JOURNAL OF MICROBIOLOGY & HEALTH EDUCATION, Vol. 1. No. 1, 2019, páginas 7-11.
© Instituto Mexicano de Profesionalización de la Educación para la Salud, S.R.L. de C.V. 2019

ARTÍCULO BREVE

Resistencia a la nisina y su asociación con el perfil de restricción plasmídico de cepas *Leuconostoc lactis* aisladas de salchicha deteriorada

Nisin resistance and its association with the plasmid restriction profile of *Leuconostoc lactis* strains isolated from spoiled sausage

Alma Fabiola Delgado-Nolasco[a], Claudia Luz Navarro Villarruel[a], Tania Karina Ceja Farias[a], Ana Luisa Madriz Elisondo[a], Marco Antonio Cardona Lopez[a] y J. Jesús Padilla Frausto[a*]

[a]*División de Desarrollo Bio-Tecnológico, Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara, Av. Universidad, Núm. 1115, Col. Lindavista, Código Postal 47810, Ocotlán, Jalisco. México.*

Información del artículo:
Recibido el 12 de agosto de 2019
Recibido el revisado el 1 de noviembre de 2019
Aceptado el 3 de noviembre de 2019
Disponible on-line el 16 de diciembre de 2019

[*] *Autor de correspondencia:*
J. Jesús Padilla Frausto
Teléfono: (392) 925-9400.
Correo electrónico:
j.padilla@academicos.udg.mx

R E S U M E N

Una empresa mexicana productora de salchichas, que ha presentado brotes de deterioro microbiano en su producto empacado, informó que entre Nov. 2006 y Ene. 2007, presentó un déficit de producto por deterioro, equivalente a 5.61 ton y aproximadamente 18.82 ton más en el periodo comprendido entre Nov. 2007 y Feb. 2008. Cantidades escandalosas, dada la merma económica que le produjo a la empresa, ya que sólo en el último brote, esta ascendió a poco menos de un cuarto de millón de pesos, y afirma que en el 2010 ha presentado constantes brotes de similar escala (Informe financiero, confidencial). Se ha relacionado a la especie *Leuconostoc lactis* y otras especies de *Leuconosoc* como la causa. Una estrategia viable es la adición de bioconservadores como la nisina. Se emplearon 15 cepas de *L. lactis* que mostraron potencial de deterioro. Se determinó su perfil de resistencia a nisina para determinar el fenotipo Nis_R, se aislaron plásmidos y se genotificaron mediante perfiles de restricción plasmídica empleado cuatro endonucleasas de restricción *HindII, ApaI, SmaI* y *XbaI*. Fue posible observar que cepas no relacionadas genéticamente (mediante restricción de DNA cromosómico), presentan perfiles de restricción plasmídica estrechamente relacionados (91.7 % de similitud genética). Finalmente, dado que el paquete plasmídico de la cepa que presento la menor resistencia a la nisina (87: CMI >0.2 µg/mL) mostró una relación genética estrecha (93.2 %) con los obtenidos de otras cepas resistentes, no fue posible, asociar un perfil de restricción plasmídico determinado, con el fenotipo Nis_R. Sin embargo, es posible sugerir la permanencia (hasta dos años) de las cepas de *L. lactis* Nis_R en superficies de trabajo de la empresa y/o la posible transferencia de plásmidos con información codificate para el fenotipo Nis_R.

Palabras clave: *Leuconostoc lactis*, Nisina, Salchicha deteriorada, Plásmidos

A B S T R A C T

A Mexican company that produces sausages, which has presented outbreaks of microbial deterioration in its packaged product, reported that between Nov. 2006 and Jan. 2007, it presented a product deficit due to deterioration, equivalent to 5.61 tons and approximately 18.82 tons more in the period between Nov. 2007 and Feb. 2008. Scandalous amounts, given the economic decline that caused the company, since only in the last outbreak, it amounted to just under a quarter of a million Mexican pesos, and states that in the 2010 has presented constant outbreaks of a similar scale (Financial report, confidential). *Leuconostoc*

lactis species and other *Leuconosoc* species have been linked as the cause. A viable strategy is the addition of bioconservatives such as nisin. 15 strains of *L. lactis* were used that showed potential for deterioration. Their resistance profile to nisin was determined to determine the Nis_R phenotype, plasmids were isolated and genotified by means of plasmid restriction profiles using four restriction endonucleases *HindII, ApaI, SmaI* and *XbaI*. It was possible to observe that genetically unrelated strains (by restriction of chromosomal DNA), present closely related plasmid restriction profiles (91.7 % genetic similarity). Finally, given that the plasmid package of the strain that presented the lowest resistance to nisin (87: MIC > 0.2 μg / mL) showed a close genetic relationship (93.2 %) with those obtained from other resistant strains, it was not possible to associate a determined plasmid restriction profile, with the Nis_R phenotype. However, it is possible to suggest the permanence (up to two years) of *L. lactis* Nis_R strains on company work surfaces and / or the possible transfer of plasmids with information encoded for the Nis_R phenotype.

Keywords: *Leuconostoc lactis*, Nisin, Spoiled sausage, Plasmids

INTRODUCCIÓN

La salchicha es un producto cárnico alimenticio embutido. Elaborado a partir de una mezcla de carne de ternera, res y/o cerdo. Una de las principales causas de deterioro de la salchicha es el desarrollo de bacterias acido-lácticas, en particular del género *Leuconostoc spp.,* con capacidad para crecer a bajas temperaturas y de producir líquido lechoso y gasificación. El costo económico para la empresa productora y distribuidores a causa del deterioro es elevado. Una empresa mexicana productora de salchichas, que ha presentado brotes de deterioro microbiano en su producto empacado, informó que entre Noviembre de 2006 y Enero del 2007, presentó un déficit de producto por deterioro, equivalente a 5.61 ton, y aproximadamente 18.82 ton más en el periodo comprendido entre Noviembre del 2007 y Febrero del 2008. Cantidades escandalosas, dada la merma económica que le produjo a la empresa, ya que sólo en el último brote, esta ascendió a poco menos de un cuarto de millón de pesos, y afirma que en el 2010 ha presentado constantes brotes de similar escala (Informe financiero, confidencial). Se ha relacionado a la especie del genero *Leuconostoc* en particular la especie *L. lactis* como importante agente causal de deterioro de salchichas empacadas al vacío (Padilla-Frausto *et al.,* 2015). Una estrategia viable que la industria alimenticia de carnes frías ha implementado es la adición de bioconservadores en su producto empacado. Un conservador que ha mostrado eficiente control contra bacterias Gram negativas y positivas distintas al género microbiano productor, es la nisina. Curiosamente los productos empacados al vacío que conformaron los brotes incluían en su formulación a un conservador a base de nisina, lo que sugiere que las cepas aisladas de dichos productos presentan cierta resistencia al conservador. En estudios previos, se han identificado a los genes *NisA* (promotor) y *NisI* (regulador) propios de *Lactococcus* spp., en cepas de *Leuconostoc lactis* que muestran resistencia a nisina. Adicionalmente, Johansen *et al*., (1992) reportó evidencia de información genética extracromosómica (plásmidos) en la especie, información de interés dado que es información genética móvil (transferible) entre cepas del mismo género, por lo que es posible que la conjugación sea el mecanismo de transferencia de información genética codificante para la resistencia al conservador entre las cepas instaladas en la planta de producción de salchichas. El objetivo de este estudio fue determinar la resistencia a la nisina y su asociación con el perfil de restricción plasmídico de cepas de *Leuconostoc lactis* aisladas de salchichas deterioradas.

MATERIALES Y METODOS

De un estudio previo en que se analizaron 1160 muestras de superficies de producción y producto en proceso, terminado y deteriorado, se aislaron 112 cepas de *Leuconostoc* spp. De estas, para este estudio sólo se emplearon 15 cepas de *L. lactis* que mostraron potencial de deterioro. Se determinó su perfil de resistencia a nisina mediante la técnica de microdilución empleando caldo infusión cerebro corazón (BD) con nisina. Adicionalmente, se aislaron plásmidos de las cepas empleando el protocolo descrito por Vriesema, *et al*. (1996), con modificaciones y se purificaron mediante un "kit" de "plasmid minipreps®". La genotipificación de las cepas se realizó mediante perfiles de restricción plasmídica empleado cuatro endonucleasas de restricción *HindII, ApaI, SmaI* y *XbaI*. Los patrones de restricción de plásmidos fueron evaluados y comparados mediante el empleo del coeficiente de similitud Dice (5 % de tolerancia en posición de las bandas en el gel). Finalmente, se agruparon los plasmotípos y se generaron los dendrograma de asociación genética, con la finalidad de correlacionar la resistencia a nisina con uno o varios perfiles plasmídicos y vislumbrar su posible transferencia entre las cepas fenotipo nisina resistente (Nis_R).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó la resistencia a nisina de las 15 cepas de *L. lactis*, mediante el cálculo de la concentración

mínima inhibitoria (CMI) del conservador efectivas para inhibir *in vitro* el desarrollo de cada cepa (Tabla 1). Se estableció una concentración de >12.5 µg/mL de nisina como criterio de resistencia que describe al fenotipo Nis_R, dado que la NOM-145-SSA-1995 y el *Codex Alimentarius* (1995) recomiendan una concentración inferior a 12.5 µg de nisina por gramo de alimento, como conservador en productos cárnicos, encontrándose que el 80 % (12/15) de las cepas presentan el fenotipo Nis_R.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de nisina en cepas de *Leuconostoc lactis*
Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) of nisin in *Leuconostoc lactis* strains

Cepa	5	20	23	25	85	87	88	92	99	100	101	108	109	110	111
CMI nisina (µg/mL)	6.25	6.25	25	12.5	12.5	0.2	12.5	12.5	12.5	25	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Presencia del fenotipo Nis_R	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Sólo las cepas 23 y 101 no evidenciaron la presencia de plásmidos (Figura 1). Fue posible identificar 28 plásmidos, sin embargo, dada la reducida cantidad de copias de algunos plásmidos, sólo fue posible aislar 23 de ellos. La cepa 111 aislada de salchicha deteriorada fue la que presentó el mayor número de plásmidos (4), con respecto a las demás. Cabe destacar que Johansen *et al.,* (1992) reportaron que todas las cepas (155) de una mezcla iniciadora comercial de *L. lactis, L. mesenteroides* y *L. cremoris* contenían entre dos y seis plásmidos, en un rango de tamaño de 1 a 30 kpb.

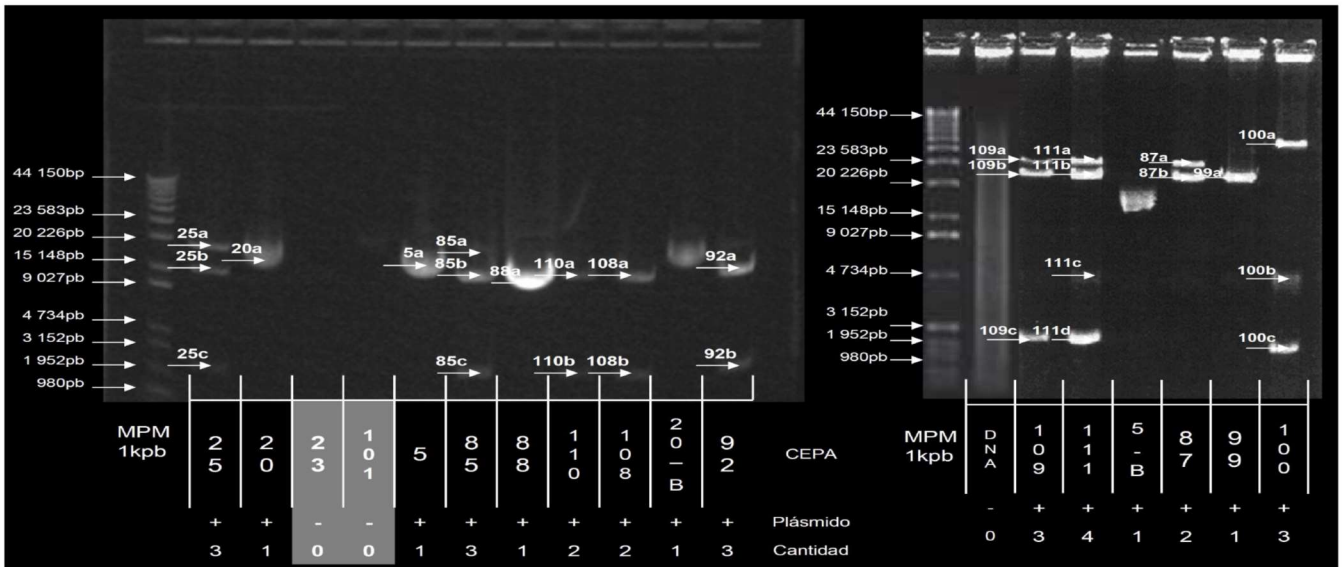


Figura 1. Prevalencia de plasmidos en cepas de *Leuconostoc lactis*
Figure 1. Plasmid prevalence in *Leuconostoc lactis* strains

Tras la restricción enzimática de los plásmidos, fue posible clasificarlos en 22 plasmotípos (Figura 2). Se identificaron dos grupos de plasmotípos relacionados con un 50.2 % de similitud en el su perfil de restricción plasmídica. Ambos plasmotípos relacionan cepas recuperadas con dos años de diferencia (2008-2010). Sin embargo, sólo el plasmotípo XIII relacionó dos plásmidos, curiosamente, aislados de cepas recuperadas de salchichas deterioradas de brotes con un periodo de dos años de diferencia entre un evento y otro (ver recuadro en gris). Con anterioridad se habían relacionado estas dos cepas (25 y 85) con un 99.2 % de similitud genética mediante PFGE, agrupándolas en un genotípo, evidenciándose la posible permanencia de la cepa en la empresa productora. Tanto la cepa 25, como la 85, presentan el fenotipo Nis_R. Adicionalmente, en estudios previos, se han identificado los genes *NisA* y *NisI* en el paquete de ADN plasmídico de ambas cepas,

que podría asociarse con la resistencia a nisina expresada. Así mismo, fue posible observar que cepas no relacionadas genéticamente (mediante restricción de DNA cromosómico), presentan perfiles de restricción plasmídica estrechamente relacionados (91.7 % de similitud genética). Finalmente, dado que el paquete plasmídico de la cepa que presento la menor resistencia a la nisina (87: CMI >0.2 µg/mL) mostró una relación genética estrecha (93.2 %) con los obtenidos de otras cepas resistentes, no fue posible, asociar un perfil de restricción plasmídico determinado, con el fenotipo Nis_R.

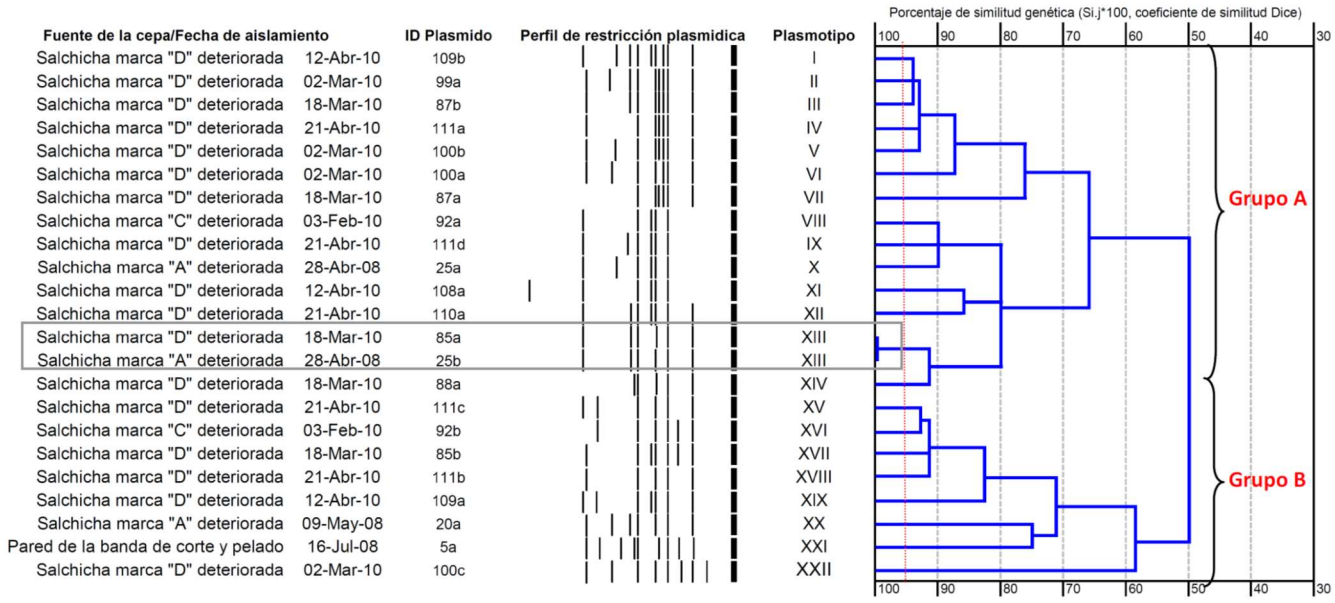


Figura 2. Dendrograma del perfil plasmidico en cepas de *Leuconostoc lactis*
Figure 2. Dendrogram of the plasmid profile in *Leuconostoc lactis* strains

CONCLUSIÓN

Aun cuando no fue posible asociar un perfil de restricción plasmídico determinado, con la capacidad de resistencia a la nisina que mostraron las cepas de *Leuconostoc lactis* aisladas de salchicha deteriorada, es posible sugerir la permanencia (hasta dos años) de las cepas de *L. lactis* Nis_R en superficies de trabajo de la empresa y/o la posible transferencia de plásmidos con información codifícate para el fenotipo Nis_R.

Conflicto de intereses:
Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Codex Alimentarius, 1995. Norma general para los aditivos alimentarios. Codex Stan, *192*.
2. Johansen, E. and Kibenich A., 1992. Characterization of *Leuconostoc* Isolates from Commercial Mixed Strain Mesophilic Starter Cultures. J. Dairy. Sc. 75(5): 1186-1191
3. Kilic, A., Bedir,O., Kocak, N., Levent, B and A. Basustaoglu, C. 2010. Analysis of an Outbreak of *Salmonella* Enteritidis by Repetitive-Sequence-Based PCR and PFGE. Inter. Med. 49: 31-36.
4. NOM-145-SSA-1995. NORMA OFICIAL MEXICANA: Productos Carnicos Troceados y Curados. Productos Carnicos Curados y Madurados. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias.
5. Padilla-Frausto, J. J., Cepeda-Marquez, L. G., Salgado, L. M., Iturriaga, M. H., & Arvizu-Medrano, S. M. 2015. Detection and genotyping of *Leuconostoc* spp. in a sausage processing plant. Journal of food protection, 78(12): 2170-2176.
6. Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by PFGE: J. Clin. Microbiol. 33: 2233-9.
7. Tenover F. C., and Goering R. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 18:426-39.

8. Vriesema, A. J. M., Zaat, S. A. J. and Dankert, J. 1996. A Simple Procedure for Isolation of Cloning Vectors and Endogenous Plasmids from Viridans Group *Streptococci* and *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 62(9): 3527–352.