

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS OBTENIDAS A PARTIR DE LECHE DE CABRA

Hernández-Saldaña O F^a, De la Fuente-Salcido N M^b, Valencia-Posadas M^a, Barboza-Corona J E^a

^a Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, Laboratorio de biotecnología y microbiología molecular. Ex-Hacienda El Copal km. 9, carretera Irapuato-Silao; A.P. 311, C.P: 36500, Irapuato, Gto. México. Correo electrónico: akbal_732@hotmail.com, josebar@ugto.mx.

^b Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, S.S. Bioprospección y Bioprocesos. Boulevard Torreón-Matamoros Km. 7.5, Ciudad Universitaria Campus Torreón. C.P. 27104. Torreón, Coahuila, México. Correo electrónico: normapbr322@hotmail.com

RESUMEN:

La leche de cabra es una de las leches más consumida en el mundo, en su mayoría de forma fluida, siendo esta, una fuente importante de organismos probióticos y posiblemente de microorganismos generadores de péptidos antimicrobianos. Sin embargo actualmente existe poca investigación al respecto, por lo que en este trabajo se aislaron cepas procedentes de la leche de cabra y se identificaron fisiológica y bioquímicamente, para después probar su capacidad antibacteriana contra bacterias patógenas de interés en las **Áreas** de inocuidad alimentaria y salud, tal como *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*, así como *Escherichia coli*. Además se realizó una identificación molecular por PCR para detectar los tipos de genes que sintetizan las bacteriocinas.

ABSTRACT:

Goat's milk is estimated to be one of the most consumed milk in the world, mainly in a liquid form, being it an important source of probiotic organisms and probably of microorganisms that synthesise antimicrobial peptides. However, to date there is little research on the matter, and in this work we focus our effort in the isolation and identification of different bacterial strains from goat milk. Also the antibacterial activity of the strains was tested against pathogenic bacteria of interest in several **Áreas** as food protection and health, such as *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. In addition, a molecular identification by PCR was carried out in order to detect the genes that encoded the bacteriocins.

Palabras clave:

Leche de cabra, bacterias ácido-lácticas, bacteriocinas

Área: Lácteos

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos presentes en la leche han sido ampliamente utilizados en los alimentos por su acción probiótica y conservadora (Campos 2011). Su acción conservadora se debe a la inhibición de un gran número de agentes patógenos y dañinos sintetizados como productos finales de la fermentación, como el ácido

láctico o el acético, también peróxido de hidrogeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios producidos por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrogeno y tiocinato (Shirai et al., 1996). La actividad de algunos compuestos se ha asociado directamente a la producción de péptidos antimicrobianos como las bacteriocinas, producidas particularmente por bacterias ácido lácticas y cuyo interés actualmente se centra en su estatus QPS (Qualified Presumption of safety), es decir, son consideradas como microorganismos seguros para la salud (Drider et al., 2006).

Los péptidos antimicrobianos son una familia de sustancias polifacéticas con complejos mecanismos de acción relacionados con la interacción con el patógeno a través de su membrana, o afectando blancos internos como la síntesis de DNA, RNA o proteínas (Téllez and Castaño, 2010). Existen además estudios enfocados en el uso de los péptidos antimicrobianos como conservadores en los alimentos, presentando ventajas como que su utilización permitiría la sustitución de aditivos químicos de síntesis por otros naturales y que debido a su resistencia al calor, acidez y baja aw pueden ser usados para incrementar la vida útil de alimentos comerciales (Hernández, 2010).

Esta investigación se diseñó para aislar de leche de cabras cepas ácido lácticas e identificarlas microbiológicamente y molecularmente, además de determinar su capacidad de producir péptidos antimicrobianos que puedan aplicarse en el control de diversas bacterias patógenas de importancia en inocuidad de alimentos y salud pública.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de Bacterias ácido lácticas (BAL)

Usando técnica de siembra por extensión se realizó un cultivo microbiológico de la muestra de leche de cabra recolectada en cantidades de 10, 100 y 200 µl en medio sólido MRS (Man, Rogosa y Sharpe), MRS enriquecido con glucosa y MRS enriquecido con lactosa, así como medio sólido de leche peptonizada, dejando incubar por 72 h a 37°C en condiciones de micro-aerobiosis y anaerobiosis. Las cepas aisladas se identificaron fisiológicamente por pruebas de morfología colonial y celular y tinción de Gram, así como de forma bioquímica por actividad de catalasa y oxidasa, fermentación de azúcares y producción de gas, producción de CO₂ de Glucosa, desaminación y descarboxilación de aminoácidos e hidrólisis de citrato.

Evaluación de la capacidad antibacteriana

Las cepas del cultivo microbiológico fueron sometidas a comprobar actividad antibacteriana contra bacterias Gram (+) positivas como *Bacillus cereus* 183, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus*, así como contra la bacteria Gram (-) negativa *Escherichia coli*, como bacterias indicadoras en medio sólido MRS, sembrando las cepas sobre el medio por técnica de rayado y permitiendo una incubación de una noche a 28°C y subsecuentemente adicionando 15 ml de agar de soya tripticasa (TSB) o agar MRS conteniendo 0.7 % (p/v) de agar y 10⁵ µL (1 x 10⁹ cél/mL) sobre la superficie del medio, para incubar nuevamente por 24 h a una temperatura de 28°C. La actividad

antibacteriana fue detectada por medio la formación de halos alrededor de las cepas productoras de péptidos antimicrobianos (Barboza-Corona *et al.*, 2007).

Identificación molecular por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó 1 mL del cultivo crecido toda la noche para ser centrifugado a 13000 rpm por 4 minutos, decantando y resuspendiendo la pastilla en 150 µl de agua destilada estéril, congelando después a -70°C por 30 minutos para luego hervir a 100°C y centrifugar nuevamente 4 minutos a 13000 rpm, conservando el sobrenadante que contiene el DNA extraído.

Estas cepas se analizaron por técnica de PCR para lograr la identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S, usando como controles tres cepas, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 19435, *Enterococcus faecium* UQ1 y *Pediococcus acidilactici*. Se utilizaron los oligonucleótidos genéricos para identificación de bacterias y/o arqueas denominados UBF y 1492 cuyas secuencias son para UBF F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3' y 1492 R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (León-Galvan *et al.*, 2009). Las condiciones para la amplificación incluyeron 5 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 58°C y 90s a 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C en un termociclador C1000™ Touch (Bio-Rad). Se verificó la amplificación por electroforesis (90 V) en geles de agarosa al 1% (p/v) detectando las bandas teñidas con bromuro de etidio.

Identificación de los genes productores de bacteriocina por PCR

Usando oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes de nisina, enterocina y pediocina (Tabla 1) se llevó a cabo un PCR multiplex utilizando el mismo DNA molde extraído para la identificación genérica y las mismas condiciones en termociclador. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (90 Volts) utilizando un marcador de peso molecular de DNA 1 Kb (Invitrogen). Las bandas del gel se cortaron y se purificaron con un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) para su posterior secuenciación en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), en Irapuato, Guanajuato.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificación por PCR múltiplex

Gen	Orientación	Secuencia	Amplicón (pb)
Nisina	Directo, nisRF Reverso, nisRR	5'- CTATGAAGTTGCGACGCAT CA-3' 5'- CATGCCACTGATACCCAAG T-3'	608

Enterocina	Directo, entAF Reverso, entAR	5'- GGGTACCACTCATAGTGG AA-3' 5'- CCAGCAGTTCTTCCAATTT CA-3'	412
Pediocina	Directo, pedF Reverso, pedR	5'- GGTAAGGCTACCACTTGC AT-3' 5'- CTACTAACGCTTGGCTGG CA-3'	332

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de Bacterias ácido lácticas (BAL)

Se lograron aislar 8 cepas diferentes que posiblemente fueran bacterias ácido lácticas productoras de péptidos antimicrobianos, todas formaban colonias blancas, redondas y convexas, sin embargo tras la tinción de Gram, 3 cepas fueron descartadas por ser Gram (-) negativas. Todas presentaron una morfología de cocos. 3 cepas presentan actividad catalasa, ninguna muestra capacidad de hidrolizar citrato o producir gas y todas presentan capacidad de fermentar glucosa.

Determinación de la capacidad antibacteriana de las cepas aisladas

Las cepas aisladas muestran capacidad antibacteriana contra diferentes bacterias patógenas, tal como se muestra en la tabla 2. Mostrando así que tras la identificación y caracterización de estas cepas aisladas, pueden tener potencial para una gran variedad de aplicaciones en el campo de los alimentos.

Tabla 2. Actividad antibacteriana de las cepas aisladas

Cepa aislada	Cepas indicadoras					
	B. cereus 183	S. aureus	M.luteus	E. coli	L. monocytogenes	L. innocua
MAe1	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
MAe2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Mae5	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
LP Ae1	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
LP An2	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)

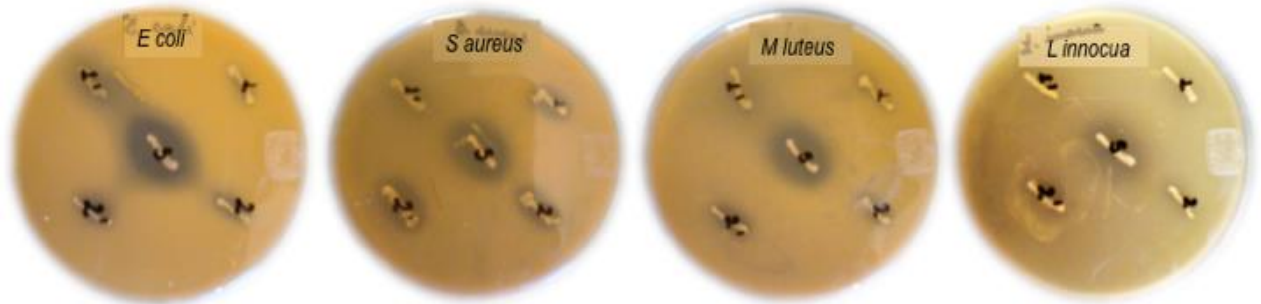


Fig. 1 Capacidad antibacteriana de las cepas seleccionadas como posibles ácido lácticas con la inhibición del crecimiento contra cepas indicadoras de *E. coli*, *S. aureus*, *M. luteus* y *L. innocua*.

Identificación molecular por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilizando los oligonucleótidos genéricos para identificación por 16s se pudo confirmar la naturaleza bacteriana de las cepas aisladas, amplificando un fragmento de más de ~1500 pb, usando como control *L. lactis*, *E. faecium* y *P. acidilactici* (fig. 3). El amplicón obtenido será posteriormente secuenciado para lograr una identificación molecular específica.

Además se realizó la amplificación por PCR multiplex para identificar cepas productoras de nisina, enterocina o pediocina, y presumiblemente la bacteriocina producida por las cepas es enterocina, al amplificarse un fragmento de ~500 pb (Fig. 2).

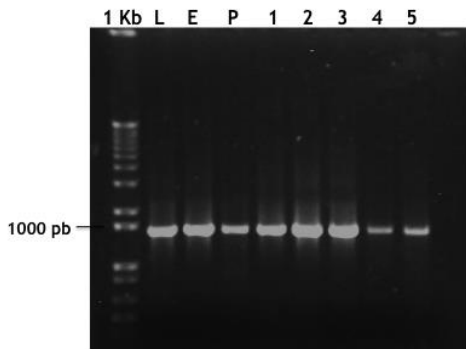


Fig.2 Amplificación del fragmento del gen 16s DNAr por PCR usando oligonucleótidos UBP y 1494. En el primer carril el marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen), cepas control marcadas como L (*L. Lactis*), E (*E. Faecium* UQ1) y P (*P. acidilactici*), carriles 1 a 5 cepas aisladas (1 MAe1; 2 MAe2; 3 Mae5; 4 LP Ae1; 5 LP An2)

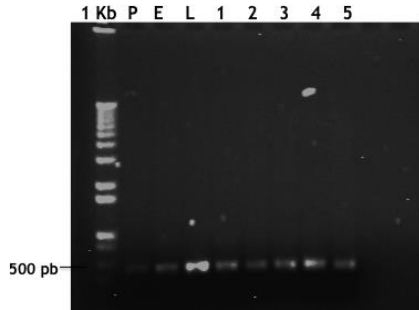


Fig.3 PCR multiplex. En el primer carril el marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen), cepas control identificadas como E, P y L respectivamente, en los carriles 1-5 cepas aisladas (1 MAe1; 2 MAe2; 3 Mae5; 4 LP Ae1; 5 LP An2). Se observa la amplificación del fragmento de 412 pb correspondiente a enterocina.

Esta técnica de identificación molecular se ha utilizado como un método efectivo para determinar la presencia de enterocina y otras bacteriocinas como nisina y pediocina en cepas de BAL (Suwanjinda *et al.*, 2007; Wieckowicz *et al.*, 2011), por lo que se considerado prudente utilizarla en nuestra búsqueda particular de cepas bacteriocinogénicas aisladas de leche de cabra.

BIBLIOGRAFÍA

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

Campos G, Robles L, Alonso R, Nuñez M, Picon A. 2011. Microbial dynamics during the ripening of a mixed cow and goat milk cheese manufactured using frozen goat milk curd. *Journal of Dairy Science* 94(10):4766-4776

Drider D, Fimland G, Hechard Y, McMullen LM, Prevost H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology Molecular Biology Review*. 70: 564-582

Hernández Cruza Pablo E. Nutrición y Bromatología III Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (Tesis doctoral) 2010.

Leon-Galván MF, Carbajal N, Frickey T, Santos L. 2009. Microbial identification of the Nichupte-Bojorquez coastal lagoon in Cancun, México. *Aquatic Ecology* 43:197-205. DOI. 10.1007/s10452-008-9171-1.

Shirai K, Guerrero I, Lara P. 1996. Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia* 47:125-137.

Suwanjinda D, Eames C, Panbangred W. 2007. Screening of Lactic Acid Bacteria for Bacteriocins by Microbiological and PCR Methods. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 35 (5): 364–369.

Wieckowicz M, Schmidt M, Sip A, Grajek W. 2011. Development of a PCR-based assay for rapid detection of class IIa bacteriocin genes. *Letters in Applied Microbiology* 52: 281–289.

Téllez G A, Castaño J C. 2010. Péptidos antimicrobianos. Revista Infectio 14(1):55:67.