
Control de propagación de *Salmonella* mediante la producción por otros microorganismos de bacteriocinas inhibitorias
Control of "Salmonella" propagation by means of the production of inhibitory bacteriocins by other micro-organisms

N. López¹, J.C. Oscáriz¹, B. Sesma², A.G. Pisabarro^{1*}

RESUMEN

Con el objetivo de aislar nuevos antibióticos capaces de controlar el crecimiento de especies de *Salmonella* posibles contaminantes de alimentos, se estudió la capacidad de diferentes aislados de bacterias Gram-negativas para inhibir el crecimiento de una cepa de *Salmonella enterica* aislada de un alimento contaminado. El estudio permitió la identificación de una cepa de *Escherichia coli* que excreta una microcina (microcina 784) que presenta un peso molecular aparente de 6 kDa. Los determinantes genéticos de la microcina 784 se encuentran en un plásmido de 34 kpb que ha sido aislado y subclonado. El espectro de acción de la microcina 784 es estrecho lo que sugiere que su acción está mediada por un receptor en la membrana.

INTRODUCCIÓN

La creciente aparición de cepas bacterianas que presentan resistencias múlti-

ples a antibióticos tradicionales ha impulsado la búsqueda de nuevos antibióticos frente a los que no se han desarrollado todavía mecanismos de resistencia. En la naturaleza, la producción de compuestos antibacterianos es muy común entre las bacterias y los hongos. De todos ellos sólo unos pocos (que generalmente presentan un amplio espectro de acción) han sido objeto de atención industrial y son utilizados en el control de microorganismos patógenos. Los antibióticos peptídicos de síntesis ribosomal (bacteriocinas^{1,2}) representan una estrategia diferente de control de las poblaciones bacterianas: normalmente tienen un espectro de acción reducido, muchas veces limitado a unas pocas especies (o incluso cepas) ecológicamente próximas a la bacteria productora y, además, su mecanismo de acción somete a una presión selectiva relativamente reducida a las bacterias sensibles al antibiótico por lo que la aparición de cepas resistentes es más infrecuente. Estas ventajas han

ANALES Sis San Navarra 1998, 21 (Supl. 3): 75-81.

1. Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra.
2. Instituto de Salud Pública.

Correspondencia:

Antonio G. Pisabarro
Departamento de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra
31006 Pamplona
Tfno. 948 169107
Fax 948 169732
E-mail: gpisabarro@upna.es

hecho que las bacteriocinas sean consideradas como compuestos importantes en la prevención de toxiinfecciones alimentarias^{3,4,5}.

En este trabajo hemos realizado una búsqueda de bacterias productoras de antibióticos peptídicos activos frente a bacterias del género *Salmonella* con el fin de aumentar el repertorio de antibióticos activos frente a este grupo de patógenos, identificar nuevas dianas de acción antibiótica y estudiar la influencia este tipo de compuestos en los procesos de exclusión competitiva en la flora intestinal⁶.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo provienen de las colecciones de los siguientes centros: Instituto de Salud Pública de Navarra, Servicio de Microbiología del Ayuntamiento de Pamplona, Laboratorio Municipal de Pamplona, Centro de Salud de la Diputación de Vizcaya, Laboratorio de Microbiología de la Universidad Pública de Navarra y Laboratorio de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Los cultivos se realizaron en medios sólidos o líquidos usando como medios de cultivo los siguientes: medio L⁷ BHI (Biolife, Milán) y agua de peptona (bactotripton 10 gl⁻¹, NaCl 5 gl⁻¹ en agua destilada). Para realizar cultivos en medio sólido, se añadió al medio de cultivo correspondiente 8 gl⁻¹ (medio blando) ó 15 gl⁻¹ (medio sólido) de agar. En los casos de cultivos líquidos la incubación se realizó con agitación (200 rpm), con una relación de volumen de cultivo a volumen de matraz de 1:5, en un baño de agua y el crecimiento se siguió por medida de la densidad óptica a 550 nm. En todos los casos, los cultivos se incubaron a 37 °C.

Para la clasificación de las bacterias aisladas durante este trabajo se utilizaron galerías Api20E (Biomérieux, Lyon), y BBL Crystal (Becton Dickinson, Cockeysville, USA) específicas para la diferenciación de bacterias entéricas y los medios selectivos para identificación de *Escherichia coli*

(EMB blue⁸ Biolife, Milán) y de *Salmonella* (XLD⁹ Cultimed, Barcelona.).

Detección de la actividad antibiótica

La actividad antibiótica se detectó en Placas de Petri por la formación de halos de inhibición del crecimiento de un césped de la bacteria testigo en torno a las colonias productoras de antibiótico sembradas sobre él, después de 12h de incubación a 37 °C. Para detectar la actividad antibiótica presente en extractos purificados, se depositaron gotas de dichos extractos en la superficie de un césped de la bacteria testigo y se determinó la producción de halos de inhibición¹⁰ La detección de actividad inhibitoria en medio líquido se realizó colocando un volumen del cultivo de la bacteria productora, del que se habían eliminado las células por centrifugación e incubación a 100 °C durante 15 min., en la superficie de un césped de la bacteria testigo y se determinó la producción de halos de inhibición del crecimiento. Para detectar la actividad antibiótica en geles de poliacrilamida, se analizaron en paralelo duplicados de la misma muestra: uno de ellos tiñó con Coomassie blue R-250 para revelar la posición de las proteínas y el otro mitad se lavó con abundante agua destilada estéril para eliminar el tampón del gel, se colocó en la superficie de una placa de Petri que contenía medio L y se cubrió con una capa de agar blando inoculado con la bacteria testigo para detectar la formación de halos de inhibición después de la correspondiente incubación a 37 °C⁸.

Curado de plásmidos y transferencia por conjugación

Las técnicas generales de manipulación del ADN se desarrollaron como se indica en Sambrook y col.¹¹ Para curar los plásmidos presentes en *E. coli* 784 se trataron cultivos de la bacteria con 1 gl⁻¹ de SDS y posterior incubación a altas temperaturas (48° C). Después del tratamiento se separaron colonias aisladas y se comprobó para cada una de ellas la capacidad de producción de antibiótico, la resistencia al mismo y la presencia de plásmidos.

La transferencia de plásmidos por conjugación se realizó mezclando en un volumen de 50 µl las células presentes en 500 µl de sendos cultivos de las cepas donadora de plásmidos (*E. coli* 784, *mic784⁺nal^s*), receptora de plásmidos (*E. coli* 2110, *mic784⁻nal^r*) y ayudante (*E. coli* HB101, *mic784⁻nal^r*). La mezcla de bacterias se colocó en la superficie de una placa de medio L y se incubó toda la noche a 37°C. Las células de la colonia resultante tras la incubación se sembraron en medio L. conteniendo ácido nalidíxico para seleccionar *E. coli* 2110. En las colonias resistentes a ácido nalidíxico se comprobó la capacidad de producción de antibiótico.

RESULTADOS

Detección de actividad antibiótica

Antes de iniciar la búsqueda de bacterias productoras de antibióticos inhibidores del crecimiento de *Salmonella* fue necesario seleccionar una cepa de esta especie que actuara como testigo. Realizado un análisis del comportamiento frente a antibióticos de diferentes aislados de *Salmonella* perteneciente a la colección del Instituto de Salud Pública de Navarra (ISPN) a fin de escoger una representativa del grupo que no presentase patrones especiales de resistencia a los antibióticos de uso habitual en el laboratorio, se escogió la cepa de *S. enterica* subesp. *enteritidis*

número 2966/92 que provenía de una muestra de agua de una zona de baño de Ezcaroz (Navarra).

El trabajo de búsqueda de bacterias productoras de antibióticos se realizó mediante la siembra por picadura¹⁰ en céspedes en agar blando de la bacteria testigo, de colonias de bacterias Gram-negativas procedentes de diferentes orígenes. En total se estudiaron 123 aislados procedentes de muestras ambientales, 45 procedentes de alimentos y 200 clínicos. De entre todos ellos sólo uno, clasificado como *Escherichia coli* y registrado con el número 784 en la colección del ISPN, presentó una actividad inhibidora clara (Fig. 1). *E. coli* 784 procedía de un aislado clínico obtenido en el hospital de Tudela (Navarra) a partir de la flora intestinal de un paciente que presentaba un cuadro gastrointestinal producido por *Clostridium perfringens*.

Para comprobar si la inhibición del crecimiento de *S. enterica* 2269 producida por *E. coli* 784 era debida a presencia de un bacteriófago atemperado se tomó una muestra del centro del halo de inhibición que se resuspendió en 1 ml de agua estéril con dos gotas de cloroformo para destruir todas las bacterias presentes y se colocaron gotas de la fase acuosa sobre un césped en agar blando de *S. enterica* 2269. La ausencia de halos de inhibición indicó que

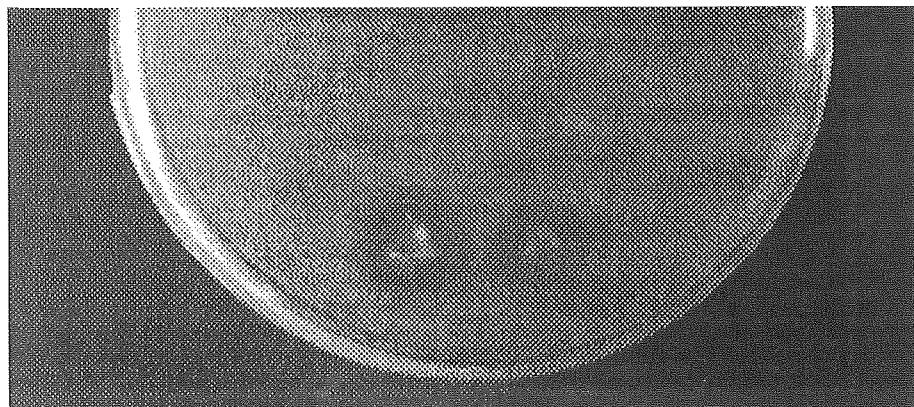


Figura 1. Halos de inhibición del crecimiento de un césped de *S. enterica* 2269 producidos por colonias de *E. coli* 784.

la actividad de *E. coli* 784 no se debía a la presencia de un fago atemperado.

Aislamiento y caracterización de la microcina 784

Para estudiar con detalle las características bioquímicas de la actividad inhibidora producida por *E. coli* 784 se procedió a su purificación parcial a partir de sobrenadantes de cultivos de la bacteria productora. En primer lugar, fue preciso determinar en qué medio de cultivo se producía mayor actividad inhibidora y la fase de cultivo en la que dicha actividad era más alta. Para responder a la primera pregunta, se estudió la presencia del antibiótico en el sobrenadante de cultivos *E. coli* 784 realizados en Agua de Peptona, medio L o BHI, incubados hasta que alcanzaron el inicio de la fase estacionaria. No fuimos capaces de detectar actividad antibiótica en sobrenadantes sin concentrar, pero sí fue posible hacerlo cuando se precipitaba la fracción proteica con sulfato amónico al 65% de saturación concentrándola 100 veces. De esta forma se pudo comprobar que *E. coli* 784 producía la mayor cantidad de actividad inhibidora cuando crecía en Agua de Peptona mientras que cuando se usaba medio L como medio de cultivo se obtuvieron los niveles más bajos de actividad, se vio que la producción de antibiótico comenzaba en la fase exponencial tardía y que dicha actividad se acumulaba durante la fase estacionaria.

Para comprobar las características bioquímicas del antibiótico producido por *E. coli* 784 se trataron muestras de sobrenadantes concentrados de cultivos de *E. coli* 784 con diferentes proteasas (α -quimiotripsina, tripsina, proteinasa K, y pronasa E), o con otras enzimas (α -amilasa, lipasa A, lisozima, aminopeptidasa, mutanolisina, DNAsa, y RNAsa); y se comprobó la sensibilidad del antibiótico a dichos tratamientos. Sólo los tratamientos con proteasas causaron una reducción en la actividad antibiótica detectada su naturaleza proteica. Por otra parte, se pudo comprobar que la actividad antibiótica producida por *E. coli* 784 fue sensible al tratamiento con 5 g^l de dodecilsulfato sódico y resistente a detergentes no iónicos tales como el Tri-

ton X-100, Tween 20 y Tween 80, y a tratamientos con 10% (vol/vol) de butanol, metanol, acetona, cloroformo, o α -mercaptoetanol (en este último caso se realizaba una incubación a 60 °C durante 15 min en presencia del agente reductor). El antibiótico soportó también incubaciones de 1 hora a temperaturas de 100 °C sin pérdida de la actividad; aunque, sin embargo, no resistió condiciones de autoclavado 121 °C, 15 min. Por último, la actividad de la microcina 784 es estable en un rango de pH entre 1 y 12.

A fin de determinar el tamaño del compuesto producido por *E. coli* 784 se realizaron experimentos de ultrafiltración que indicaron un tamaño molecular de entre 3 y 30 kDa. Para determinar de forma más precisa el peso molecular, se detectó la actividad en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% de las proteínas presentes en el concentrado de sobrenadante cultivos de *E. coli* 784 y se reveló la posición de la actividad antibiótica que correspondió con una proteína de 6 kDa de tamaño molecular.

Debido a sus características bioquímicas, nos referiremos a este antibiótico a partir de ahora como microcina 784¹².

Espectro de acción

Para determinar el espectro de acción de la microcina 784, se realizaron experimentos de inhibición del crecimiento en céspedes de diferentes bacterias. El resultado de este análisis permitió comprobar que las bacterias Gram-positivas eran resistentes a la microcina 784, mientras que entre las bacterias Gram-negativas se obtenía diferentes grados de sensibilidad: todas las bacterias del género *Salmonella* probadas fueron sensibles (29 sensibles / 29 analizadas); mientras que en el caso de *E. coli* la proporción de sensibles era menor (15/26) y en otras especies no se encontraron cepas sensibles: *Pseudomonas aeruginosa* (0/1), *Serratia fonticola* (0/1), *Enterobacter* sp. (0/3), *Citrobacter freundii* (0/1), *Bordetella bronchiseptica* (0/1) y *Klebsiella pneumoniae* (0/1). No se detectó ninguna relación ni entre el serotipo de las cepas de *E. coli* o el fagotipo de las cepas de *Salmonella* estudiadas y su

resistencia o sensibilidad a la microcina 784. Por consiguiente, se puede concluir que la microcina 784 presenta un espectro de acción reducido que es selectivo sobre cepas de *Salmonella*.

Comparación con otras microcinas y colicinas

Para comprobar si la microcina 784 es un nuevo aislamiento de otra microcina o colicina previamente descrita se estudió si *E. coli* 784 era capaz de inhibir el crecimiento de otras cepas de *E. coli* productoras de colicinas y microcinas. Se comprobó que la microcina 784 era activa contra las siguientes cepas: *E. coli* RYC (pM₁ 39) productora de la microcina B17¹³, *E. coli* MC4100 (pM₁ 501) productora de la microcina C7¹⁴ y *E. coli* MC 4100 (p Col V-Tn 10) productora de la colicina V¹⁵. Así mismo *E. coli* 784 fue sensible a las microcinas B17 y a la C7 pero no a la colicina V. Por consiguiente, la microcina 784 no es un nuevo aislamiento de ninguna de estas microcinas previamente descritas producidas por *E. coli*. Por otra parte, se comprobó que *E. coli* 784 es resistente a su propio antibiótico tanto en la fase exponencial del crecimiento como en la fase estacionaria.

Control genético de la producción de la microcina 784

Las colicinas suelen estar codificadas en elementos extracromosómicos^{16,12}. Un estudio de los plásmidos presentes en *E. coli* 784 demostró que esta bacteria tiene tres plásmidos de alto peso molecular. Para identificar cuál era el elemento genético responsable de la producción de la microcina 784, se realizó un experimento de transferencia conjugativa de plásmidos de *E. coli* 784 (*mic784⁺nal^R*) a *E. coli* 2110 (*mic784⁻nal^R*). La recuperación de colonias resistentes a ácido nalidíxico que eran productoras de microcina 784 permitió demostrar que la producción de este antibiótico está codificada en un plásmido presente en *E. coli* 784. *E. coli* 2110 no es portadora de ningún plásmido propio; sin embargo, de las colonias resultantes de la conjugación podía recuperarse un plásmido de alto peso molecular (34 kilopares de bases). Por otro lado, experimentos de

curado de plásmidos realizados en *E. coli* 784 permitieron recuperar dos tipos de bacterias no productoras de microcina 784 y sensibles a ella: una de ellas había perdido un plásmido de peso molecular de 34 kpb y otra dos, uno de ellos el de 34 kpb (Fig. 2).

DISCUSIÓN

Usando como bacteria blanco de los experimentos la cepa de *S. enterica* subesp. *enteritidis* registrada con el número 2269 en el Instituto de Salud Pública de Navarra se ha realizado una búsqueda de bacterias productoras de antibióticos peptídicos que ha dado lugar a la identificación de una bacteriocina (microcina 784) activa frente a todas las cepas de *Salmonella* analizadas. La frecuencia de aparición de actividad antibiótica en las muestras analizadas fue relativamente baja (sólo una cepa de un total de 368). Esto pudiera ser debido a la restricción que supone el haber escogido un único microorganismo diana que, posiblemente, resulta resistente a otros péptidos producidos por otros microorganismos. De hecho, mientras que todas las bacterias del género *Salmonella* fueron sensibles a la microcina 784, sólo algunas (15 de 26) de las cepas de *E. coli* analizadas lo fueron, lo que indica la especificidad de acción del antibiótico.

Las características de tamaño, termoestabilidad y estabilidad química permiten clasificar el antibiótico producido por *E. coli* 784 como una microcina. Existen otras muchas microcinas producidas por diferentes cepas de *E. coli*. En este estudio hemos comprobado que la microcina 784 no es reconocida por el sistema de inmunidad de otras microcinas de *E. coli* (microcinas B17, C7 y colicina V) por lo que, en un primer momento, podemos descartar que se trate de un nuevo aislamiento de una de ellas. La identidad de la microcina 784 como un nuevo antibiótico peptídico podrá establecerse cuando se logre su secuenciación directa o la del gen que la codifica.

La microcina 784 parece estar codificada en un plásmido de 34 kilopares de bases en el que reside la información genética para su producción y su sistema de inmu-

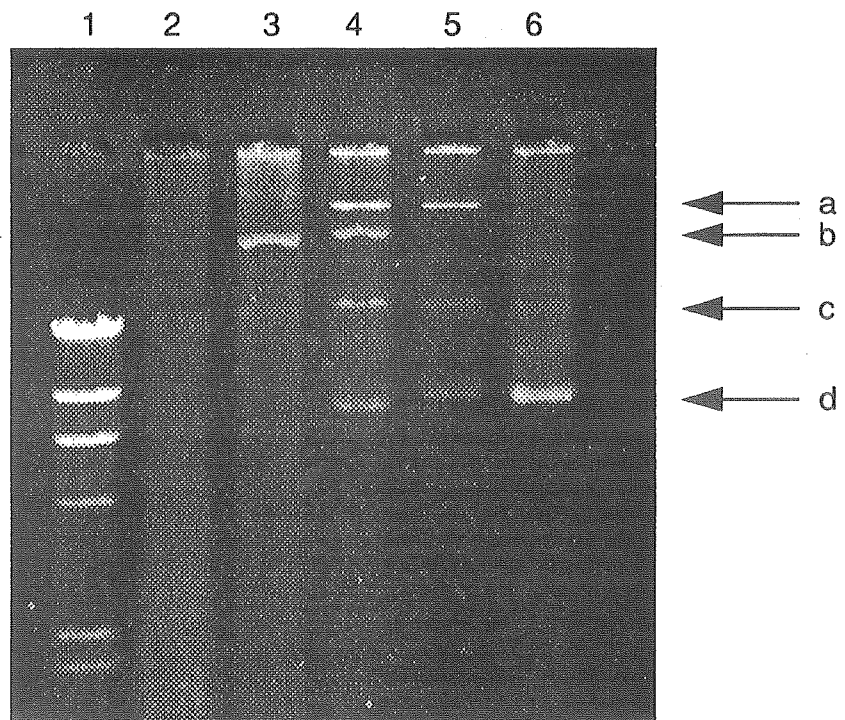


Figura 2. Análisis de plásmidos de las cepas utilizadas en la identificación de los determinantes genéticos de la microcina 784. Carriles: 1, marcador de tamaño; 2, *E. coli* 2110 control; 3, *E. coli* 2110 conjugada con *E. coli* 784; 4, *E. coli* 784; 5 y 6, cepas derivadas de *E. coli* 784 que no son productoras de microcina 784. Los fragmentos más relevantes se indican con letras: b, plásmido de 34 kpb; c, ADN genómico de la bacteria.

nidad. Por consiguiente, el clonaje de los genes específicos de producción e inmunidad para esta microcina permitirá en un futuro próximo la sobreproducción del antibiótico en las cantidades suficientes para realizar los estudios sobre el modo de acción a nivel molecular que permitan identificar el sitio de acción del antibiótico y su papel en procesos de exclusión competitiva *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

1. ASENSIO C, PEREZ-DIAZ JC. A new family of low molecular weight antibiotics from *Enterobacteria*. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 69: 7-14.
2. JACK RW, TAGG JR, RAY B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 1995; 59: 171-200.
3. BARNBY-SMITH FM. Bacteriocins: applications in food preservation. *Trends Food Technol* 1992; 3: 133-137.
4. ECKNER KF. Bacteriocins and food applications. *Dairy, Food Environmental Sanitation* 1992; 12: 204-209.
5. KONE K, FUNG DYC. Understanding bacteriocins and their use in foods. *Dairy, Food Environmental Sanitation* 1992; 12: 282-285.
6. JUVEN BJ, MEINERSMANN RJ, STERN NJ. Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. *J Appl Bacteriol* 1991; 70: 95-103.
7. LENNOX ES. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* 1955; 1: 190-206.
8. HOLT-HARRIS JE, TEAGUE OA. A new culture medium for the isolation of *Bacillus*

- typhosus* from stools. J Infect Dis 1916; 18: 596-600.
9. ROSENOW EC. Studies on elective localization. Focal infection with special reference to asepsis. J Dental Res 1919; 1: 205-249.
10. PUGSLEY AP, OUDEGA B. Methods for studying colicins and their plasmids. En: Hardy KG editor. Plasmids: a practical approach.: Oxford: IRL Press, 1987: 105-161.
11. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
12. KOLTER R, MORENO F. Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. Annu Rev Microbiol 1992; 46: 141-163.
13. DAVAGNINO J, HERRERO M, FURLONG D, MORENO F, KOLTER R. The DNA replication inhibitor microcin B17 is a forty-three aminoacid protein containing six percent glycine. proteins 1986; 1: 230-238.
14. GARCÍA-BUSTOS JF, PEZZI N, ASENCIO C. Microcin C7: purification and properties. Biochem Biophys Res Commun 1984; 119: 779-785.
15. YANG CC, KONISKY J. Colicin-V treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential. J Bacteriol 1984; 158: 757-759.
16. RILEY MA, GORDON DM. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. J Gen Microbiol 1992; 138: 1345-1352.