

Efecto inhibidor del sobrenadante libre de células de *Lactobacillus casei* IMAU60214 en el crecimiento y la formación de biopelículas de *Escherichia coli* diarreagénica

Rocha Ramírez Luz María^{1*}, Hernández Chiñas Ulises^{1,2}, Moreno Guerrero Silvia Selene³, Ramírez Pacheco Arturo³, Castañón-Alonso Sandra Luz⁴, Eslava Campos Carlos^{1,2}


¹Hospital Infantil de México Federico Gómez, secretaría de Salud. Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Dr. Márquez No. 162. Cuauhtémoc Ciudad México. C.P.06720 México.

²Unidad Periférica de Investigación Básica y Clínica de en Enfermedades Infecciosas, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana Departamento de Salud Pública/División de Investigación Facultad de Medicina UNAM. Dr. Márquez No. 162, Cuauhtémoc, Ciudad de México, C.P. 06720. México.

³Hospital Infantil de México Federico Gómez Secretaría de Salud, Departamento de Hemato-Oncología. Dr. Márquez No. 162, Cuauhtémoc, Ciudad México. C.P. 06720. México.

⁴Hospital Infantil de México Federico Gómez Secretaría de Salud, Departamento de Inmunoquímica. Dr. Márquez No. 162, Cuauhtémoc, Ciudad México. C.P. 06720. México.

*Autor para correspondencia: luzmrr7@yahoo.com.mx

ORCID : 0000-0002-7204-1421

Recibido:

28/mayo/2023

Aceptado:

04/noviembre/2023

Palabras clave:

E. coli diarreagénica, anti-formación de biopelículas, sobrenadante libre de células, *L. casei* IMAU60214

Keywords:

E. coli diarrheagenic, anti-biofilm, cell-free supernatant *L. casei* IMAU60214

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue analizar las propiedades del sobrenadante libre de células (SLC) del *Lactobacillus casei* IMAU60214 contra *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) EDL933, *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) 49766 y una cepa indicadora de *E. coli* ATCC 25922. El SLC del *Lactobacillus* obtenido después de 48 horas del cultivo afecta el crecimiento de *E. coli* con halos de inhibición, dependiente a la concentración del SLC (11±1.5-21±1.2 mm de diámetro) medidos por ensayo de difusión en placas. El SLC reduce la formación, dispersión de las biopelículas maduras del (40-65%) de estas cepas determinada mediante tinción de cristal violeta al (2%). El pre-tratamiento de proteinasa K, catalasa interfiere en la actividad antibiopelículas, antidispersión del SLC, sugiriendo que podrían relacionarse a metabolitos de componentes proteicos y peróxido de hidrogeno. Además, el SFC producido del cultivo de *L. casei* IMAU60214 podría representar una alternativa bioterapéutica contra cepas de *E. coli* diarreagénica.

ABSTRACT

The objective of this research was to analyze the properties of the cell-free supernatant (CSF) of *Lactobacillus casei* IMAU60214 against Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) EDL933, Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) (49766) and *E. coli* ATCC indicator strain (25922). The treatment of the CSF obtained from 48 hours of the *Lactobacillus* culture produces halos of bacterial inhibition with ranges of (10-21±1.5mm in diameter) depending on concentration of the CSF, determined by the plate diffusion assay. CSF reduces the formation and dispersion of mature biofilms (20-70%) of these *E. coli* strains, quantified by crystal violet staining (2%). The pre-treatment of proteinase K and catalase, interferes with the antibiofilm, antidispersion activity of CSF and suggesting that they could be related to metabolites of protein components and hydrogen peroxide. In addition, the CFS produced from the culture of *L. casei* IMAU60214 could represent a biotherapeutic alternative against diarrheagenic *E. coli* strains.

Introducción

Escherichia coli son bacterias comunes encontradas en el tracto gastrointestinal de animales y humanos como parte de la homeostasis del microbioma intestinal (Leimbach et al., 2013). Sin embargo, por la plasticidad del genoma de esta bacteria, así como por el efecto de la transferencia horizontal de información genética, han surgido clonas de *E. coli* que causan distintos síndromes clínicos como diarrea, infección del tracto urinario, sepsis y meningitis. *E. coli* que causa diarrea, representa la segunda causa de las enfermedades intestinales infecciosas en niños y adultos jóvenes superadas por las infecciones entéricas causadas por agentes virales como (rotavirus, calciovirus, adenovirus y norovirus (Velazquez et al., 2004; Sousa et al., 2021; Shah et al., 2018). Las cepas de *E. coli* diarreagénica exhiben diferentes propiedades de virulencia, lo que ha originado la integración de distintos grupos patogénicos o “patotipos” (Nataro et al., 1998; Braz et al., 2020), en esta clasificación se consideran los mecanismos de daño que ocasionan al hospedero como sus propiedades y tipos de adherencia relacionadas, al tipo de adhesinas que expresan así también las toxinas con capacidad para invadir células (Coxen et al., 2010; Smith et al., 2014, Sharma et al., 2016). En los patotipos de *E. coli* se incluyen a *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), y cepas híbridas como *E. coli* Enteroagregativa hemorrágica (EAEHEC) con más de un factor de virulencia (Oloketuyi et al., 2017). Además, de los patotipos de las cepas DEC también se han descrito cepas que causan infecciones extra-intestinales (EXPEC) ocasionando infecciones urinarias (UPEC), meningitis (NMEC) o septicemias. Otro aspecto relevante, en las enfermedades infecciosas se relaciona con el incremento de resistencia a los antimicrobianos, situación que cada día se incrementa y por lo que la OMS ha señalado la posibilidad que para el año 2050 no habrá tratamientos útiles para las enfermedades infecciosas (O’Neill J et al., 2014). Ante ello, se plantea la necesidad de buscar alternativas para el manejo de las infecciones incluidas las relacionadas con *E. coli* que ha sido definido como prioridad dentro de las infecciones de comunidad e intrahospitalarias. Una alternativa que ha sido utilizada desde hace tiempo, la constituyen las bacterias con potencial probiótico; mismas que han sido estudiadas en la contribución de sus efectos benéficos a la salud del hospedero. Los microorganismos empleados como probióticos son en su mayoría obtenidos del microbiota intestinal del humano y animales (Fuller et al., 1989). Además, se utilizan en diversos productos de leches fermentadas comercializadas o liofilizados que son

administrados por vía oral. Estas cepas probióticas pertenecen principalmente al grupo mayoritario de los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* entre otras (Tabasco et al., 2007). Existen diferentes especies de *Lactobacillus* entre ellas *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus* que se han considerados como fuertes candidatos para su empleo como terapia biológica (Kaillasapathy et al., 2000; Peng X et al., 2022). Estudios previos con cepas de *Lacticaseibacillus* refieren efectos de inhibición sobre el crecimiento de patógenos entéricos (Liu W et al., 2014; Karczewski J et al., 2010). Otra propiedad que se ha observado en estas bacterias probióticas es la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas a través de la secreción de etanol, ácidos grasos, peróxido de hidrogeno, bacteriocinas y microcinas, productos con actividad antimicrobiana significativa (Marck DR, et al 1999). En otros reportes el efecto protector contra microorganismos patógenos de bacterias probióticas se debe a su capacidad para inducir la expresión de mucinas que refuerzan la actividad protectora de la barrera epitelial al favorecer que las uniones en el epitelio intestinal se hagan más estrechas (Bermudez-Brito et al., 2012). Otros elementos que favorecen el potencial la secreción de ácidos grasos de cadena corta (ácido láctico, acético, fórmico), productos metabólicos liberados en los sobrenadantes libres de células (SLCs), que regulan el pH; situación que puede limitar el crecimiento de los microorganismos patógenos (Kumar M et al., 2013; Sionov R.V et al., 2022) Sin embargo, las bacterias patógenas para sobrevivir expresan componentes que les permiten tolerar condiciones adversas como los ambientes ácidos, falta de nutrientes y el efecto de los antimicrobianos. En este contexto, la formación de biopelículas contribuye importantemente al desarrollo de la infección por patógenos bacterianos (Fleming H.C et al., 2016). Las biopelículas conforman una estructura extracelular polimérica organizada que está constituida de exo polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas. Estas permiten a la bacteria que las produce que pueda adherirse a superficies bióticas y/o abióticas coadyuvando a la colonización del microorganismo, además protege a la bacteria de factores adversos como son los antimicrobianos e inclusive interfiere contra mecanismos inmunes de defensa (Jamal M et al., 2018). Aunque, existen un gran número de bacterias probióticas que se han comercializado, en muchas de estas no se han evaluado sus habilidades para interferir con el desarrollo de las bacterias patógenas que causan enfermedad en su hospedante.

De tal forma que se hace necesario identificar en las bacterias probióticas de uso comercial las propiedades que poseen para interferir y/o contrarrestar los mecanismos de virulencia de las bacterias patógenas.

En la actualidad no todas las especies de bacterias probióticas han sido estudiadas en relación con los mecanismos que poseen para interferir con el crecimiento de microorganismos patógenos. *Lactocaseibacillus* es un miembro de las bacterias ácido lácticas (BAL) que, no obstante que se emplea como probiótico comercial al momento no existen reportes que señalen las propiedades que posee para inhibir el crecimiento o eliminar bacterias patógenas causantes de enfermedad intestinal como es el caso de *E. coli* diarreagénica. Por tal razón, el propósito del presente trabajo fue investigar el efecto del SLC de un nuevo aislado *L. casei* IMAU60214 sobre el crecimiento de cepas *E. coli* diarreagénica, la formación y dispersión de biopelículas en superficies abióticas, así como los posibles metabolitos involucrados en estas actividades.

Metodología

Cepas Bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa de *Lactobacillus casei* IMAU60214 es un aislado de producto lácteo fermentado, gentilmente donado para el estudio por el grupo de la Dra. Cruz-Guerrero de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM). La cepa fue crecida en medio MRS (De Manosa, Rogosa, Sharpe), caldo (BDL, Franklin, Lakes, NJ, USA) a 37 °C durante 18 a 24 horas. Las cepas patógenas del grupo de DEC usadas fueron EAEC 49766 (un aislado clínico de diarrea) y EHEC o EDL933 ATCC 700927 así como cepa control a los ensayos experimentales *Escherichia coli* ATCC 259221. Estas cepas se cultivaron en medio de Luria Bertoni caldo (LB) previamente preparado de acuerdo con la siguiente formulación (cloruro de sodio 5.0 gramos /Lt, Extracto de Levadura, Peptona de caseína 10.0 g/Lt a pH 7.2) a 37 °C, durante la noche sin agitación. En el día del ensayo, las bacterias del cultivo obtenido fueron centrifugadas a 5000rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El paquete celular fue lavado tres veces con solución salina fisiológica pH=7.2 y ajustadas a una concentración final de 1×10^9 UFC/ml.

Preparación del sobrenadante libre de células SLC de *L. casei* IMAU60214

La cepa de *Lactobacillus* fue crecida en medio de caldo MRS (BDL, Franklin, Lakes, NJ, USA) a 37 °C sin agitación durante 48 horas. Enseguida, la suspensión del bacilo *L. casei* IMAU60214 fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4 °C y el SLC fue colectado en tubos estériles. La condición ácida del SLC del *Lactobacillus* fue ajustada a pH=6.5 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1N (Kojima et al., 2016). Después, el SLC de *Lactobacillus* fue filtrado usando membranas estériles de 0.22 micras de diámetro (Millipore, MA, USA).

EL SLC de *L. casei* IMAU60214 utilizado en fresco y su actividad biológica fue determinada con diferentes concentraciones: 10-80 % del SLC (v/v), que fueron preparadas en stocks de volumen a volumen (v/v) en el medio de caldo MRS (BDL, Franklin, Lakes, NJ, USA).

Evaluación de la actividad antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli* diarreagénica

La actividad antimicrobiana del SLC de *L. casei* IMAU60214 contra las cepas EAEC y EHEC de *E. coli* diarreagénica se analizó por el método de difusión en placas (Chen T et al., 2014). Las cepas de *E. coli* diarreagénica y la cepa indicadora *E. coli* ATCC 25922 (como control positivo interno) fueron cultivadas en LB a 37 °C toda la noche, sin agitación.

Las cepas fueron ajustadas al tubo 0.5 de McFarland (1×10^8 UFC/ml) y cada cepa patógena fue distribuida con aplicador de algodón humedecido en solución salina fisiológica sobre placas de agar de Mueller-Hinton (Difco Agar Franklin Lakes, NJ, USA) se realizaron perforaciones con puntas de micropipeta de 1 ml de volumen para generar pozos de 7 mm de diámetro.

Enseguida los pozos fueron llenados con 100µl de las diferentes concentraciones del SLC (10 a 80% (v/v) preparadas en medio de caldo MRS. Las placas se mantuvieron por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la difusión del SLC en el agar, posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas.

La actividad antimicrobiana de cada concentración del SLC fue evaluada por medición de las zonas o halos de inhibición radial bacteriana en las cepas de *E. coli* diarreagénica y el control de cepa (y/o control positivo interno) de *E. coli* ATCC 25299. Además, un control negativo del medio caldo MRS (BDL, Franklin, Lakes, NJ, USA) fue preparado (sin adicionar SLC) en los ensayos experimentales, desarrollados por duplicado a las concentraciones del SLC, con un total de tres experimentos independientes.

Formación de biopelículas de cepas de *Escherichia coli* diarreagénica

Se prepararon biopelículas en superficie abiótica de las dos cepas *E. coli* diarreagénica EAEC 46766 y (EHEC EDL933) y cepa control indicadora *E. coli* ATCC 25922 ajustando preparaciones de estas cepas a su densidad óptica al tubo 1 de McFarland (3×10^8 UFC/ml). 50µl de la suspensión ajustada fue diluida con 950 µl de medio de cultivo de LB y depositada en placas de poliestireno de 24 pozos (Costar, Corning, USA) preparadas por triplicado (Yadav MK et al., 2015). Subsecuentemente, las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37 °C.

Después, cada pozo fue lavado seis veces con solución salina de fosfatos pH=7.2 para eliminar bacterias en suspensión y las bacterias adheridas fueron fijadas con 1ml de metanol (Merck,) durante 15 minutos a temperatura ambiente. En seguida para cuantificar la formación de biopelículas formadas, las placas fueron teñidas con solución de cristal violeta al 2% (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

El exceso de tinción fue removido por lavados con agua Milli-Q y luego de remover el fluido residual se secaron a temperatura ambiente (O'Toole et al., 2011). La tinción fue liberada por adición de una solución decolorante de ácido acético glacial al 33% (v/v).

La absorbancia (ABS) fue leída a 570 nm en un equipo lector de microplacas (Multiskan, Termolabsystems, Finlandia). Cada ensayo fue llevado a cabo en triplicados biológicos, de tres experimentos independientes.

Evaluación de la actividad del SLC de *L. casei* IMAU60214 sobre la formación de biopelículas contra cepas diarreagénica

Con el propósito de analizar el efecto del SLC sobre la formación de biopelículas de cepas DEC se siguió una estrategia de co-incubación de los patógenos de estudio con diferentes rangos de concentraciones del SLC (40-80%) las cuales fueron preparadas en medio MRS (v/v), estas preparaciones fueron depositadas sobre placas de 24 pozos (Costar, Corning USA) a un volumen final de 1 ml de medio (LB) por pozo; las cuales fueron incubadas durante 48 horas a 37 °C para permitir la adhesión celular y la formación de las biopelículas. Un inóculo de MRS solo fue utilizado como control negativo del ensayo y se colocaron controles de las bacterias patógenas no tratadas con SLC y su efecto sobre la formación de biopelículas fue medido por la comparación de las lecturas de absorbancia a 570nm de los pozos tratados con el SLC versus de los pozos control no tratados (Stepanovic S et al., 2000; Bhowmick P.P et al., 2011). Así mismo, para estimar la inhibición o reducción del SLC de *L. casei* IMAU60214 se expresó como porcentaje, el cual fue calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

Porcentaje de reducción en biopelículas = $1 - \frac{\text{media ABS } 570\text{nm de muestras biológicas}}{\text{media de la ABS } 570\text{nm control}} \times 100$.

Efecto in vitro del SLC de *L. casei* IMAU60214 sobre la formación de biopelículas pre-formadas de *E. coli* diarreagénica

Los ensayos de dispersión de biopelículas de las cepas DEC se evaluaron sobre biopelículas maduras en superficie abiótica, placas de 24 pozos (Costar, Corning USA) de acuerdo a lo reportado por (Kumar et al. 2016).

Brevemente las biopelículas pre-formadas de cada cepa DEC y del control de *E. coli* ATCC 25922 fueron tratadas con concentraciones variables (10 a 80%) del CSF de *L. casei* IMAU60214, a la par del ensayo pozos de células adherentes bacterianas no tratados y control de pozos blanco también incluidos (Kaur et al., 2018).

Las placas de 24 pozos, bajo estas condiciones fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. La dispersión o erradicación de las biopelículas fue calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

Erradicación o dispersión de biopelículas = $1 - \frac{\text{media ABS } 570 \text{ nm de muestras biológicas}}{\text{media de la ABS } 570\text{nm control}} \times 100$

Evaluación de la actividad antibiopelículas y antidispersión de cepas de *E. coli* diarreagénica después del tratamiento enzimático proteolítico con catalasa y proteinasa K del SLC de *L. casei* IMAU60214.

Los efectos del tratamiento enzimático proteolítico con catalasa y proteinasa K en la actividad biológica del SLC de *L. casei* IMAU60214 fue investigado sobre la formación y dispersión de biopelículas de cepas *E. coli* diarreagénica mediante tratamiento enzimático del SLC con solución stock de catalasa (Sigma, Aldrich México) preparada a 1mg/ml en 0.2 M de solución de fosfatos pH=7.0 y stock de proteinasa K (Thermoscientific) a la concentración misma concentración en solución de Tris buffer 30nM PH=7.5.

Posteriormente el SLC fue incubado (1:1 v/v) con las soluciones enzimáticas durante 2 horas a 37 °C. Después de este tratamiento enzimático, la formación y la dispersión de biopelículas de *E. coli* diarreagénica fue llevada a cabo como se describió en la sección anterior de la metodología.

En el ensayo experimental controles negativos del SLC (sin tratamiento enzimático) fueron incluidos y los ensayos desarrollados en triplicados de las muestras biológicas de un total de tres experimentos independientes.

Análisis estadístico

Cada ensayo fue llevado en triplicado de tres ensayos experimentales con independientes crecimientos de cultivo y los datos fueron presentados como valor base (n=3).

La significancia estadística fue establecida por prueba de ANOVA y comparación múltiple Tukey's o con programa de Graph Pad Prism versión.

Resultados y discusión

Actividad antimicrobiana del SLC de *L. casei* IMAU60214 contra cepas de *Escherichia coli* diarreagénica

Los resultados del análisis de actividad antimicrobiana demostraron efectos significativos de inhibición del SLC de *L. casei* IMAU60214 sobre el crecimiento *in vitro* de las cepas *E. coli* diarreagénica EAEC, EHEC y la cepa de control interno de *E. coli* ATCC 25922 (Figura 1A). En contraste, los pozos sin el SLC de *L. casei* IMAU60214 utilizado como control negativo del ensayo (en el cual solamente fue adicionado medio de caldo de MRS) no fueron observadas zonas radiales de inhibición en el crecimiento. Así también, los valores de los halos de inhibición obtenidos fueron (10 ± 1.5 a 21 ± 1.2 mm) de diámetro entre las cepas DEC siendo dependientes a la concentración adicionada de SLC de *L. casei* IMAU60214 (Figura 2B).

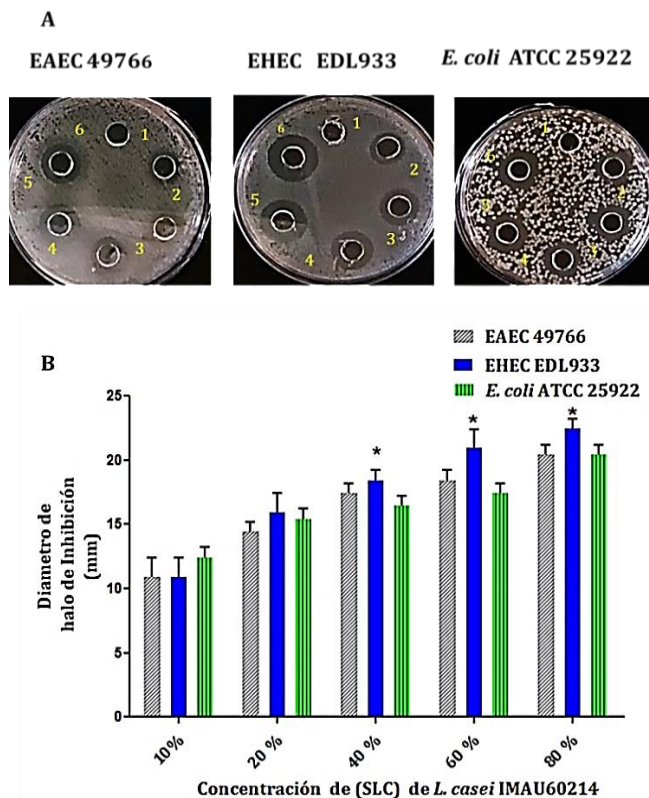


Figura 1. A. Actividad antimicrobiana del SLC de *L. casei* IMAU60214 contra cepas de *E. coli* diarreagénica imágenes representativas de las zonas de inhibición del crecimiento sobre placas de Mueller-Hilton a diferentes concentraciones del SLC, pozo 1 (MRS), 2 (10%), 3 (20%), 4 (40%), 5 (80%) y 6 (80%), B. Medición de los diámetros de las zonas de radiales de inhibición, con valores de media \pm desviación estandar, * diferencias significativas del SLC ($p < 0.05$).

En este contexto, esta documentado que la actividad antimicrobiana, es una de las propiedades a considerar en la efectividad de cepas probióticas y en su acción posbiótica siendo el efecto antimicrobiano atribuible principalmente a la secreción de variadas sustancias que resultan tóxicas a los distintos patógenos como Enterobacterias y las cuales involucran a variados ácidos orgánicos (ácido láctico, succínico, acético y propionico) que se han identificado en los SLC de cepas probióticas. Además, otras investigaciones sustentan también que el antagonismo de las cepas probióticas contra Enterobacterias es de tipo acidogénica. Por el contrario, en otras publicaciones sustentan que las características de la actividad antimicrobiana de las cepas probióticas se correlaciona con la cepa- especie- específica. En este estudio la actividad antimicrobiana del SLC fue significativa contra estas cepas de *E. coli* diarreagénica y estas observaciones son parcialmente similares a otros aislados de *Lactobacillus* como *L. acidophilus* RY2, y *L. paracasei* con efecto inhibitorio contra bacterias enteropatógenas (Lin, P.P et al. 2009).

Efecto inhibitorio de SLC del *L. casei* IMAU60214 sobre la formación de biopelículas de *E. coli* diarreagénica

La incubación de *E. coli* diarrogénica con el SLC de *Lactobacillus* induce un efecto inhibitorio significativo dependiente a la concentración del SLC (40-80%v/v) (Figura 2).

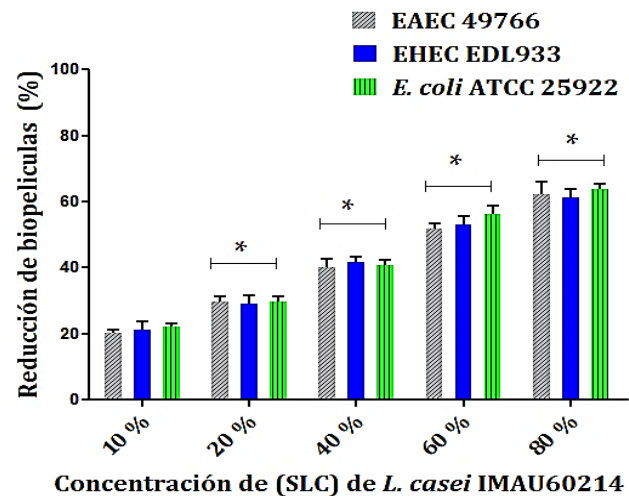


Figura 2. Impacto del SLC de *L. casei* IMAU60214 sobre la formación de biopelículas de cepas de *E. coli* diarreagénica sobre superficie abiótica, porcentajes de la formación de biopelículas cuantificado por cristal violeta, los valores representan la media \pm desviación estándar de tres ensayos biológicos de cada cepa, * diferencias significativas entre concentración de SLC ($p > 0.05$).

Así también, el efecto inhibitorio del SLB fue observado contra todas las cepas EAEC 49766, EHEC EDL933 en comparación a la cepa indicadora de *E. coli* ATCC 25922.

Es notar también, que las biopelículas de *E. coli* diarreagénica en la presencia del SLC muestran un impacto positivo de reducción de biopelículas de estas cepas sustentado en los valores del porcentaje de reducción mayor del 50%, en todas las cepas de *E. coli* diarreagénica con el tratamiento del SLC al 80%.

La relevancia de los mecanismos de patogenicidad de patógenos bacterianos, entre ellos la formación de biopelículas, se ha situado como un blanco de interés bio-terapéutico importante al potencial de beneficios observados en las cepas probióticas contra patógenos bacterianos gram positivos y gram negativos.

En este estudio, el efecto del SLC fue analizado sobre bacterias gram negativas productoras de biopelículas como EAEC 49766 y EHEC EDL933 en comparación de una cepa indicadora de *E. coli* ATCC 25922 que es fuertemente formadora de biopelículas en superficies abióticas.

Esta reducción por el SLC de *L. casei* IMAU60214 provee evidencias a la posibilidad como un candidato útil en el control de las infecciones relacionadas a cepas de *E. coli* que causan diarrea y en otras condiciones más severa entre ellas, el síndrome hemolítico urémico (Ibarra C et al. 2008; Rivero M.A et al., 2004).

Efecto inhibitorio de SLC del *L. casei* IMAU60214 sobre la dispersión de biopelículas preformadas de *E. coli* diarreagénica

Con respecto, a la actividad del SLC sobre la dispersión de biopelículas maduras, los datos de esta investigación demostraron un impacto positivo en la remoción de biopelículas ya preformadas (Figura 3).

El SLC del *L. casei* IMAU60214 es capaz de remover estas biopelículas ya pre-formadas con valores significativos del (40±2.5 a 70±2.3%) expresado como porcentajes de dispersión cuando las cepas de *E. coli* diarreagénica fueron pre-tratadas con concentraciones de 60-80% (v/v) del SLC cuantificado después de 24 horas.

En concordancia con estos datos, reportes previos evidencian actividad anti-dispersión por cepas probióticas contra variados microorganismos patógenos del tracto gastrointestinal (Lagrafeuille R et al., 2018).

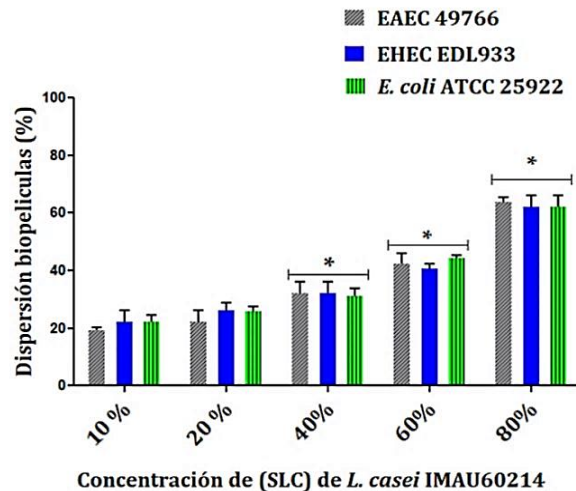


Figura 3. Impacto del SLC de *L. casei* IMAU60214 sobre la dispersión de las biopelículas de cepas de *E. coli* diarreagénica, sobre superficie abiótica, porcentajes de la dispersión de biopelículas cuantificado por cristal violeta, los valores representan ensayos biológicos de cada cepa, * diferencias significativas entre concentración de SLC ($p > 0.05$)

Otros reportes sustentan la actividades anti-dispersión de biopelículas por *Lactobacillus plantarum* KU200656 un aislado de kimchi (Lee J.E et al., 2020). La dispersión de las biopelículas es de gran importancia que impacta negativamente a la capacidad de adhesión de células bacterianas a distintas superficies abióticas siendo un factor de virulencia que se tiene que ser considerado en el control de aislados de *Escherichia coli* (Fernández M.S et al., 2023).

Efecto del tratamiento enzimático con proteinasa K y catalasa sobre la actividad biológica de SLC del *L. casei* IMAU60214 en la formación y en la dispersión de biopelículas de *E. coli* diarreagénica

En la búsqueda de identificar los posibles metabolitos involucrados sobre el impacto positivo observado por el SLC contra cepas de *E. coli* diarreagénica.

Los resultados de esta investigación demostraron que el tratamiento enzimático con proteinasa K, catalasa revelaron menor actividad funcional del SLC de *L. casei* IMAU60214 tanto en formación y la dispersión de biopelículas como se muestra en la (Figura 4).

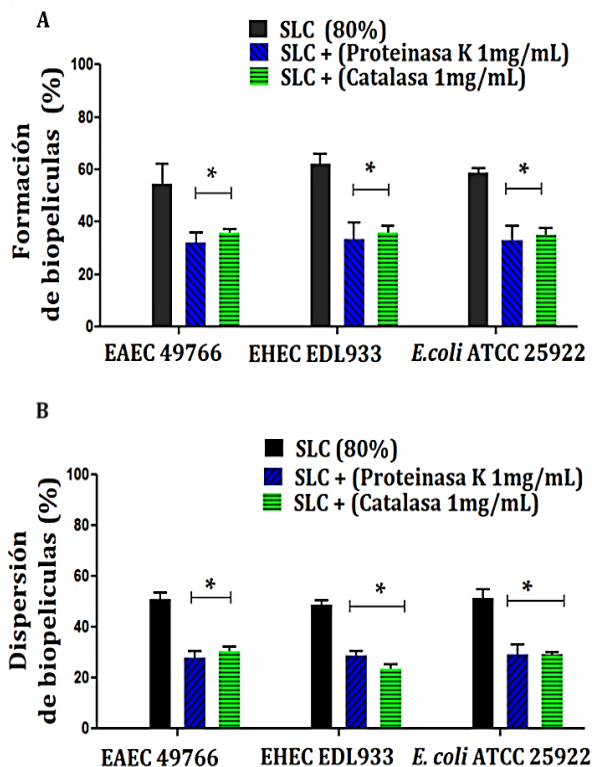


Figura 4. Efecto del pre-tratamiento enzimático con proteinasa K, catalasa sobre la formación y dispersión biopelículas de cepas de *E. coli* diarregénica y del control de *E. coli* ATCC 25922, **A.** Formación de biopelículas, * significancia entre los diferentes tratamientos ($p > 0.05$). **B.** Dispersión de biopelículas, * significancia entre los diferentes tratamientos ($p > 0.05$).

Estos hallazgos satisfacen estudios previos reportados (Klose et al. 2010) que demuestran que metabolitos contenidos o derivados de SLC de *L. rhamnosus* pueden alterar la patogénesis de ciertas bacterias entericas como EHEC y Salmonella (Lee H.J et al. 2023). En similitud a la reducción de la actividad biológica del SLC en este estudio, otras investigaciones demuestran mecanismos de metabolitos producidos por *Lactobacillus casei* sobre la lisis *E. coli* Enterohemorrágica (Aditya et al., 2020).

Conclusiones

La actividad del SLC de *L. casei* IMAU60214 categoriza a esta bacteria como un candidato potencial en actividad posbiótica que puede interferir con algunos de los factores patogénicos de cepas de *E. coli* diarregénica y el análisis de la literatura indica que el presente estudio es el primero en contribuir a la caracterización de la actividad antagónica de *L. casei* IMAU60214 contra cepas de *E. coli* diarregénica.

Sin embargo, este presenta ciertas limitaciones, una de ellas relacionada al ensayo de formación de biopelículas el cual fue solo analizado en sobre superficies abióticas,

Por tanto, sería importante demostrar que este SLC puede destruir la formación de biopelículas bajo condiciones bióticas. Otro aspecto relevante es que permanece todavía en debate la composición total del SLC del *L. casei* IMAU60214 que a futuro confirme su impacto a través de una intensa investigación, tanto en estudios in vivo, como estudios con modelo animal y estudios clínicos para considerarlo como una alternativa bioterapéutica en las infecciones causadas por *E. coli* diarregénica.

Agradecimientos

A los integrantes del grupo de investigación del Dr. Mariano Garcia Garibay por la donación de la cepa probiótica de *Lactobacillus casei* IMAU60214 y al comité de apoyo a proyectos de investigación bajo el programa de Fondos Federales a proyectos de investigación del Hospital Infantil Federico Gómez para de la presente investigación, con número de registro (HIM/2019/050) SSA 1584

Referencias

- Aditya A., Peng, M., Young, A., Biswas, D.(2020). Antagonistic Mechanism of Metabolites Produced by *Lactobacillus casei* on Lysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 11: 574422.
- Bermúdez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab*, 61:160–74.
- Bhowmick, P. P., Devegowda, D., Ruwandepika, H. A., Fuchs, T. M., Srikumar, S., Karunasagar, I., Karunasagar, I. (2011). *gcpA* (*stm1987*) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in both high and low nutrient medium. *Microbial pathogenesis*, 50: 114–122.
- Braz V.S., Melchior K, Moreira C, G. 2020 *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. *Front Cell*, 10: 548492
- Chen.T., Wu. Q., L.S., Xiong. S., Jiang. S., Tan. Q., Zhang, Z., Zhu, D., Wei, H. (2014) Microbiological quality and characteristics of probiotics in China. *J Sci Food Agric*, 94:131-138
- Croxen, M. A., Finlay, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. (2010). *Nature reviews. microbiolog.*, 8: 26–38.

- Fernandez MSM., Rios], C., Vanconselos, MB., Lourenco., M.L.M.C., Matos, M:N:C., Calvancante, RMB., de Almeida M.V. A., Costa, R.A., & Carreiro V.A. (2023) Effect of Lactobacillus ssp. cell free supernatant against planktoni growth and biofilm formation of foodborne Escherichia coli isolates. *Letters in applied microbiology*, 76: ovac006
- Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. (2016) Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.*, 14: 563–575.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. (1989). *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365–378.
- Ibarra, C., Goldstein, J., Silberstein, C., Zotta, E., Belardo, M., & Repetto, H. A. (2008). Síndrome urémico hemolítico inducido por Escherichia coli enterohemorrágica [Hemolytic uremic syndrome caused by enterohaemorrhagic Escherichia coli]. *Archivos argentinos de pediatria*, 106: 435–442.
- Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A., Hussain T., Ali M., Rafiq M., Kamil M.A. (2018), Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.*, 81:7–11.
- Kaillasapathy K., Chin J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organism with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. *Inmunol. Cell Biol.*, 78: 80-88
- Karczewski J., Troost F. J., Konings I. (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology.*, 298:G851–G859.
- Klose, V., Bayer, K., Bruckbeck, R., Schatzmayr, G., & Loibner, A. P. (2010). In vitro antagonistic activities of animal intestinal strains against swine-associated pathogens. *Veterinary microbiology.*, 144:515–521.
- Kumar, M., Nagpal, R., Verma, V., Kumar, A., Kaur, N., Hemalatha, R., Gautam, SK., Singh B. (2013) Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr Rev.*, 71:23–34.
- Kumar, M., Dhaka, P., Vijay, D., Vergis, J., Mohan, V., Kumar, A., Kurkure, N. V., Barbuddhe, S. B., Malik, S. V., & Rawool, D. B. (2016). Antimicrobial effects of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus acidophilus against multidrug-resistant enteroaggregative Escherichia coli. *International journal of antimicrobial agents*, 48: 265–270.
- Kojima, Y., Oshima, T., Sereviratne, C.J., Maeda, N, (2016). Combining prebiotics and probiotics to develop novel symbiotic that suppress oral pathogens. *J. Oral, Biosci*, 58, 27-32
- Lagrafeuille, R., Miquel, S., Balestrino, D., Vareille-Delarbre, M., Chain, F., Langella, P., & Forestier, C. (2018). Opposing effect of Lactobacillus on in vitro Klebsiella pneumoniae in biofilm and in an in vivo intestinal colonisation model. *Beneficial microbes*, 9(1), 87–100
- Lee, H. J., Lee, J. B., Park, S. Y., Choi, I. S., & Lee, S. W. (2023), Antimicrobial Activity of *Ligilactobacillus animalis* SWLA-1 and Its Cell-Free Supernatant against Multidrug-Resistant Bacteria and Its Potential Use as an Alternative to Antimicrobial Agents. *Microorganisms*. 11: 182.
- Lee, J. E., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2020), Antimicrobial and anti-biofilm effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU200656 isolated from kimchi. *Food science and biotechnology.*, 30: 97–106.
- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U (2013). E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Current topics in microbiology and immunology.*, 358, 3–32
- Lin, PP., Hsieh, Y, M, (2009). Antagonistic activity of Lactobacillus acidophilus RY2 isolated from healthy infancy feces on the grow and adhesion characteristics of enteroaggregative Escherichia coli. *Anaerobe.*, 15: 122-126.
- Liu W., Pang H., Zhang H., Cai Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In: Zhang H., Cai Y., editors. *Lactic Acid Bacteria* Springer; Dordrecht, The Netherlands
- Mack D.R., Michail S., Wei S., McDougall L., Hollingsworth M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 276: G941–G950.
- Nataro J.P., Kaper J.B (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. 11: 142-201
- Oloketuyi S, F., Khan F. (2017). Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilm-current knowledge and future outlooks. *J. Basic Microbiol.*, 57, 728-43.
- O'Neill J. Antimicrobial resistance; tackling a crisis for the health and wealth of nations, (2014). [Org/sites/default/files/AMR Review Paper-Tackling a crisis for the health and wealth of nations_1.pdf](https://www.who.int/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper-Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf) (accessed Ja 25, 2023).
- O'Toole GA. (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis Exp.*, 11,47: e2437
- Rivero, M. A., Padola, N. L., Etcheverría, A. I., Parma, A. E. (2004). Escherichia coli enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina [Enterohemorrhagic Escherichia coli and hemolytic-uremic syndrome in Argentina]. *Medicina*, 64(4), 352–356.

- Peng, X., Ed-Dra, A., Song, Y., Elbediwi, M., Nambiar, R. B., Zhou, X., & Yue, M. (2022). *Lacticaseibacillus rhamnosus* alleviates intestinal inflammation and promotes microbiota-mediated protection against Salmonella fatal infections. *Frontiers in immunology*, 13: 973224
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma P. (2016). E. coli biofilm: development and therapeutics strategies. *J, Applied Microbiology*. 121: 309-319.
- Sionov, R. V., Steinberg, D. (2022). Targeting the Holy Triangle of Quorum Sensing, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in Pathogenic Bacteria. *Microorganisms*, 10: 1239.
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W 4th. Shiga toxin-producing Escherichia coli. (2014). *Advances in applied microbiology*, 86, 145-197.
- Souza, Y. F. V. P., Souza, E. V., Azevedo, L. S., Medeiros, R. S., Timenetsky, M. D. C. S. T., & Luchs, A. (2021). Enteric adenovirus epidemiology from historical fecal samples in Brazil (1998-2005): Pre-rotavirus vaccine era. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 94:105007.
- Stepanovic, S., Vilcovic´. D., Dakie. I., Savié, B., & Svabie-Vlaglovie, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40:175-179
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peláez, C., Requena, T. (2007). Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *Int. Dairy J*, 17; 1107-1114.
- Velázquez, F, R., Garcia-Lozano, H., Rodriguez, E., Cervantes, Y., Gómez, A., Melo, M. Anaya, L. Ovalle, J. C., Torres, J., Diaz De Jesus, B., Alvarez-Lucas, C., Breuer, T., Muñoz, O., Kuri, P. (2004) Diarrhea morbidity and mortality in Mexican children: impact of rotavirus disease. *The Pediatric infectious disease journal*, 23; S149-S155.
- Yadav, M.K., Chae, S-W., I.m, G.J., Chung, J-W., Song, J.J. (2015), Eugenol: a phy-compound effective against methicillin-resistant and methicilim-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilm. *PLOS One*, 10: e0119564.