset, X. (2013). *Lactobacillus salivarius*: bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology* 36, 296-304.
- Monroy, M .C., Castro, T., Fernández, F.J. y Mayorga, L. (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por Bacterias probióticas. *Contactos* 73, 63-72.
- Nisbet, D. J. (2000). Modeling the survivability of *Salmonella typhimurium* in the chicken cecae using an anaerobic continuous-culture of chicken cecal bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease* 12, 42-47.
- Nurmi, E. y Rantala, M. (1973). New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* 241, 210-211.
- O?Connor, P. M., Ross, R. P., Hill, C. y Cotter, P. D. (2015). Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science* 2, 51-57.
- O?Hara, A.M. y Shanahan, F. (2006). Review: The gut flora as a forgotten organ. *European Molecular Biology Organization Reports* 7, 688-693.
- Petrof, E. O., Claud, E. C., Gloor, G. B. y Allen-Vercoe, E. (2013). Microbial ecosystems therapeutics: a new paradigm in medicine? *Beneficial Microbes* 4, 53-65.
- Pultz, N. J., Hoyen, C. K. y Donskey, C. J. (2004). Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by an *in vitro* continuous-flow culture containing human stool microflora. *FEMS Microbiology Letters* 241, 201-205.
- Ramírez-Romero, G., Reyes-Velazquez, M. y Cruz-Guerrero, A. (2013). Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12, 463-471.
- Rodríguez-Bernal, J. M., Serna-Jiménez, J. A., Uribe-Bohórquez, M. A., Klotz, B. y Quintanilla-Carvajal, M. X. (2014). Aplicación de la metodología de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la concentración de azúcar y de cultivos iniciadores comerciales sobre la cinética de fermentación del yogurt. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 213-225.
- Sanz, Y., Collado, M. y Dalmau, J. (2006). Contribución de la microbiota intestinal y

- del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. *Acta Pediátrica Española* 64, 74-78.
- Schneitz, C. (2005). Competitive exclusion in poultry: 30 years of research. *Food Control* 16, 657-667.
- Solano-Aguilar, G., Fernandez, K. P., Ets, H., Molokin, A., Vinyard, B., Urban, J. F. y Gutierrez, M. F. (2013). Characterization of Fecal Microbiota of Children With Diarrhea in 2 Locations in Colombia. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 56, 503-511.
- Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M. y Beynen, A.C. (2004). Monostrain, multistain and multispecies probiotics: A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* 96, 219-233.
- Todorov, S. D., Vaz-Velho, M., de Melo Franco, B. D. G. y Holzapfel, W. H. (2013). Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicão, a fermented meat product from North-West of Portugal. *Food Control* 30, 111-121.
- Venema, K. y Van den Abbeele, P. (2013). Experimental models of the gut microbiome. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 27, 115-126.
- Wolwers, D., Antoine, J.M., Myllyluona, E., Schrezenmeir, J., Szajewska, H. y Rijkers, G.T. (2010). Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Prevention and Management of Infections by Probiotics. *The Journal of Nutrition* 140, 698-712.
- Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Roytrakul, S., Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K., Benjakul, S. y Visessanguan, W. (2015). Two putatively novel bacteriocins active against Gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. *Food Control* 55, 176-184.
- Yan, B., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y. y ZhangYan, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control* 21, 695-701.
- Zacharof, M. P. y Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia* 2, 50-56.