

IDENTIFICACION MEDIANTE EL GEN *recA* Y ESPECTROMETRIA DE MASAS DE *L. paraplantarum* PRODUCTORA DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN PROTEICO

Jessica J. Hurtado-Ríos¹, Israel García-Cano³, Julio Cesar Almanza Pérez² y Edith Ponce-Alquicira¹.

¹Departamento de Biotecnología, ²Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa Ciudad de México C.P. 09340. ³ The Ohio State University, Department of Food Science and Technology, Columbus OH, USA. e-mail: qa_jessica@hotmail.com

Palabras clave: gen *recA*, *L. paraplantarum*, actividad antimicrobiana.

Introducción. Las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden producir compuestos de naturaleza proteica con actividad antimicrobiana como bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas (PGH) (1). En el grupo de trabajo se identificó a partir de salami una BAL que presentó actividad antimicrobiana (1, 2). El objetivo de este trabajo fue corroborar la identidad de la cepa aislada y determinar si la actividad antimicrobiana presente en el extracto celular se debe a compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica.

Metodología. La cepa aislada de salami se identificó molecularmente por la amplificación del gen de referencia 16S y del gen *recA*, así como por el perfil de espectrometría de masas, MALDI-TOF-Biotyper (1, 3, 4). A partir del sobrenadante se prepararon extractos para compuestos tipo bacteriocina (BLIS) y PGH a los cuales se les determinó actividad antimicrobiana mediante la prueba de difusión en agar (1). La actividad se corroboró por zimogramas contra *M. lysodeikticus* en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (1). La banda de bajo peso molecular fue secuenciada por espectrometría de masas en el Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM). Además se determinó la actividad de PGH con sustratos específicos (1).

Resultados. En la identificación del 16S ARNr completo, el porcentaje de similitud de la cepa con respecto a una secuencia del BLAST-n fue del 92% para *L. plantarum* y *L. paraplantarum* (Figura 1A). Por lo que se incluyó la amplificación del gen *recA* para la diferenciación de estas dos especies; utilizando un único cebador reverso y dos cebadores específicos, siendo positivo para *L. paraplantarum* (cebador paraF) con un amplicón de 107 pb (Figura 1B). La identificación por género y especie se corroboró por espectrometría de masas con un nivel de fiabilidad de 2.16 generado mediante MALDI-TOF Biotyper (Figura 1C).

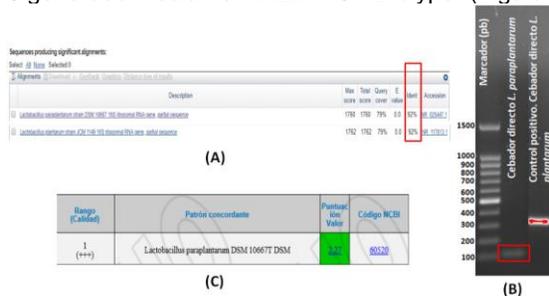


Fig.1. (A) BLAST en base de datos NCBI del 16S ARNr. (B) Productos de amplificación obtenidos por PCR del gen *recA* en gel de agarosa al 1.2%. Marcador de 100 pb DNA. (C) valor de puntuación MALDI-TOF MS Biotyper

Los extractos obtenidos de *L. paraplantarum* mostraron actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*, con una actividad 2.3 veces mayor en el extracto de PGH con respecto al de bacteriocina (Tabla 1). *L. paraplantarum* presentó bandas de actividad lítica en 12.6- y 95- kDa en geles Tris-tricina y Tris-glicina, respectivamente (Figura 2). La banda de bajo peso molecular corresponde a la proteína 50S ribosomal L14, acorde a la secuenciación por espectrometría de masas con una probabilidad de identidad superior al 95% a través del software Scaffold 3. En tanto a la banda de alto peso molecular es una PGH con actividad lítica de *N*-acetilmuramidasa (1).

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de extractos crudos contra *L. innocua*.

Muestra	Sobrenadante	Extracto de PGH	Extracto de bacteriocina
Actividad antimicrobiana (mm de halo de inhibición por mg de proteína)	700	492	214
Imagen de actividad antimicrobiana			

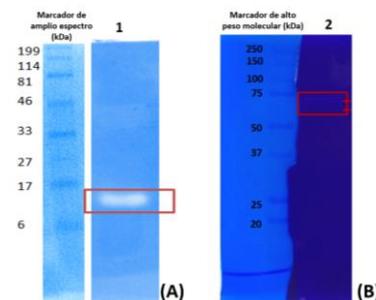


Fig. 2. Zimograma contra *M. lysodeikticus* (A) Tris-tricina al 16% y (B) Tris-glicina al 10%. 1, extracto de bacteriocina. 2, extracto de PGH.

Conclusiones. El uso de secuencias cortas del gen *recA* y la espectrometría de masas, fueron complementarios para la identificación de *L. paraplantarum*. La cepa presentó bandas de actividad lítica en zimograma, las cuales se deben a la producción de la proteína 50S ribosomal L14 y una *N*-acetilmuramidasa (PGH).

Bibliografía.

- [1] Salas Villagrán V.A. (2018). Tesis de Licenciatura, UNAM.
- [2] Palafox Berrios M. (2015). Informe de residencia profesional, TecNM.
- [3] Jordana-LLuch E. *et al.* (2012). Enferm Infecc Microbiol Clin. 30 (10):635-644.
- [4] Endo A. *et al.* (2018). Int J Food Sci Nutr 0963-7486: 1-13.