



Universidad de Valladolid

**CULTIVO DE LACTOBACILLUS
REUTERI EN SOLITARIO Y EN
COCULTIVO CON ESCHERICHIA COLI
A 37°C.**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO DE NUTRICIÓN HUMANA Y DIÉTETICA**

Autor: Alberto Castro Crespo

Tutor: Emiliano José Quinto Fernández

Curso: 2019-2020

Índice

Resumen.....	4
Palabras clave.....	5
Abstract.....	6
Key Words.....	7
Introducción.....	8
Justificación.....	12
Objetivos.....	12
Material y métodos.....	13
Diseño del estudio.....	13
Recuperación de las bacterias.....	13
Siembra de las bacterias.....	13
Aislamiento y conservación.....	14
Curva de crecimiento de las bacterias.....	15
Curva de crecimiento de <i>L. reuteri</i> a 37°C.....	16
Curvas de crecimiento de <i>L. reuteri</i> incubado a 20 ó 4°C.....	19
Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> a 37°C.....	19
Curvas de crecimiento del cocultivo de <i>L. reuteri</i> con <i>E. coli</i>	19
Búsqueda y simulación de curvas en ComBase.....	20
Curva de crecimiento de <i>L.reuteri</i> a 37°C.....	20
Curva de crecimiento de <i>L.reuteri</i> a 20°C y 4°C.....	20
Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> a 37°C.....	21
Curva de crecimiento del cocultivo.....	21
Resultados.....	22
Curva de crecimiento de <i>L. reuteri</i>	22
Curvas de crecimiento <i>E. coli</i> y cocultivo.....	24
Discusión.....	26
Crecimiento de <i>L. reuteri</i> a diferentes temperaturas.....	26
Crecimiento de <i>E. coli</i> en solitario y en cocultivo.....	28
Futuras fuentes de investigación.....	30

Limitaciones del estudio.....	30
Conclusiones.....	31
Bibliografía	32
Anexos	36

Resumen.

Introducción.

Lactobacillus reuteri es una bacteria ácido-láctica hetero-fermentativa. *L.reuteri* es capaz de generar numerosos beneficios sobre la salud del huésped, como coadyuvante en tratamiento de trastornos digestivos, enfermedades inflamatorias, así como en diferentes infecciones bacterianas.

Escherichia coli perteneciente al grupo de las *Enterobacteriaceae* es un bacilo gram negativo, aerobio y anaerobio facultativo. *E. coli* es una bacteria que pertenece a la microbiota normal del intestino, pero que en algunos casos puede ser patógena.

Conocer cuál es el efecto de un probiótico sobre el crecimiento de una bacteria patógena podría ayudar al control y tratamiento de patologías relacionadas con *E. coli*.

Objetivo.

Realizar un cultivo de *L. reuteri* a diferentes temperaturas a partir de un preparado de farmacia observando la variación en el crecimiento.

Estudiar la variación en el crecimiento de *E. coli* en cocultivo con *L. reuteri*.

Metodología.

Se analizó el crecimiento de *L. reuteri* a diferentes temperaturas: 4, 20 y 37°C. Para ello se realizaron tres curvas de crecimiento bacteriano para cada una de las temperaturas.

Se realizaron 2 curvas de crecimiento bacteriano para analizar la variación del crecimiento de *E. coli* respecto a un cocultivo de *E. coli* con *L. reuteri*.

Uso de la base de datos del programa de modelización microbiológica ComBase para la simulación de las curvas de crecimiento.

Resultados.

Los cultivos de *L. reuteri* que se cultivaron a diferentes temperaturas tuvieron un crecimiento diferente, siendo mayor en el cultivo que se mantuvo a una temperatura de 37°C y menor en el cultivo a 4°C.

En el cocultivo de *E. coli* con *L. reuteri* se produjo una disminución del crecimiento de *E. coli* respecto al control de *E. coli* cultivado en solitario.

Conclusiones.

La temperatura a la que se realiza un cultivo tiene una gran importancia sobre el crecimiento de éste, encontrando que la temperatura óptima de crecimiento fue la esperada: 37°C.

L. reuteri tiene la capacidad de reducir el crecimiento de algunas bacterias patógenas como *E. coli* cuando se realiza un cocultivo con ambos.

Palabras clave.

L. reuteri, *E. coli*, Cultivo, Cocultivo, Crecimiento.

Abstract.

Introduction.

Lactobacillus reuteri is a hetero-fermentative lactic acid bacterium. *L. reuteri* is able to generate numerous benefits on host health, such as adjuvant in the treatment of digestive disorders, inflammatory diseases, as well as in different bacterial infections.

Escherichia coli, belonging to the *Enterobacteriaceae* group, is a gram-negative, aerobic and optional anaerobic bacillus. *E. coli* is a bacterium that belongs to the normal microbiota of the intestine, but in some cases can be pathogenic.

The effect of a probiotic species on the growth of a pathogenic bacteria could help to control and treat pathologies related to *E. coli*.

Objective.

Cultivate a culture of *L. reuteri* at different temperatures from a pharmacy preparation observing the variation in growth.

Study the variation in the growth of *E. coli* in coculture with *L. reuteri*.

Methodology.

The growth of *L. reuteri* at different temperatures (4, 20 and 37 °C) was analyzed. For this purpose, three bacterial growth curves were performed from the temperatures.

Two bacterial growth curves were performed to analyze the growth variation of *E. coli* compared to a coculture of *E. coli* plus *L. reuteri*.

Using the ComBase database for simulating growth curves.

Results.

L. reuteri cells grown at different temperatures had different growth curves, with higher growth at a temperature of 37 °C and less at 4 °C.

In the coculture of *E. coli* with *L. reuteri* there was a decrease in the growth of *E. coli* compared to the control of *E. coli* alone.

Conclusions.

The temperature of a culture has great importance on the growth of bacteria. The optimum temperature of growth was 37 °C, as expected.

L. reuteri has the ability to reduce the growth of some pathogenic bacteria such as *E. coli* in coculture.

Key Words.

L. reuteri, *E. coli*, Culture, Co-culture, Growth.

Introducción.

Los probióticos son un conjunto de microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, parece que confieren un beneficio para la salud del huésped (Hill, 2014).

Para que un microorganismo pueda ser considerado probiótico tiene que cumplir una serie de requisitos, entre los que se encuentran: estar correctamente identificado a nivel de género, especie, cepa, y mantener su viabilidad después del procesado; una vez identificada la cepa, ésta debe quedar registrada en una colección de cepas reconocidas; carecer de virulencia y posibilidad de generar efectos negativos sobre el consumidor; y debe estar demostrado científicamente mediante ensayos de doble ciego aleatorizados y controlados con placebo, comprobándose así los efectos beneficiosos.

La forma de actuación de cada microorganismo es diferente. Los probióticos actúan de forma beneficiosa sobre el lumen intestinal y sobre la mucosa intestinal.

En el lumen intestinal actúan mediante una interacción con la microbiota intestinal. Tienen importancia en el control de la composición de la microbiota favoreciendo o impidiendo la presencia de unos u otros microorganismos. La modificación de esta composición tiene efectos directos sobre la salud, es decir, una correcta composición de la microbiota favorece que se produzca un correcto funcionamiento del sistema inmune. Además, también tiene un efecto sobre el metabolismo ya que, en función de los microorganismos que se encuentren en el lumen intestinal, pueden producirse modificaciones en la absorción de algunos nutrientes o micronutrientes como vitaminas y minerales; también tiene la capacidad de poder producir cambios en la regulación y almacenamiento de energía.

En la mucosa intestinal, una correcta composición de la microbiota actúa mejorando la función de barrera, lo cual favorece una mejor defensa contra agresiones externas. También intervienen en la metabolización de algunos productos como hidratos de carbono.

Una correcta microbiota intestinal proporciona un efecto benéfico en el sistema inmunitario, ya que la mucosa intestinal es el lugar donde se realizan las respuestas inmunitarias contra las proteínas de la dieta regulando procesos de hipersensibilidad y los patógenos como algunas bacterias u hongos que puedan contener los alimentos. Promueven la producción de inmunoglobulinas y aumentan el número de linfocitos (Garrotea & Bonetb, 2017).

Dentro de estos probióticos se puede encontrar una gran variedad de microorganismos. Los más comunes pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El efecto beneficioso varía entre diferentes cepas de un mismo género. Así, también se puede encontrar como un probiótico común las cepas de *E. coli Nissle 1917* o *Saccharomyces boulardii* (Sánchez, Ruiz, & Morales, 2015).

El género *Lactobacillus* comparte una serie de características comunes: son bacterias ácido lácticas, formadoras de ácido láctico, gram positivas, microaerófilas y no formadoras de esporas. Dentro del género *Lactobacillus* se encuentran diferentes especies las cuales son consideradas probióticos, como, por ejemplo, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, y *L. rhamnosus* (Sulthana, Lakshmi, & Madempudi, 2019).

L. reuteri es una de las especies más utilizados como probiótico. Se aisló por primera vez en los años 60 del tracto intestinal del ser humano; posteriormente se encontró en otros animales, como cerdos y pollos, y en otros productos, como la leche o embutidos. El uso de *L. reuteri* no ha mostrado efectos adversos sobre la salud del consumidor, por lo que se considera que su consumo es seguro.

L. reuteri es una bacteria ácido-láctica hetero-fermentativa. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de entre 35 y 38°C, es capaz de multiplicarse en condiciones de anaerobiosis y también es capaz de crecer en pH entre 5 y 7,5.

Se han descrito numerosos beneficios derivados del consumo de *L. reuteri*. Es beneficioso en el tratamiento de trastornos funcionales digestivos, en enfermedades inflamatorias intestinales, en la infección por *Helicobacter pylori*, y en el tratamiento de la diarrea (Martín Cabrejas, 2017).

En pacientes con diarrea aguda suplementados con *L. reuteri*, se ha observado una reducción de la duración y la frecuencia de la diarrea; además, en pacientes que han necesitado hospitalización, la suplementación con *L. reuteri* redujo el tiempo de hospitalización (Patro-Gołąb & Szajewska, 2019).

En cuanto a los trastornos funcionales tras la suplementación de *L. reuteri*, se puede observar una reducción tanto de la intensidad del dolor como de la frecuencia con la que estos dolores se suceden (Buckley, Lacey, Doolan, Goodbody, & Seamans, 2018).

La suplementación con *L. reuteri* también se ha mostrado eficaz en la supresión de la infección por *H. pylori* reduciendo los síntomas gastrointestinales y obteniendo una mejoría en las patologías asociadas a ella, como puede ser la úlcera péptica, la gastritis crónica o el cáncer gástrico (Asare, y otros, 2018).

Además, tiene la capacidad de producción de sustancias antimicrobianas como la reutericina 6 (es una bacterocina que muestra una actividad bactericida) o la reuteriicina (es un ácido tetrámico que tiene una actividad bactericida y bacteriostática). La reuteriicina en general, solo afecta a bacterias gram positivas, no teniendo efecto sobre bacterias gram negativa.

La reuterina es un metabolito bacteriano producido por *L. reuteri*. Es una sustancia neutra, soluble en agua y de naturaleza aldehídica, con una capacidad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias gram positivas y gram negativas, levaduras, hongos y protozoos. Tiene efecto en valores de pH de 2 a 8 mostrándose más efectiva en valores de pH ácidos. Esta sustancia es producida por ciertas cepas de *L. reuteri* durante la fermentación anaerobia en glicerol. En esta fermentación uno de los compuestos que se produce es acroleína, que tiene capacidad antimicrobiana. Esta característica antimicrobiana tiene un potencial terapéutico para el tratamiento de infecciones, y también tiene poder para evitar la colonización de microorganismos perjudiciales para la salud (Asare, y otros, 2018).

Además de estas sustancias antimicrobianas, *L. reuteri* es capaz de crear biopelículas microbianas que tienen la capacidad de desempeñar funciones como degradación de compuestos tóxicos. También podría tener un efecto beneficioso sobre la microbiota humana, ya que la formación de estas

biopelículas microbianas podría impedir el desarrollo de microorganismos patógenos. Estas biopelículas son capaces de reducir el crecimiento de algunos microorganismos como *E. coli*, *L. monocytogenes* *Staphylococcus aureus* o *Salmonella enterica* (Speranza, Liso, Russo, & Corbo, 2020).

Escherichia coli. Bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo gram negativo, aerobio y anaerobio facultativo que puede presentar cápsula. Es muy resistente a la temperatura y agentes externos. Tiene la capacidad de crecer en temperaturas de 8°C a 46°C con un pH de 4,4 a 10 y con valores de actividad de agua de 0,95. Es una bacteria que pertenece a la microbiota intestinal normal, ya que se puede encontrar en el intestino pocas horas después del nacimiento. También se encuentran en animales como aves, cerdos, ovejas y vacas. Algunas de sus cepas son patógenas para el individuo. Entre estas cepas patógenas, se encuentra:

- *E.coli* enterotoxigénica.
- *E. coli* enterohemorrágica.
- *E. coli* enteroinvasiva.
- *E. coli* enteropatógena.
- *E. coli* enteroagregativa.
- *E. coli* de adherencia difusa.

Algunas de las patologías que pueden causar las cepas patógenas son: colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, cuadros de disentería y, de forma más común, diarreas. En ocasiones son diarreas graves acompañadas o no de sangre y con fiebre moderada. Los síntomas pueden aparecer dos o tres días después de la infección (Rodríguez-Angeles, 2002).

Justificación.

La resistencia de las bacterias a los antibióticos ha aumentado durante las últimas décadas a una gran velocidad llegando a ser un problema de salud pública a nivel mundial.

La resistencia a antibióticos está generando un aumento de bacterias patógenas que son resistentes a uno o múltiples antibióticos. Esto está produciendo el aumento de morbilidad y mortalidad de los pacientes contagiados por estas bacterias (Frieri, 2017).

De un total de 60 cepas diferentes de *E. coli* analizadas, el 100% se mostró resistente a la cefepima y un 74% se mostraron resistencia a cefalotina, aunque *E. coli* no mostró resistencia frente a otros antibióticos como doxiciclina (Raeispour, 2018).

En una muestra de 43 niños recién nacidos, los cuales padecían una infección por *E. coli*, el 67% de las cepas de *E. coli* mostraron resistencia con ampicilina y el 14% contra la gentamicina (Cole, 2019).

Objetivos.

Realizar un cultivo de *L. reuteri* recuperado a partir de un preparado de farmacia listo para el consumo, y comparar el crecimiento de éste tras la incubación a diferentes temperaturas.

Estudiar la variación en el crecimiento de *E. coli* en cocultivo con *L. reuteri* respecto un control de *E.coli* en solitario.

Material y métodos.

Diseño del estudio.

Se trata de un estudio experimental.

Recuperación de las bacterias.

Se partió de un preparado comercial de farmacia que contiene la cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. El fabricante indica que la concentración del microorganismo es de 10^8 UFC por cada 5 gotas del preparado.

Se añadieron 100 μ l del preparado comercial de *L. reuteri* a un tubo Eppendorf para, a continuación, realizar diluciones decimales. Para ello, se prepararon tubos Eppendorf que contenían 900 μ l de suero salino (previamente esterilizado a 121°C durante 20 min). En el primer tubo se añadieron 100 μ l de preparado comercial de *L. reuteri* y 900 μ l de suero salino, y se agitó en el vortex. En el segundo tubo se añadieron 100 μ l del tubo anterior y 900 μ l de suero salino, y se agitó en el vortex. Se repitió el proceso hasta realizar 8 diluciones.

Así, de esta forma, se redujo la concentración en la que se encuentran las bacterias para poder hacer el recuento posterior de las mismas.

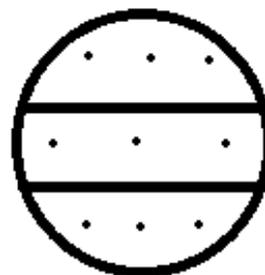
E. coli fue recuperada de un tubo presente en el laboratorio del departamento. El medio de cultivo utilizado fue caldo TSB más Agar añadido (TSB+A).

Siembra de las bacterias.

Una vez se realizaron las diluciones comenzó la siembra de la bacteria. La siembra se realizó sobre caldo MRS con Agar añadido (MRS+A) preparado anteriormente. Para realizarlo se añadieron 55 g de MRS y 20 g de agar en un litro de agua destilada, se disolvió con ayuda de calor y se autoclavó para esterilizarlo.

Para la siembra se usaron dos métodos diferentes:

- Siembra en gota sobre placas que contienen MRS+A. Para realizar esta siembra se marcaron tres espacios diferentes en cada placa y en cada uno de los espacios se sembraron tres gotas de 10 µl cada una correspondientes a una misma dilución. Se sembró desde el preparado comercial de *L. reuteri* sin diluir hasta la última de las 8



diluciones decimales de *L. reuteri* con suero salino realizadas anteriormente. Una vez realizada la siembra se dejó que se secasen las gotas y se introdujo en la estufa. Las placas permanecieron dentro de la estufa durante 24 horas a una temperatura de 37°C. Pasadas las 24 horas se extrajeron de la estufa y se mantuvieron en una cámara de refrigeración a 4°C para evitar exceso de crecimiento.

- Siembra por agotamiento sobre placas que contienen MRS+A. Se sembró por agotamiento directamente el preparado comercial de *L. reuteri* sobre la placa. Se introdujo en la estufa y se dejó crecer durante 24 horas a una temperatura de



37°C. Pasadas las 24 horas se extrajo de la estufa y se introdujo en una cámara de refrigeración a 4°C para evitar exceso de crecimiento.

El mismo procedimiento fue utilizado con *E. coli* utilizando TSB+A.

Aislamiento y conservación.

Tras el periodo de incubación se realizó el recuento de las colonias en las placas previamente sembradas mediante el método de siembra en gota. Posteriormente, se extrajo una colonia de *L. reuteri* de la placa de MRS+A sembrada por agotamiento. Esta colonia se sembró sobre caldo TSB con extracto de levadura añadido al 0,6% (TSB+EL) preparado con anterioridad: 30

g de TSB, 18 g de extracto de levadura y 1 litro de agua; se disolvió con ayuda de calor y se esterilizó en el autoclave.

Para la conservación de las bacterias, éstas se introdujeron en una mezcla que contenía 50% de TSB+EL más 50% de glicerol estéril. Se introdujeron en la cámara frigorífica a 4°C para su conservación.

Las colonias de *E. coli* fueron aisladas y conservadas de forma similar utilizando TSB+A.

Curva de crecimiento de las bacterias.

La curva de crecimiento bacteriana nos indica la variación del número de células microbianas de una población (log UFC/ml) por unidad de tiempo (horas)¹.

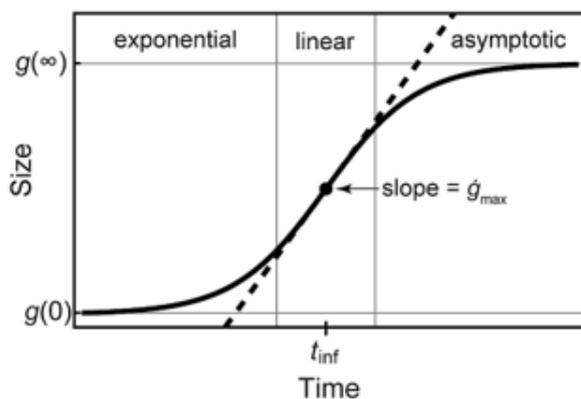


Imagen 1.

Esquema de la curva de crecimiento bacteriano

Se realizaron 5 curvas de crecimiento diferentes. Las curvas de crecimiento que se realizaron fueron sobre:

- *L. reuteri* incubado a 37°C.
- *L. reuteri* incubado a 20°C.
- *L. reuteri* incubado a 4°C.
- *E. coli* incubado a 37°C.
- *L. reuteri* en cocultivo junto a *E. coli* e incubados a 37°C.

¹ P. Myhrvold, Nathan (2015): *Three phases of growth in a typical sigmoidal curve*. PLOS ONE. Figure. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081917.g002>

Curva de crecimiento de *L. reuteri* a 37°C.

La confección de la curva se dividió en dos etapas, una primera en la que se midió el crecimiento desde 0 hasta las 8 horas, y una segunda etapa en la que se midió el crecimiento desde la hora 10 hasta la 18.

Primera etapa.

Para la primera etapa se realizó un cultivo al que se nombró como C1. A partir de una placa en la que *L. reuteri* fue sembrada por agotamiento, se obtuvo una colonia que fue sembrada en 2 ml de caldo TSB+EL.

Una vez sembrado se dejó crecer en la estufa a 37°C durante 24 horas.

Pasado el periodo de crecimiento de 24 horas se realizó una serie de 6 diluciones decimales.

Para la primera dilución se añadió 1 ml de TSB+EL con *L. reuteri* sobre 9 ml de suero salino. Para la segunda dilución decimal se añadió 1 ml de la dilución anterior sobre 9 ml de suero salino. Se repitió este proceso hasta conseguir las 6 diluciones decimales.

Una vez realizadas las 6 diluciones, se prepararon 9 tubos Eppendorf marcados desde la hora 0 hasta la hora 8 y en cada uno de ellos se añadió 1 ml de la última de las 6 diluciones decimales realizada anteriormente (población estimada de 10^3 UFC/ml, considerando que el cultivo en el caldo de cultivo a 37°C alcanza la población de 10^9 CFU/ml).

Una vez que todos fueron sembrados, se procedió de forma diferente según las horas de incubación:

- Tubo Eppendorf marcado con tiempo 0. Este tubo se sembró directamente para el recuento de las bacterias sin realizar incubación. La siembra en gota se realizó sobre una placa que contenía MRS+A a la que se añadieron 10 μ l por triplicado. Después de la siembra, la placa se incubó a 37°C.
- Tubos Eppendorf marcados con tiempos 1, 2 y 3. Estos tubos se incubaron a 37°C inmediatamente después de su siembra durante 1, 2, ó

3 horas. Tras la incubación, se realizaron 4 diluciones decimales de cada tubo para facilitar el posterior recuento. La primera de las diluciones contenía 100 µl de los tubos 1, 2 ó 3 y 900 µl de suero salino; la segunda dilución decimal contenía 100 µl de cada uno de los tubos anteriores y 900 µl de suero salino para cada uno de ellos, y así sucesivamente hasta realizar las 4 diluciones. Una vez realizadas, se marcaron 4 espacios en una placa de Petri con MRS+A, y en cada uno de ellos se sembraron alícuotas de 10 µl de cada una de las diluciones. Las placas se incubaron a 37°C.

- Tubos Eppendorf marcados con tiempos 4, 5, 6, 7, y 8. Estos tubos se incubaron a 37°C inmediatamente después de su siembra durante 4, 5, 6, 7 y 8 horas. Tras la incubación, se realizaron 7 diluciones decimales de cada uno de los tubos para facilitar el posterior recuento. La primera de las diluciones contenía 100 µl de los tubos 4, 5, 6, 7, y 8, y 900 µl de suero salino, la segunda dilución decimal contenía 100 µl de cada uno de los tubos anteriores y 900 µl de suero salino para cada uno de ellos, y así sucesivamente hasta realizar las 7 diluciones. Una vez realizadas, se marcaron 4 espacios en una placa con MRS+A, y en cada uno de ellos se sembraron las 4 últimas diluciones de las 7 realizadas (10 µl/siembra). Después de realizar las siembras, las placas se incubaron a 37°C.

Todas las siembras se realizaron por duplicado.

Una vez se terminó el proceso de incubación se procedió a realizar el recuento. Con este recuento finalizó la etapa 1 en la que se obtuvo la primera parte de la gráfica, desde la hora 0 a la hora 8.

Segunda etapa.

Para la segunda etapa se realizó un cultivo al que se nombró como C2. A partir de una placa en la que *L. reuteri* fue sembrada por agotamiento, se obtuvo una colonia que fue sembrada en 2 ml de caldo TSB+EL.

Una vez realizada la siembra, el tubo se introdujo en la incubadora durante 24 horas + 10 horas a una temperatura de 37°C.

Pasadas las 34 horas de crecimiento, se procedió a hacer una serie de 10 diluciones decimales tal y como se explicó anteriormente.

Una vez realizadas las diluciones decimales se prepararon 9 tubos Eppendorf marcados desde la hora 10 a la hora 18. A cada uno de los tubos se añadió 1 ml de la última de las diluciones realizadas.

Se incubaron todos los tubos a una temperatura de 37°C excepto el marcado con la hora 10, el cual fue sembrado directamente sobre una placa con MRS+A.

El resto de los tubos fueron sacados de la incubación cada uno con una diferencia de una hora y siguiendo el número marcado en ellos. A partir de estos tubos se realizaron series de 4 diluciones decimales siguiendo el procedimiento ya explicado.

Una vez realizadas las diluciones, se marcó una placa de MRS+A con 4 espacios diferentes y en cada espacio se sembró una de las 4 diluciones anteriores.

Para la siembra se usó el método de siembra con gota en el que se añadieron 3 gotas de 10 µl por cada una de las diluciones decimales preparadas. Estas diluciones facilitaron que se pudiera realizar un mejor recuento posterior. Todas las siembras se realizaron por duplicado.

Según se realizaba cada una de las siembras sobre las placas, éstas se introducían en la estufa para incubarlas a 37°C.

Posteriormente, se realizó el recuento de cada una de las placas sembradas.

Con esta segunda etapa se obtuvo la segunda parte de la gráfica de la hora 10 a la hora 18.

Ambos recuentos (primera más segunda etapas) se juntaron consiguiéndose una gráfica que mostraba el crecimiento bacteriano desde la hora 0 hasta la hora 18.

Curvas de crecimiento de *L. reuteri* incubado a 20 ó 4°C.

Se siguió el mismo protocolo experimental realizado en la incubación a 37°C. Las diluciones decimales realizadas y sembradas se ajustaron a las necesidades particulares de estas dos temperaturas, es decir, se redujo su número al esperarse un crecimiento más lento del microorganismo, especialmente a 4°C.

Curva de crecimiento de *E. coli* a 37°C.

Al igual que en las curvas de crecimiento anteriores (sobre todo aquellas a 37°C), se siguió el procedimiento de dividir la curva en dos etapas diferentes, una primera etapa desde la hora 0 hasta la hora 8 (denominada *E. coli* 1) y una segunda etapa desde la hora 10 hasta la hora 18 (denominada *E. coli* 2). Sin embargo, el agar utilizado para las siembras fue TSA+A.

Curvas de crecimiento del cocultivo de *L. reuteri* con *E. coli*.

Las curvas de crecimiento del cocultivo de *L. reuteri* y *E. coli* se realizaron a partir de la mezcla de una colonia de *L. reuteri* y otra de *E. coli* sembradas en 2 ml de caldo TSB+EL. Se realizó por duplicado.

Para realizar la curva de crecimiento se siguió un procedimiento similar al que se llevó a cabo en las curvas anteriores, dividiendo la curva de crecimiento en dos etapas.

Tras la incubación, los tubos fueron sembrados sobre placas de MRS+A que se incubaron a 37°C.

Una vez pasado el tiempo de incubación se realizó el recuento para realizar la curva de crecimiento de *E. coli* en cocultivo con *L. reuteri*.

NOTA: Dentro del método inicialmente planificado previa la pandemia de la Covid-19, se contemplaba el estudio de la diferenciación morfológica de las colonias de L. reuteri y E. coli sembrados en el mismo medio de cultivo (MRS+A). Dado que este medio de cultivo está indicado para la selección de bacterias ácido lácticas, la morfología de E. coli será mucho más débil con colonias mucho más pequeñas.

Búsqueda y simulación de curvas en ComBase.

Algunos aspectos de los planteados inicialmente no se pudieron llevar a cabo debido a la pandemia de la Covid-19. Las curvas de crecimiento bacteriano no se pudieron realizar, y en su lugar se usaron curvas de crecimiento bacteriano registradas en la plataforma ComBase, curvas registradas en otras publicaciones o curvas realizadas mediante simulación en ComBase.

Curva de crecimiento de *L.reuteri* a 37°C.

Para la obtención de la curva de crecimiento de *L. reuteri* a 37°C se realizó una búsqueda selectiva en publicaciones en las que había realizado una curva de crecimiento en condiciones similares a las planteadas.

Curva de crecimiento de *L.reuteri* a 20°C y 4°C.

Para la obtención de las curvas de crecimiento de *L. reuteri* a 20°C y 4°C se realizó una búsqueda selectiva en ComBase de curvas de crecimiento bacteriano, en condiciones lo más similares posibles a las que en un principio se plantearon. Se utilizaron curvas de crecimiento bacteriano de bacterias ácido-lácticas en condiciones de temperatura similares a las propuestas.

Para la búsqueda se introdujeron los filtros de **organismo**, en el que se introdujo “Bacteria ácido láctica”, **temperatura** de 4°C y 20°C respectivamente, **tipo de comida** “medio de cultivo” y un intervalo de valores de **pH** 5-6.

Curva de crecimiento de *E. coli* a 37°C.

La curva de *E. coli* se realizó mediante el simulador de crecimiento bacteriano de ComBase. Se introdujeron los valores que se muestran en la imagen 2.

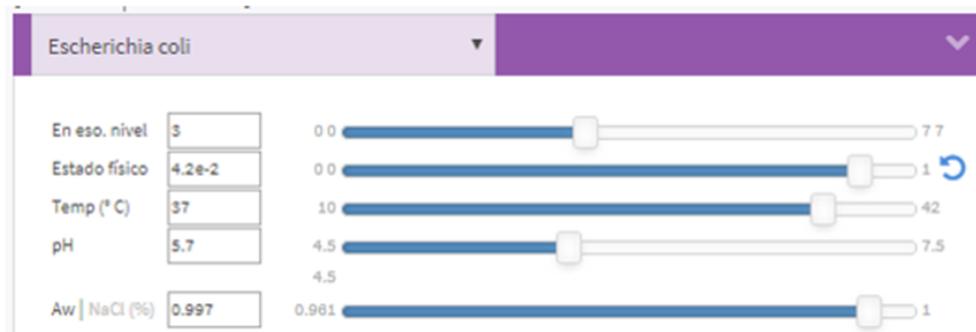


Imagen 2

Condiciones de simulación en ComBase para el cultivo de *E.coli*²

Curva de crecimiento del cocultivo.

Para la curva de crecimiento del cocultivo se realizó una búsqueda sobre publicaciones que relacionasen el crecimiento de *E. coli* en cocultivo con una bacteria ácido láctica, y que el cultivo se realizase con una temperatura de 37°C.

Con los datos de crecimiento de las publicaciones encontradas se realizó una curva de crecimiento en el programa ComBase.

² Imagen de elaboración propia a través del programa ComBase.

Resultados.

Curva de crecimiento de *L. reuteri*.

La curva de crecimiento bacteriano indica el crecimiento que presenta un sistema biológico. Primeramente, se produce un crecimiento de la masa celular que desencadena en un aumento de la multiplicación celular.

En las imágenes 3, 4 y 5 se muestra la curva de crecimiento bacteriano de *L. reuteri* a diferentes temperaturas controladas de 37, 20 y 4°C, respectivamente.

En todas las curvas de crecimiento bacteriano se observa que la bacteria tiene capacidad para desarrollar su crecimiento, aunque con diferencias en la velocidad y en el tiempo de desarrollo.

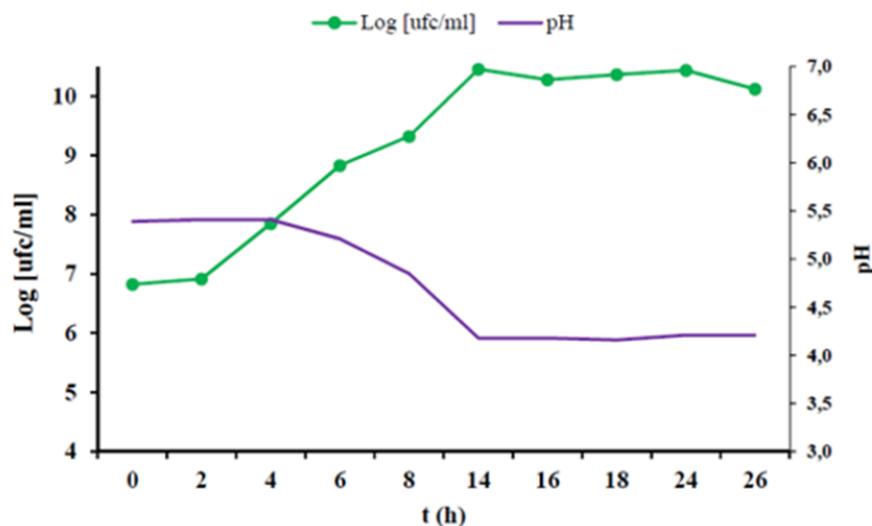


Imagen 3³.

Curva de crecimiento de *L. reuteri* a 37°C.

³ Lacunza Etayo, B. (2019). Puesta a punto de la metodología para la evaluación in vitro de la actividad prebiótica de ingredientes y extractos vegetales de aplicación industrial. Navarra: Universidad de Navarra. Obtenido de <https://academica-e.unavarra.es/handle/2454/33675>

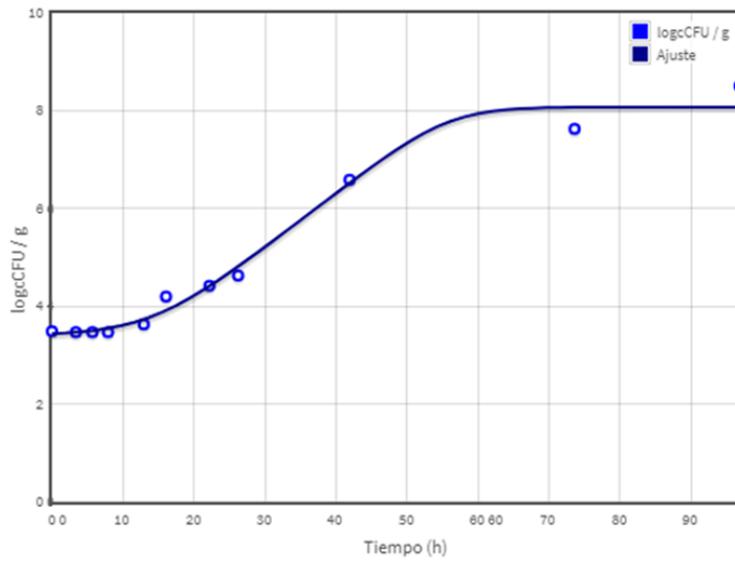


Imagen 4⁴.

Crecimiento bacteria ácido láctica a 20°C.

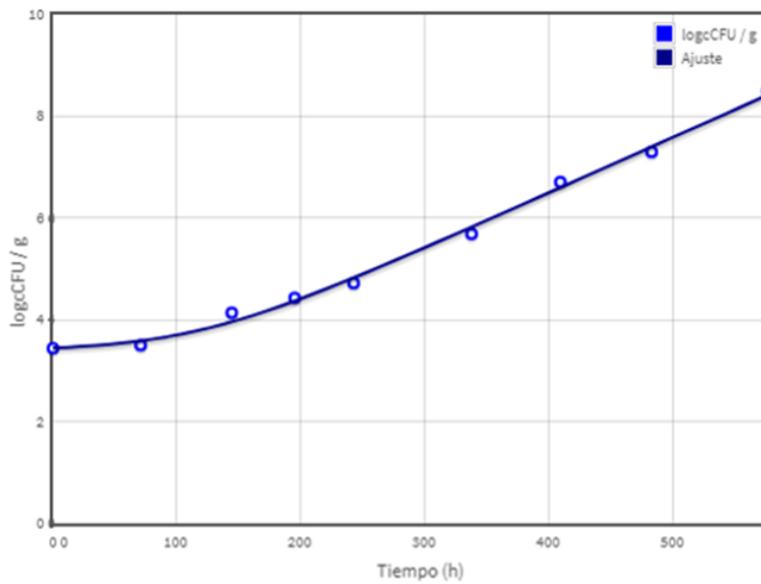


Imagen 5⁵.

Crecimiento bacteria ácido láctica a 4°C.

⁴ Imagen extraída de publicaciones en ComBase. ID de búsqueda L19 en ComBase.

⁵ Imagen extraída de publicaciones en ComBase. ID de búsqueda L163C2 en ComBase

Curvas de crecimiento *E. coli* y cocultivo.

La curva de *E. coli* se simuló a una temperatura de 37°C con un valor de pH inicial de 5.7 y una actividad de agua de 0.997 (Imagen 2).

E. coli tuvo gran capacidad de crecimiento en las condiciones en las que se simuló la curva.

La curva de crecimiento en el cocultivo (imagen 7) se realizó en condiciones similares a las que se llevó a cabo el cultivo de *E. coli* en solitario a una temperatura de 37°C durante 24 horas (imagen 6), modificando únicamente que en el cocultivo se añadió una bacteria ácido láctica. En un primer momento el cultivo se mantuvo en una fase estacionaria hasta la hora 10 en la que el cultivo empezó a decrecer.

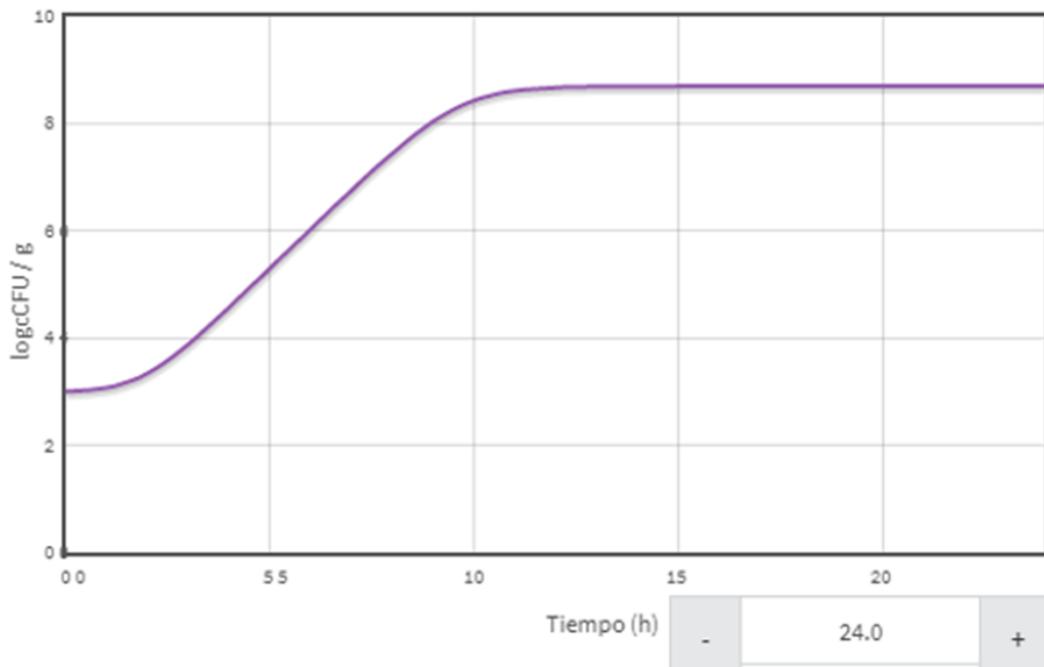


Imagen 6⁶.

Curva de crecimiento de *E. coli* a 37°C.

⁶ Elaboración propia a través de simulación en ComBase.

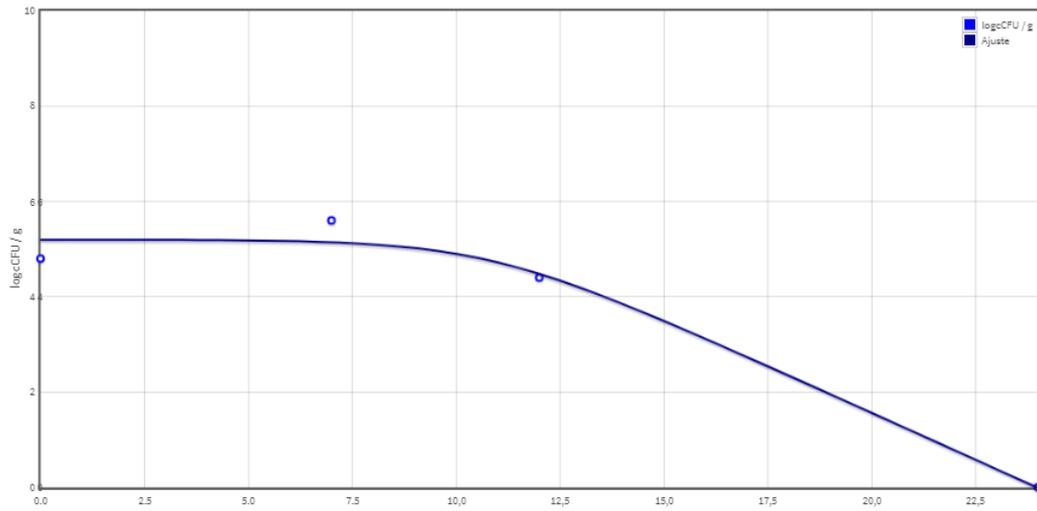


Imagen 7⁷.

Curva de crecimiento del cocultivo de *E.coli*

⁷ Curva de crecimiento elaborada en ComBase a través de los datos obtenidos de la publicación de Roldán, M. O.-W. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología., 31(1), 37-41. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000100008&lng=es&tlng=es

Discusión.

Crecimiento de *L. reuteri* a diferentes temperaturas.

El crecimiento bacteriano está afectado por diferentes factores, algunos de los cuales son la presencia o no de nutrientes, el pH del medio, la temperatura a la que se encuentra o el tiempo de crecimiento.

En los cultivos realizados con *L. reuteri* a diferentes temperaturas se observan diferencias tanto en las fases de crecimiento bacteriano como en los parámetros cinéticos.

Analizando las diferentes fases de crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas se observan diferencias en el tiempo que éstas tardan en producirse.

Fase de latencia. Es un período de transición que se da cuando un microorganismo es transferido a un medio diferente al que se encontraba y hasta que éste empieza a crecer. En este periodo no se da un incremento en el número de células, pero es un tiempo de gran actividad metabólica para favorecer el posterior crecimiento en el número de células en la fase exponencial.

Se observa, como indica la Tabla 1, que la fase de latencia tiene un periodo de duración mayor en el cultivo que se encontraba a menor temperatura, 4°C. El periodo de latencia se va reduciendo según se aumenta la temperatura teniendo un periodo menor el cultivo que se realizó a 37°C.

Fase de crecimiento exponencial o fase logarítmica. Fase en la que se da un crecimiento máximo del microorganismo. El microorganismo crece de forma exponencial, cada vez que transcurre un tiempo de generación la población se multiplica.

En la fase exponencial se observa la misma diferencia que en la fase de latencia. Esta fase comienza más tarde en el cultivo que se encuentra a una temperatura menor, 4°C, y se da antes en el cultivo que se encuentra a más temperatura, 37°C.

La fase exponencial tiene un periodo de duración mayor en el cultivo que se realizó a 4°C.

Fase estacionaria. El crecimiento comienza a reducirse ya sea por agotamiento de nutrientes esenciales, acumulación de productos tóxicos o porque se alcance un número elevado de células para el espacio disponible. En esta fase se produce un aplanamiento de la curva de crecimiento.

El cultivo realizado a 37°C alcanzó la fase estacionaria a partir de la hora 14 de cultivo, mientras que el resto de los cultivos, el de 20°C y 4°C, no llegaron a esta fase. Esta fase se habría dado en estos cultivos si el tiempo de análisis del crecimiento bacteriano hubiese sido mayor.

Fase de muerte. Se da cuando comienza una disminución del número de células viables y se produce una disminución de la población. Esta fase no se dio en ninguno de los cultivos, ya que no se prolongó lo suficiente como para conseguir la aparición de ella.

En cuanto a los parámetros cinéticos también se observan diferencias (Tabla 2).

Velocidad máxima de crecimiento. El cultivo que se realizó a una temperatura de 37°C mostró una velocidad máxima de crecimiento de 0,4. Esta fue superior a la mostrada por los otros cultivos: el que se cultivó a 20°C mostró una velocidad máxima de crecimiento de 0,11, y el que se encontraba a 4°C, de 0,01. Lo que muestra que la temperatura estaría relacionada con la velocidad máxima de crecimiento ya que según se reduce la temperatura también se reduce la velocidad máxima de crecimiento.

Tiempo requerido para llegar al máximo crecimiento. El cultivo que necesitó un menor tiempo para alcanzar el máximo crecimiento fue el cultivo que se realizó a 37°C, 4,5 horas. Los cultivos realizados a menor temperatura, 20°C y 4°C, necesitaron un tiempo mayor para alcanzarlo, siendo el de 4°C, con una gran diferencia, el que más tiempo necesitó para alcanzar este máximo crecimiento.

L. reuteri tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37°C, temperatura que se encuentra entre los valores óptimos dados por distintos autores (Martín Cabrejas, 2017).

Según el análisis sobre el crecimiento de una cepa de *Lactobacillus* realizado por otros autores (de la O, Camacho-Hernández, & Salgado-Brito, 2013) a 23, 29 y 37°C, encontraron que el mayor crecimiento se dio a 29°C, con unas diferencias no significativas respecto al crecimiento a 37°C; sí encontraron una diferencia respecto al crecimiento a 23°C, el cual fue inferior a los otros dos.

Por último, el estudio realizado por los autores (Reuben, Roy, & Sarkar, 2019) sobre el crecimiento de diferentes bacterias ácido lácticas (entre ellas *L. reuteri*) a diferentes temperaturas (4, 25, 37, 45 y 55°C) durante 24 horas en caldo MRS mostró que el crecimiento óptimo se produjo a 37°C. A 4 y 55°C se observó una reducción drástica en el crecimiento de los cultivos.

Crecimiento de *E. coli* en solitario y en cocultivo

La adición de una bacteria ácido láctica a un cultivo de *E. coli* dio como resultado una gran diferencia respecto al cultivo control de *E. coli*.

Se encontraron grandes diferencias en el tiempo necesario para alcanzar el máximo crecimiento, ya que *E. coli* en solitario alcanzó este punto en 1,89 horas, mientras que en el cocultivo tardó 10,77 horas. Entre ambos hubo una diferencia de 8,88 horas.

Además de encontrarse diferencias en el tiempo necesario para alcanzar la velocidad máxima de crecimiento, la velocidad es diferente entre ambos. En el cultivo de *E. coli* en solitario se encontró una velocidad de crecimiento de 0,737, mientras que en el cocultivo se encontró una velocidad negativa de -0,394, indicando que en lugar de producirse un aumento se produjo una disminución de la población de *E. coli*.

L. reuteri tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *E. coli*. (Fijan, 2018) realizó un estudio en el que se analizaba el efecto inhibitor de diferentes cepas de bacterias ácido lácticas de manera individual o en conjunto. Obtuvo como resultado que la bacteria ácido láctica que más efecto inhibitor mostraba frente a *E. coli* resultó ser una de cepa de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, con una reducción media de log 1,76 por encima de otras cepas como *Lactobacillus casei* *Shirota* que mostraron una reducción media de log 1,40.

Estos resultados se obtuvieron del recuento de diferentes cultivos realizados. Estos cultivos contenían 20 ml de leche bovina estéril, 500 µl de un cultivo con *E. coli* (lo que supone 10^7 - 10^8 UFC/ml) y 1 ml de un cultivo con la bacteria ácido láctica (lo que supone 10^7 - 10^8 UFC/ml).

Según (Van den Abbeele, 2016) que analizó el crecimiento y/o la supervivencia de *E. coli* en diferentes cocultivos con diferentes probióticos y prebióticos, las bacterias del género *Lactobacillus* tienen una gran capacidad para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Tan solo *L. mucosae* no mostró un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *E. coli*; por el contrario, *L. reuteri* fue la que más redujo el crecimiento *E. coli* respecto a su control. Para su realización se hicieron diferentes cultivos para cada uno de los probióticos por separado, añadiendo 15 ml de un medio nutricional y 5×10^6 UFC/ml tanto de *E. coli* como de *L. reuteri*. Se incubaron durante 24 horas a 37°C.

(Piatek, y otros, 2020) no realizaron cocultivos en su estudio, sino que evaluaron la capacidad de formación de un halo de inhibición de diferentes probióticos sobre bacterias patógenas. Para su realización se efectuaron cultivos con bacterias patógenas entre las que se encontraba *E. coli*. Se añadió *E. coli* sobre una placa con agar y se incubó durante 24 horas a 37°C. Por otro lado, se crearon cultivos con probióticos, uno de ellos con *L. reuteri*, añadiendo 10^6 UFC/ml de *L. reuteri* sobre MRS+A incubándose durante 48 horas. Pasada la incubación se recogieron trozos de ese agar de un tamaño de 10 mm de diámetro y se depositaron sobre el agar con la bacteria patógena. *L. reuteri* mostró un halo de inhibición de entre 6-7 mm que fue mayor respecto de otros probióticos como *L. rhamnosus*.

(Bertin, 2017) realizó diferentes cultivos de *L. reuteri* para conocer la capacidad de producir reuterina. *L. reuteri* fue capaz de producir reuterina (3-hidroxipropionaldehído, 3-HPA) en presencia de glicerol. Se realizaron diferentes cultivos para estudiar la supervivencia de *E. coli* O157:H7 en presencia de diferentes concentraciones de *L. reuteri* en presencia de diferentes cantidades de glicerol. Las concentraciones de *L. reuteri* utilizadas para los diferentes cultivos fueron de 10^5 , 10^6 , y 10^7 UFC/ml, así como concentraciones de glicerol de 20mM a 160 mM. La concentración de *E. coli* fue similar en todos los cultivos 10^4 UFC/ml. Los resultados mostraron que el crecimiento de *E. coli* fue inhibido

en aquellos cultivos con *L. reuteri* con una concentración de 10^7 UFC/ml. La inhibición fue mayor en aquellos cultivos que además de *L. reuteri* tenían glicerol. En los cultivos en los que se añadió *L. reuteri* más una cantidad igual o superior a 80 mM de glicerol se detectó una inhibición total de *E. coli* de manera independiente a la concentración inicial de *L. reuteri*.

Futuras fuentes de investigación.

Realizar además del cultivo de *E. coli* y el cocultivo de *E. coli* con *L. reuteri*, otro cocultivo que contenga *E. coli*, *L. reuteri* y glicerol, favoreciendo así la formación de reuterina por su efecto inhibidor de *E. coli*.

También realizar el ensayo con otros probióticos y mezclas de probióticos analizando cuál de ellos tiene un efecto mayor o si una combinación de varios probióticos tienen un efecto inhibitorio superior.

Limitaciones del estudio.

Al no haber sido posible realizar los cultivos para la realización de las diversas curvas de crecimiento de la cuales se habla en este estudio sería necesario llevar a la práctica todos estos estudios teóricos con la metodología propuesta, para comprobar que los resultados propuestos no distan de los resultados obtenidos si se hubiesen realizado estos cultivos.

Otra posible muestra de la limitación del estudio es la escasez de cultivos con los que se trabaja. Para un análisis mayor sería recomendable aumentar el número de muestras, así como evaluar el efecto de otro tipo de probióticos.

Conclusiones

El crecimiento bacteriano está afectado por diferentes factores, algunos de los de ellos son la presencia o no de nutrientes, el pH del medio, la temperatura a la que se encuentra o el tiempo de crecimiento.

1. La temperatura a la que se realiza un cultivo tiene una gran influencia sobre dicho cultivo y su evolución, modificando los parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano.
2. Las bacterias tienen una temperatura óptima de crecimiento. En el caso de *L. reuteri* ésta fue de 37°C. A esa temperatura, se va a observar el máximo crecimiento.
3. Las bacterias tienen también un rango de temperatura donde el crecimiento se producirá, aunque sea lento o no tan rápido como en el rango de temperatura óptima, llegando a temperaturas en las que no se produce crecimiento bacteriano.
4. La adición o modificación de un medio de cultivo puede tener efectos sobre el crecimiento de una bacteria. Un cultivo en unas condiciones similares al que únicamente se le añade un probiótico tiene la capacidad de modificar el crecimiento bacteriano.
5. *E. coli* es una bacteria capaz de crecer a una temperatura de 37°C con un valor de pH de 5,7.
6. El crecimiento de *E. coli* se ve inhibido cuando se realiza un cultivo de *E. coli* en presencia de *L. reuteri*.

Bibliografía

- Asare, P., Greppi, A., Stettler, M., Schwab, C., Stevens, M., & Lacroix, C. (4 de julio de 2018). Descontaminación de lechugas frescas mínimamente procesadas utilizando reuterina producida por *Lactobacillus reuteri*. *Fronteras en Microbiología.*, 9, 1421.
- Bertin, Y. H.-S.-D. (2017). *Lactobacillus reuteri* suppresses *E. coli* O157:H7 in bovine ruminal fluid: Toward a pre-slaughter strategy to improve food safety?. *PloS one*, 12(11). Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187229>
- Buckley, M., Lacey, S., Doolan, A., Goodbody, E., & Seamans, K. (7 de diciembre de 2018). El efecto de la suplementación de *Lactobacillus reuteri* en la infección por *Helicobacter pylori*: un estudio ciego controlado con placebo. *BMC nutrición*, 4, 48.
- Cole, B. K.-B. (2019). Antibiotic resistance and molecular characterization of bacteremia *Escherichia coli* isolates from newborns in the United States. *Cole, B. K., Ilikj, M., McCloskey, C. B., & Chavez-Bueno, S. (2019). Antibiotic resistance and molecular characterization of bacteremia Escherichia coli isolates froPloS one*, 14(7). Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219352>
- de la O, D. I.-Y.-B.-H.-L., Camacho-Hernández, I., & Salgado-Brito, R. (25 de septiembre de 2013). Formulation and optimization of an economic broth culture for *Lactobacillus* with probiotic potential isolated from pulque. *INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA MULTIDISCIPLINARIA*, 12. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es>
- Fijan, S. Š. (2018). Study of the In Vitro Antagonistic Activity of Various Single-Strain and Multi-Strain Probiotics against *Escherichia coli*. *International journal of environmental research and public health.*, 15(7), 1539. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/ijerph15071539>

- Frieri, M. K. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10 (4), 369-378. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Garrotea, A., & Bonetb, R. (Marzo de 2017). Probióticos. *Revista Farmacia Profesional*, 31(2), 13-16. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-probioticos-X0213932417608720>
- Hill, C. G. (2014). Declaración de consenso de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos sobre el alcance y el uso apropiado del término probiótico. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 506-514 (2014). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>. Obtenido de <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Lacunza Etayo, B. (2019). *Puesta a punto de la metodología para la evaluación in vitro de la actividad prebiótica de ingredientes y extractos vegetales de aplicación industrial*. Navarra: Universidad de Navarra. Obtenido de <https://academica-e.unavarra.es/handle/2454/33675>
- Martín Cabrejas, I. (2017). *Potencial probiótico de Lactobacillus reuteri y aplicación de la reuterina como bioconservante alimentario (Tesis doctoral)*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/42860/1/T38827.pdf>
- P. Myhrvold, N. (2015). Three phases of growth in a typical sigmoidal curve. *PLOS ONE*. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081917.g002>
- Patro-Gołąb, B., & Szajewska, H. (2019). Revisión sistemática con metaanálisis: Lactobacillus reuteri DSM 17938 para el tratamiento de la gastroenteritis aguda en niños. Una actualización. *Nutrientes*, 11(11), 2762. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/nu11112762>
- Piatek, J., Krauss, H., Ciechelska-Rybarczyk, A., Bernatek, M., Wojtyla-Buciora, P., & Sommermeyer, H. (2020). Inhibición del crecimiento in vitro de patógenos bacterianos por probióticos y un sinbiótico: la composición del producto importa. *En t. J. Environ. Res. Salud Pública*, 17, 3332.

- Raeispour, M. &. (2018). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic Escherichia coli strains. *Antimicrobial resistance and infection control.*, 7, 118. Obtenido de <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0411-4>
- Reuben, R., Roy, P., & Sarkar, S. y. (2019). Aislamiento, caracterización y evaluación de bacterias del ácido láctico para su selección como probióticos avícolas. *BMC Microbiol*, 19, 253. Obtenido de <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1626-0>
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475. Recuperado el 06 de abril de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es&tlng=pt.
- Roldán, M. O.-W. (2017). Efecto inhibitor de Lactobacillus casei 206/1 contra Escherichia coli O157:H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.*, 31(1), 37-41. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000100008&lng=es&tlng=es
- Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Sánchez, María Teresa, Ruiz, María Adolfina, & Morales, María Encarnación. (2015). Microorganismos probióticos y salud. *Sánchez, María Teresa, Ruiz, María Adolfina, & Morales, María Encarnación. (2015). Microorganismos probióticos y salud. Ars Pharmaceutica (Internet)*, 56(1), 45-59. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.4321/S2340-98942015000100007>
- Speranza, B., Liso, A., Russo, V., & Corbo, M. (25 de enero de 2020). Evaluación del potencial de formación de biopelículas de Bifidobacterium longum subsp. infantis y Lactobacillus reuteri como agentes de biocontrol competitivos contra bacterias patógenas y de descomposición de alimentos. *Microorganismos*, 8(2), 177.
- Spinler, J. K. (2008). Human-derived probiotic Lactobacillus reuteri demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial

pathogens. *Anaerobe*, 14(3), 166-171. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.02.001>

- Sulthana, A., Lakshmi, S., & Madempudi, R. (Diciembre de 2019). Proyecto de genoma de alta calidad y caracterización de cepas de *Lactobacillus* probióticas comercialmente potentes. *Genomics Inform*, 17(4), 43. doi:Sulthana A, SG Lakshmi, Madempudi RS. Proyecto de genoma de alta calidad y caracterización de cepas de *Lactobacillus* probióticas comercialmente potentes. *Genomics Inform* . 2019 dic; 17 (4) : e43 . doi: 10.5808
- Tzortzis, G. B. (2004). Modulation of anti-pathogenic activity in canine-derived *Lactobacillus* species by carbohydrate growth substrate. *Journal of applied microbiology.*, 96(3), 552-559. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02172.x>
- Van den Abbeele, P. M. (2016). Arabinoxylans, inulin and *Lactobacillus reuteri* 1063 repress the adherent-invasive *Escherichia coli* from mucus in a mucosa-comprising gut model. *NPJ biofilms and microbiomes*, 2, 16016. Obtenido de <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.16>

Anexos

Temperatura	Latencia	Exponencial	Estacionaria
37°C	0 – 4,5 horas	4,5 - 14 horas	14
20°C	0 – 14,4 horas	14,4 - 60 horas	60
4°C	0 - 120 horas	120	-

Tabla 1. Fases de crecimiento. Bacterias ácido-lácticas.

Temperatura	Valor inicial (Log UFC/ml)	Velocidad máxima de crecimiento (h ⁻¹)	Tiempo requerido para máximo crecimiento (horas)
37°C	6,27	0,40	4,5
20°C	3,44	0,11	14,4
4°C	3,44	0,01	120

Tabla 2. Parámetros cinéticos. Bacterias ácido-lácticas.

Parámetros	Tiempo requerido para máximo crecimiento	Velocidad máxima de crecimiento
Cultivo de <i>E.coli</i>	1.89 horas	0.737
Cocultivo	10.77 horas	-0.394

Tabla 3. Parámetros cinéticos. Cultivo de *E. coli* y cocultivo.