

VII REUNIÓN DE LA RED ESPAÑOLA DE BACTERIAS LÁCTICAS

Participación de las bacterias lácticas en la salud humana y en la calidad alimentaria

TÍTULO: Utilización de la DGGE para identificar la microbiota resistente a antibióticos en queso y estudiar su evolución a lo largo del tiempo

Autores: Ana Belén Flórez, Susana Delgado, Lucía Guadamuro y Baltasar Mayo

Dirección: Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias

RESUMEN

Introducción

El incremento de microorganismos patógenos y oportunistas resistentes a antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública a escala mundial, ya que complica y encarece el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Levy and Marshall, 2004). La presión selectiva ejercida por la utilización masiva de antibióticos en la práctica clínica y veterinaria, y su empleo abusivo como agentes profilácticos y promotores del crecimiento en ganadería, acuicultura y agricultura ha favorecido la aparición y transferencia de las resistencias (Chadwick and Goode, 1997). De forma frecuente, los genes de resistencia se disponen en elementos genéticos móviles (plásmidos y transposones) con gran capacidad infectiva entre células saltando las barreras de especie y género.

La resistencia a antibióticos en los microorganismos comensales y beneficiosos presentes en los alimentos y en el tracto gastrointestinal no constituye en sí misma una preocupación. Sin embargo, estas poblaciones podrían servir de reservorios de determinantes de resistencia transferibles a los patógenos. De hecho, varios autores creen que la cadena alimentaria es uno de las principales vías de transmisión, sea durante la elaboración de los alimentos o tras el consumo durante el tránsito intestinal (Teuber et al., 1999; Salyers et al., 2004).

En el pasado, la identificación de las poblaciones microbianas resistentes a antibióticos se ha realizado cultivando los microorganismos resistentes y analizándolos de forma individual. En la actualidad se ensayan diversos métodos moleculares independientes de cultivo para la detección y cuantificación de las poblaciones resistentes. Una de las técnicas más populares es la DGGE. Esta técnica permite identificar de manera sencilla las poblaciones mayoritarias y se utiliza corrientemente para la caracterización de fermentaciones alimentarias (Giraffa y Neviani, 2001).

Objetivos

El queso Cabrales es el más reconocido de los quesos asturianos y al igual que otros quesos elaborados con leche cruda presenta una gran complejidad microbiana en el que numerosas poblaciones interactúan y evolucionan a lo largo de la elaboración y maduración (Núñez, 1978; Marcos y col., 1985; Flórez y col., 2004). Por esta razón, consideramos que es un buen modelo para el estudio de la resistencia a antibióticos en productos lácteos.

En este trabajo se exploran las posibilidades de la técnica DGGE para estudiar la composición de las poblaciones resistentes a tetraciclina en el queso de Cabrales y su evolución a lo largo de su elaboración y maduración.

Materiales y Métodos

Análisis microbiológico. En primer lugar se llevó a cabo un estudio microbiológico convencional en muestras de queso de 3, 5, 15, 30 y 60 días de maduración utilizando medios selectivos y diferenciales, suplementados o no con tetraciclina para el recuento de microorganismos resistentes y sensibles de distintos grupos microbianos.

DGGE. Se ha utilizado la técnica independiente de cultivo DGGE para el estudio de la diversidad de los principales grupos microbianos resistentes a tetraciclina.

Resultados y Discusión

El análisis microbiológico de las distintas muestras de queso Cabrales mostró niveles de resistencia a tetraciclina a

lo largo de todo el periodo de maduración. En general, a lo largo de periodo de maduración del queso de Cabrales los recuentos microbiológicos en los medios no suplementados con tetraciclina fueron 1 o 2 unidades logarítmicas superiores a aquellos recuentos obtenidos en los medios que contenían tetraciclina, estos datos sugieren que aproximadamente el 1-10% de los microorganismos cultivables son resistentes a tetraciclina. El nivel de resistencia cuantificado en los distintos grupos microbianos fue de: 10^8 - 10^6 ufc/gr de queso en los recuentos de bacterias mesófilas aerobias (PCA); 10^8 - 10^5 ufc/gr de queso en los recuentos de bacterias lácticas (MRS); 10^6 - 10^2 ufc/gr de queso en los recuentos de enterobacterias (VRBGA) y 10^5 - 10^2 ufc/gr de queso en los recuentos de estafilococos (BP). Las bacterias lácticas muestran niveles de resistencia a tetraciclina estables a lo largo del proceso de maduración con diferencias en los recuentos de 1-2 unidades logarítmicas. Sin embargo, las poblaciones totales y resistentes de enterobacterias y estafilococos muestran descensos en los recuentos de hasta 3-5 unidades logarítmicas.

Para determinar la dinámica poblacional a lo largo de la maduración del queso de Cabrales tanto en las poblaciones totales como en aquellas poblaciones fenotípicamente resistentes a tetraciclina se empleó la DGGE utilizando como secuencias diana los genes que codifican el ARNr 16S. Los perfiles de DGGE obtenidos de las placas de recuentos con y sin antibiótico fueron muy diferentes. Las poblaciones totales procedentes de las placas de PCA fueron mayoritariamente *Lactococcus Lactis*, *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus plantarum*. Por contra, entre las poblaciones resistentes a tetraciclina en este mismo medio no aparece *Lb. plantarum* y sí *Staphylococcus* spp. y especies de *Enterobacteriaceae*. Las poblaciones mayoritarias detectadas en MRS fueron *Lc. lactis*, predominante en las primeras etapas de maduración, y *Lb. plantarum* mayoritario hasta el final de la maduración. El perfil de DGGE obtenido para las bacterias lácticas cultivables resistentes a tetraciclina fue completamente diferente. Una vez más no se encuentran lactobacilos resistentes y sí bandas que se corresponden con *Lc. lactis* y *Enterococcus faecalis*. En cuanto a las poblaciones detectadas por DGGE en las muestras cultivables totales de los medios VRBGA y BP destacan diversas enterobacterias (*Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Raoutella* spp., *Hafnia* spp., etc.) y *Staphylococcus* spp. Por el contrario, las poblaciones fenotípicamente resistentes a tetraciclina en estas mismas muestras se corresponden con *Escherichia coli* y *E. faecalis*.

Podemos concluir que en general las poblaciones bacterianas mayoritarias del queso de Cabrales parecen estar libres de resistencias a tetraciclina. Durante la fermentación y el inicio de la maduración, enterobacterias y *Staphylococcus* spp. constituyen las poblaciones resistentes mayoritarias. A éstas se unen las de los enterococos y *Lc. lactis* durante la maduración. **Las resistencias a otros antibióticos podrían seguir patrones similares al de la tetraciclina.**

La pasteurización de la leche y la utilización de fermentos libres de resistencias parecen medidas adecuadas para la bajar la carga de resistencias a antibióticos en el queso de Cabrales y en otros quesos tradicionales.

Bibliografía

- Chadwick, D.J., y Goode, J. 1997. Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ciba Foundation Symposium 207. Inc. New York: John Wiley & Sons.
- Giraffa, G., y E. Neviani. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. Int. J. Food Microbiol. 67:19-34.
- Levy, S.B., y Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance world-wide: causes, challenges and responses. Nat. Med. 10: 122-129.
- Salyers, A.A., Gupta, A., y Wang, Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends Microbiol. 12: 412-416.
- Teuber, M., Meile, L., y Schwarz, F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van Leeuwenhoek 76: 115-137.

PALABRAS CLAVE: Resistencia a antibióticos, tetraciclina, técnicas independientes de cultivo, DGGE, productos lácteos, queso.