

PRUEBAS *IN VITRO* DE UN SELLADOR POST-ORDEÑO CON BACTERIOCINAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA PREVENIR MASTITIS

Villarreal Prieto J.M.^a, Díaz León M.A.^a, Torres Salazar J.E.^a, Valencia Castro C.M.,
Linaje Treviño M.S.^a, Barboza Corona J.E.^b, De la Fuente Salcido N.M.^a

a) Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, S.S.
Bioprospección y Bioprocesos. Boulevard Torreón-Matamoros Km. 7.5, Ciudad
Universitaria. C.P. 27104. Torreón, Coahuila, México.

b) Universidad de Guanajuato, División Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos,
Campus Irapuato-Salamanca, Irapuato, Guanajuato, 36500, México.

jv48032002@yahoo.com.mx; normapbr322@hotmail.com

RESUMEN

La mastitis se considera la enfermedad más costosa que afecta a la industria lechera. Muchas estrategias implican el uso de antibióticos para prevenir y tratar esta enfermedad, mismos que generan cepas multi-resistentes a antibióticos. La exigencia de reducir los trazas de antibióticos en los alimenticios de origen animal ha llevado a los investigadores a desarrollar tratamientos y productos antimicrobianos alternativos que contengan péptidos antimicrobianos (bacteriocinas). En este estudio preliminar se formuló un sellador post-ordeña con dos concentraciones de bacteriocinas (0.1 y 0.5%) producidas por *B. thuringiensis*. Se realizaron bioensayos de inhibición *in vitro* contra bacterias grampositivas y gramnegativas, determinándose la viscosidad (250 ctp) y adherencia del producto final. Los resultados revelan eficacia del sellador contra agentes causales la mastitis como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Str. agalactiae* en ambas concentraciones ensayadas. El producto tiene además un efecto inhibitorio contra otros patógenos de importancia clínica para la salud en vacas (*Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*). La siguiente etapa experimental conduce a pruebas de la eficiencia del sellador aplicándolo en vacas después de la ordeña en establos lecheros de la Comarca Lagunera para confirmar *in vivo* que su aplicación puede ser un innovador tratamiento alternativo y eficaz para prevenir la mastitis.

ABSTRACT

Mastitis is considered the most costly disease affecting the dairy industry. Many strategies involve the use of antibiotics to prevent and treat this disease and generate multiresistant strains. The requirement to reduce traces of antibiotics in animal food has prompted researchers to develop alternative antimicrobial treatments containing antimicrobial peptides (bacteriocins). In this preliminary study, a post-milking sealant bacteriocins (concentrations 0.1 and 0.5 %) produced by *B. thuringiensis* was formulated. Inhibition *in vitro* bioassays against Gram-positive and Gram-negative bacteria, the viscosity (250 ctp) and adherence of the final product were determined. The results show effective sealant against the mastitis causing agents such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Str. agalactiae* in both tested concentrations. The product also has an inhibitory effect against other pathogens of clinical importance for health in cows (*Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*). The next step leads to experimental evidence of the efficiency of applying sealant cows after milking

on dairy farms of Comarca Lagunera *in vivo* to confirm that the application can be an innovative and effective alternative to prevent mastitis treatment.

Palabras clave: Bacteriocinas, Sellador, Mastitis.

Área: Microbiología y Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina reconocida como la inflamación de la glándula mamaria causada por infecciones bacterianas que causa serios problemas de salud animal y económico porque afecta directamente la producción y la calidad de la leche en hatos distribuidos en todo el mundo (Nascimento *et al.*, 2005). La mastitis causa daños en el epitelio glandular y posterior inflamación clínica o subclínica (Pinzón *et al.*, 2009). Además, el uso excesivo de tratamientos con antibióticos en las vacas, ha desarrollado innumerables bacterias multirresistentes (Davies and Davies, 2010). Se han reportado diversos factores causantes de la mastitis bovina, pero todos coinciden en la urgente necesidad de aplicar programas preventivos y de control efectivos contra esta enfermedad (Olde Riekerink, *et al.*, 2010). Los péptidos antimicrobianos como las bacteriocinas se han considerado como una opción viable para el control de mastitis (Guanine *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2011), y con la ventaja de no generar resistencia bacteriana. El propósito de este trabajo fue determinar la eficacia de un bioproducto con bacteriocinas de *B. thuringiensis* y probar su actividad *in vitro* contra diversos patógenos y determinar la viabilidad para aplicarse posteriormente como un sellador de barrera para prevenir la mastitis en ganado vacuno en la Comarca Lagunera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos utilizados. Todos los cultivos microbianos utilizados en este estudio se crecieron en caldo óptimo para su desarrollo toda la noche a 28 o 37°C en agitación a 200 rpm. Se resembraron en el mismo caldo bajo iguales condiciones por 2 h (1×10^8 - 10^9 cel/mL). De cada cultivo se tomaron 105 μ L por 15 mL de agar de pozos (AP) y se plaqueó por duplicado, se realizaron siete pozos de 8 mm de diámetro en cada caja para la difusión en pozos de las muestras del sellador.

Producto sellador.

Se formuló el sellador utilizando un polímero vinílico ramificado e hidrosoluble, con excelentes propiedades humectantes y forma fácilmente una película de acuerdo a la temperatura de transición vítrea (T_g) formando una pseudotransición termodinámica en este material vítreo (Forest *et al.*, 1996). Se agregó un polisacárido de origen microbiano o goma como coadyuvante en desarrollar la

viscosidad de la película cuya función es proporcionar un revestimiento que impacte en el sellado del esfínter del pezón (teta) que queda abierto después de la ordeña. Se adicionó un 10% de propanotriol como emoliente para evita la irritación de la teta, protegiendo la ubre en los bovinos, y se agregó también un alquifénol que actúa como humectante y desinfectante. Se adicionaron las cinco bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis* denominadas Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina (Barboza-Corona *et al.*, 2007) en dos concentraciones (0.1 y 0.5%). Se realizaron pruebas preliminares con diez bacterias Grampositivas y Gramnegativas. Posteriormente se realizaron las pruebas por difusión en pozos con cada componente del producto sellador.

Finalmente se formuló el sellador de barrera tomando en cuenta las concentraciones preliminares de bacteriocina y de cada uno de los componentes utilizados y los resultados de las pruebas preliminares.

Se determinó la viscosidad (centipoises) del producto final en un viscosímetro Brookfield con una aguja del número 2 a una velocidad de 60 rpm. Además se realizó una prueba empírica que confirma la formación de una película por el sellador y al mismo tiempo la adherencia que evita el escurrimiento del producto (máximo 2 gotas). La prueba se realizó sumergiendo un tubo de ensayo (3 cm) en el recipiente contenedor del producto, se retiró inmediatamente y se verifica en la punta del tubo de ensayo la caída o goteo del sellador y la película que permanece en el tubo.

Pruebas in vitro.

Se realizaron por difusión en pozos los ensayos para evaluar la actividad antimicrobiana del sellador formulado con dos concentraciones de cada bacteriocina. En cada caja con cada cultivo bacteriano se depositó en cada pocillo 100 µL del sellador y un control de cada bacteriocina.

Las placas se incubaron a 4°C toda la noche y posteriormente 24 horas a la temperatura óptima de crecimiento de cada bacteria (28 o 37°C). Se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de cada pocillo y determinando la actividad antibacteriana en unidades arbitrarias (Barboza-Corona *et al.*, 2007).

RESULTADOS

Se confirmó la formación de la película, representado gráficamente con la gota que permanece en el tubo de ensayo (Fig.1) que indica la cantidad de sellador que va a permanecer en el esfínter, se confirma la adherencia y además mínimo escurrimiento (Santiago, 2012). Esta sencilla prueba confirma además que la cantidad de goma agregada cumple la función de incrementar la viscosidad en el producto, indicando propiedades fisicoquímicas estables (Rios *et al.*, 2012). En el producto sellador obtenido registró una viscosidad de 250 ctp.



Figura 1. Confirmación de la formación de la película y adherencia del producto sellador post-ordeña con una viscosidad de 250 ctp determinada con aguja No 2 del viscosímetro (Broockfield).

Pruebas *in vitro*

La primera serie de bioensayos por difusión en pozos realizados contra bacterias mostró un efecto inhibitorio contra diversas cepas grampositivas como *Bacillus cereus* 183, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Streptococcus pyogenes*, y contra gramnegativos como *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* NIMA. Destaca la actividad del sellador contra *S. aureus* (450 U/mL) y *Str. agalactiae* (1040 U/mL) bacterias reconocidas por encontrarse asociadas a infecciones de mastitis y contra la primera bacteria ya se había probado un efecto inhibitorio importante en 100 cepas del estafilococo aisladas de hatos lecheros de Michoacán, con probada resistencia a los antibióticos (Barboza-Corona *et al.*, 2009).

Tabla I. Prueba preliminar de la efectividad *in vitro* del sellador contra bacterias indicadoras.

Cepa indicadora	BIOTRATAMIENTOS														
	MORRICINA		KURSTACINA		KENYACINA		ENTOMOCINA		TOLWORTHCINA		SELLADOR		CONTROL		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
<i>Bacillus cereus</i> 183	820	820	820	820	630	450	450	280	280	450	450	450	450	2640	3300
<i>Staphylococcus aureus</i>	280	280	280	280	280	280	280	280	450	280	450	450	1770	1510	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	630	630	1040	820	1040	450	630	630	630	820	820	1040	2640	4810	
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	2640	2640	2040	2640	2040	1510	2330	1260	2640	2960	3650	4020	4410	4810	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	280	280	280	450	450	280	280	450	450	280	450	630	2040	1770	
<i>Shigella flexneri</i>	2040	2040	2040	2330	1510	2040	2330	2040	2040	2040	2040	2040	4020	2960	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	630	630	1040	820	1040	450	630	630	630	820	820	1040	2640	4810	
<i>Proteus vulgaris</i>	1510	1770	1510	1770	1510	2040	1260	1510	2640	2040	1040	2330	4020	4410	
<i>Salmonella typhimurium</i>	450	280	450	280	280	280	450	280	450	280	450	450	4020	1040	
<i>Serratia marcescens</i> NIMA	1040	1040	1040	1040	820	1040	1040	1040	820	820	1770	1510	6570	6570	

El sellador se preparó con una segunda fórmula modificando la cantidad del alquilfenol pues al realizar una prueba de calidad de cada componente del sellador

por difusión en pozos contra las cepas indicadoras se observó que ejercía un efecto inhibitorio contra *K. pneumoniae* y *S. typhimurium*. No obstante que la inhibición de estas bacterias gramnegativas fue mínima, era necesario reducir la cantidad del componente, pero sin afectar la propiedad particular como humectante que le confiere al sellador.

Con la nueva formulación se realizaron los bioensayos *in vitro* contra un mayor número de bacterias, observándose una mayor actividad inhibitoria no solo contra las bacterias causantes de mastitis *S. aureus* (2 040 U/mL) y *Str. agalactiae* (2 770 U/mL), incluyendo *Str. uberis* (1 040 U/mL), si no además contra la mayoría de las bacterias ensayadas.

Tabla II. Prueba de la efectividad *in vitro* del sellador contra bacterias indicadoras.

BIOTRATAMIENTOS													
	MORRICINA		KURSTACINA		KENYACINA		ENTOMOCINA		TOLWORTHCINA		SELLADOR		CONTROL
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Grampositivas													
<i>Bacillus cereus</i> 183	2170	2170	2170	2170	2170	2240	1970	2170	2280	2170	2170	2170	3690
<i>Staphylococcus aureus</i>	1770	1770	1770	1770	1770	1770	1510	2040	1770	1770	1770	1770	3650
<i>Staphylococcus xylosum</i>	2240	1390	2640	1410	1950	1640	2080	1640	2580	2040	3090	2040	3080
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2210	2770	2500	2580	2500	2410	2210	2110	3090	2280	2580	2280	3970
<i>Streptococcus uberis</i>	950	950	1040	1070	1040	1040	730	750	840	1040	840	950	2340
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	2040	1640	1650	1410	1690	1300	1430	1650	1410	1410	1410	1520	3220
<i>Micrococcus luteus</i>	2640	2040	2330	2040	2330	2040	2040	2040	2330	2040	2040	2040	5220
<i>Lactococcus lactis</i>	820	1040	1040	630	630	630	1040	450	1040	630	1040	630	3660
Gramnegativas													
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	770	770	860	770	860	770	660	770	750	770	900	770	2680
<i>Salmonella typhimurium</i>	2040	2640	2490	2640	2330	1920	2710	1920	2340	2040	2040	2040	4130
<i>Shigella flexneri</i>	1690	3780	1650	3430	1650	3850	1910	3780	1650	4690	1780	3990	3080
<i>Serratia marcescens</i> NIMA	2240	2000	2110	1195	2000	1840	1950	1950	2000	1730	1730	1730	3430
<i>Proteus vulgaris</i>	2040	2040	2040	2040	2040	2040	2040	2040	2040	2040	1770	2040	4810
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2900	2540	3580	2410	3290	2580	3500	2210	3160	2540	2930	2240	3610
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1770	1390	1910	1510	1520	1150	1410	1260	1390	1150	1510	1260	3060

DISCUSIÓN

El sellador formulado muestra las características de un sellador comercial post-ordeña, con una viscosidad adecuada (250 ctp) y estabilidad fisicoquímica necesaria para impedir pérdidas por escurrimiento (Rios *et al.*, 2012), requerimientos indispensables para cubrir y proteger el pezón con una película viscosa que desinfecte y a la vez inhiba el crecimiento de bacterias causantes de infecciones externas después de cada ordeña.

Los resultados de los bioensayos mostraron la efectividad contra bacterias no solamente causantes de mastitis, si no además contra bacterias de importancia en la salud de ganado bovino (Rios *et al.*, 2013). Los resultados son prometedores para desarrollar posteriores estrategias para impedir la entrada de gérmenes patógenos

en el pezón, particularmente en el esfínter del pezón de las vacas que tras la ordeña permanece abierto.

Las bacteriocinas Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina son péptidos antimicrobianos que no generan resistencia bacteriana (Davis and Davies,), pero si mostraron un efecto inhibitorio importante contra los patógenos ensayados, y por lo anterior el sellador se puede considerar para utilizarse en posteriores ensayos *in vivo* en vacas establos de la Comarca Lagunera.

BIBLIOGRAFÍA

Barboza-Corona JE, De la Fuente-Salcido N, Alva-Murillo N, Ochoa- Zarzosa A, Lopez-Meza JE. 2009. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 138: 179–183.

Barboza-Corona JE, Vázquez-Acosta H, Bideshi D, Salcedo-Hernández R. 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology* 187: 117–126.

Davies J, Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 74(3): 417.

De la Fuente-Salcido NM, Casados-Vázquez LE, Barboza-Corona JE. (2013). Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. *Canadian Journal of Microbiology*, 59: 515-522.

Dellinghausen C, Tondo C. 2007. Xanthan synthesized by strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: production, viscosity and chemical composition. *Bioscience* 23 (4): 67-73.

Forrest JA, Dalnoki-Veress K, Stevens JR, Dutcher JR. 1996. Effect of Free Surfaces on the Glass Transition Temperature of Thin Polymer Films. *Physical Review Letters* 77(10): 64-70.

Guinane CM, Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2008. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology* 98(6):1316-1325.

Nascimento J dos S, Fagundes PC, de P Brito MAV, K. dos Santos RN, de F. Bastos M do C. 2005. Production of bacteriocin by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 106: 61-71.

Olde Riekerinka RGM, Barkemab HW, Schollic DT, Poolea DE, Keltond DF. 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine* 97: 20 -28.

Pinzón A, Moreno FC, Rodríguez G. 2009. Efectos de la mastitis subclínica en algunos hatos de la cuenca lechera del alto Chicamocha (Departamento de Boyacá). *Revista Medica Veterinaria* 17: 1-35.

Ríos RS, Ramos NA, Vranic ML, Farías ME. 2013. Desarrollo de un Sellador Post-Ordeño con Goma Espina Corona. *Información Tecnológica* 24(2): 31-36.