



Implementación de códigos de barras genéticos en un probiótico microbiano. Reporte de caso

Genetic barcodes implementation in a microbial probiotic. Case reports

Víctor Camilo Pulido-Blanco¹

¹M.Sc. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia, Centro de Investigación Tibaitatá, sede Tunja - Boyacá, Colombia; e-mail: vpulido@agrosavia.co;  <https://orcid.org/0000-0002-1217-6877>

Cómo citar: Pulido-Blanco, V.C. 2020. Implementación de códigos de barras genéticos en un probiótico microbiano. Reporte de caso. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 23(2):e1172. <http://doi.org/10.31910/rudca.v23.n2.2020.1172>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada de Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional.

Recibido: Mayo 5 de 2020 **Aceptado:** Diciembre 2 de 2020 **Editado por:** Ingeborg Zenner de Polanía

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales (AF) son fisiológicamente útiles para el hombre y los animales, dado que aportan nutrientes esenciales que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de enfermedad (FAO, 2002; Aranceta & Gil, 2010). Los AF incluyen los probióticos, prebióticos y simbióticos, siendo los primeros, los más relevantes, por su incidencia, uso y beneficios en las actividades humanas y en los que recae la más sólida evidencia científica (Rodríguez *et al.* 2004; Arvanitoyannis & Van Houwelingen-Koukaliaroglou, 2005; Santillán-Urquiza *et al.* 2014).

La Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen a los probióticos como microorganismos vivos que, administrados en cantidades suficientes, proveen efectos benéficos en la salud del huésped (FAO, 2002; Mariño García *et al.* 2016). El Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, mediante Resolución No. 00375 del 27 de febrero del 2004, exigió que los bioproductos, a partir de microorganismos que entran al mercado, deben estar caracterizados molecularmente, demandando

su identificación, a nivel de género y especie (ICA, 2004), actividad que busca contrarrestar el creciente fenómeno de biopiratería, que experimenta la región (Acosta & Martínez, 2015; Silvestri, 2015).

Siguiendo tal lineamiento, en este trabajo, se establece la huella genómica basada en las secuencias del ADN_r 16S, marcador más común, para realizar estudios taxonómicos en bacterias (Valenzuela-González *et al.* 2015) y del gen *rpoB*, cuyas secuencias resultantes suelen ser de mayor calidad que las del gen del ADN_r 16s (Bou *et al.* 2011), a través del encriptamiento en un código de barras, para la protección intelectual y el control de calidad del probiótico Rumitec® (Agrosavia, 2018), para terneros neonatos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento de las cepas. Las tres cepas componentes del probiótico C2, B9 y G8, crecieron en medio caldo anaerobio glucosa-celobiosa al 0,1% p/v, para bacterias anaerobias ruminales, bajo la técnica de Roll Tube, descrita por Hungate (1969). Se realizaron 3 réplicas por cepa al 10%, a partir de inóculo proveniente de criopreservados del Banco de Germoplasma de Nutrición Animal de la Corporación

Colombiana de Investigación Agropecuaria, Agrosavia. Estas fueron cultivadas a 39°C, durante 18 horas.

Extracción de ADN de las cepas del probiótico. Se ensayaron dos metodologías de extracción de ADN: 1) Extracción basada en el protocolo de la Agencia Internacional para la Energía Atómica (Rodríguez *et al.* 2004) y 2) Extracción basada en el protocolo comercial Ultra Clean Kit Mo Bio® 2012. Se realizó cuantificación con espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Spectrofotometer v. 3.3.0, usando 2uL de muestra, medidos a una absorbancia de 260 nanómetros.

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa del 16s y el rpoB. Se usaron los oligonucleótidos 27F: 5'- AGA GTT TGA TC (A:C) TGG CTC AG -3'; 1492R: 3'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -5', para el ADNr 16s, con un tamaño de amplificación de 1490pb (James, 2010) y rpoB Long F: 5'- GCG AAC ATG CAA CGT CAG GC -3'; rpoB Long R: 3'- AGT GCC CAT ACT TCC AT -5', con un tamaño de amplificación de 600pb (Perumbakkan & Craig, 2011). Tanto la amplificación del 16s como del gen rpoB, se realizó sobre un volumen final de reacción de 25uL, (Rodríguez *et al.* 2004). Los programas de temperaturas fueron: desnaturalización inicial a 95°C x 2 y 9min; desnaturalización a 95°C x 30 y 20s; anillamiento a 57°C x 30s y 53°C x 40s; extensión a 72°C x 1 y 1,5min y extensión final a 72°C x 7 y 10min, respectivamente.

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% p/v, teñidos con Sybr Safe Invitrogen® 0,5uL en 40mL de gel. Se sembraron 5uL de ADN con 2uL de Orange G. El tiempo de electroforesis fue de 30min, a 80 voltios, corrido en TAE 1x. El control negativo en todos los casos consistió en agua grado molecular. El marcador de peso usado fue 1Kb ladder, de Invitrogen®; de 12 a 0,25kb, 2uL por pozo. Todas las imágenes fueron registradas con el documentador Molecular imager® Gel Doc™ System con imagen Lab™ software y QuantityOne 4.6.5 software.

Análisis de restricción. Se usaron las endonucleasas de restricción de corte frecuente *AluI*, *HaeIII*, *RsaI* y *MseI*. Para el gen rpoB, se realizó una reacción de 10uL, 1uL de Buffer 10x, 0,1uL de BSA al 100%, 0,4uL de cada enzima, a 5U/uL, 5,0uL, de producto de PCR a ~400ng/uL y 3,5uL, de agua grado molecular. La reacción, se prolongó por 3 horas y media, a 37°C. La digestión, se visualizó en un gel de agarosa al 2,5% p/v, corrido a 100 voltios, durante 1 hora y media. Se sembró todo el producto de la digestión, con 3uL de buffer de carga. Con los productos de PCR del 16s, se realizó una reacción a 20uL, 2uL de Buffer 10x, 0,2uL de BSA al 100%, 0,5uL de cada enzima a 5U/uL, 10uL de producto de PCR a ~400ng/uL y 7,3uL, de agua grado molecular. La reacción, se prolongó por 3 horas y media, a 37°C. La digestión, se visualizó en un gel de agarosa al 2,5% p/v, corrido a 60 voltios, durante 2 horas. Todo se documentó con los programas Molecular imager® Gel Doc™ System, imagen Lab™ software y QuantityOne 4.6.5 software.

Secuenciación. Las reacciones de secuenciación, se realizaron en las direcciones 5' a 3' y 3' a 5', según lo estipulado por la empresa privada Corpogen® (Rodríguez *et al.* 2004; Vargas, 2020). El análisis

de las secuencias, se realizó mediante BLASTN de la base de datos GeneBank, del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI) y del Ribosomal Data Project (RDP). Se tuvieron en cuenta los índices *Bit scores* y *E-value*, para los análisis (Ude *et al.* 2020; Altschul *et al.* 1997).

Encriptamiento en código de barras. Se codificaron las secuencias de los genes ADNr 16s y rpoB de cada cepa, con el programa BarCodeMagic® (Zhou & Piramuthu, 2017), usando la simbología tipo código 128, para la generación de códigos bidimensionales y QR estáticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de las cepas y Extracción de ADN de los componentes del probiótico. Se alcanzó el crecimiento de colonias viables, a partir de las 6 horas posteriores a la inoculación; no obstante, la cepa B9 tuvo crecimiento negativo y fue reactivada en medio glucosa al 1%, previa a su inoculación en caldo anaerobio glucosa-celobiosa. Las otras cepas componentes del probiótico, se caracterizaron por manifestar un amplio rango de actividades metabólicas, desde celulolítica y hemicelulolítica hasta amilolítica y proteolítica (Aldana *et al.* 2009). Los crecimientos en caldo anaerobio glucosa-celobiosa al 0,1% p/v fueron exitosos para las cepas C2 y G8, componentes del probiótico. La metodología de la IAEA mostró ser eficiente en la cantidad de ADN recuperado; sin embargo, el tiempo total invertido en la extracción y la purificación es un factor en contra, más aún, cuando la metodología por Kit ofrece resultados de pureza de ADN superiores; por tal, se escogió la metodología del Kit Mo Bio, con base en la facilidad, la practicidad y la velocidad de la extracción, sumado a la pureza del ADN obtenido.

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa del 16s y el rpoB. Se obtuvieron los amplicones en las bandas esperadas. No se observaron problemas de resolución de bandas ni artefactos en el gel; por tanto, los productos obtenidos sirvieron de insumo para las secuenciaciones. Debido al poco crecimiento de la cepa B9, se obtuvo poco ADN, lo que impidió sembrar pozos replicados durante las corridas en geles (Figura 1). Los programas de temperaturas del laboratorio de Microbiología Molecular de AGROSAVIA, para el ADNr 16S y de Perumbakkan & Craig (2011), para un fragmento del rpoB, son adecuados para la obtención de copias de las regiones de interés.

Análisis de restricción y secuenciación. En el perfil de restricción del ADNr 16S, la enzima *HaeIII* generó 19 bandas, con un polimorfismo del 15,8%; *RsaI*, 17 bandas, con un polimorfismo de 29,4%; *AluI*, 10 bandas, con un polimorfismo del 50% y, finalmente, *MseI* generó 15 bandas, con un polimorfismo del 20%. Por su parte, en el perfil de restricción del rpoB, la enzima *HaeIII* generó 9 bandas, con un polimorfismo del 33,3%; *RsaI*, 11 bandas, con un polimorfismo de 36,3%; *AluI*, 11 bandas, con un polimorfismo del 36,3% y *MseI* generó 9 bandas, con un polimorfismo del 55,5% (Figura 1).

Las enzimas escogidas para la PCR-RFLP han mostrado ser suficientemente discriminativas en varios trabajos (Mata *et al.* 2020;

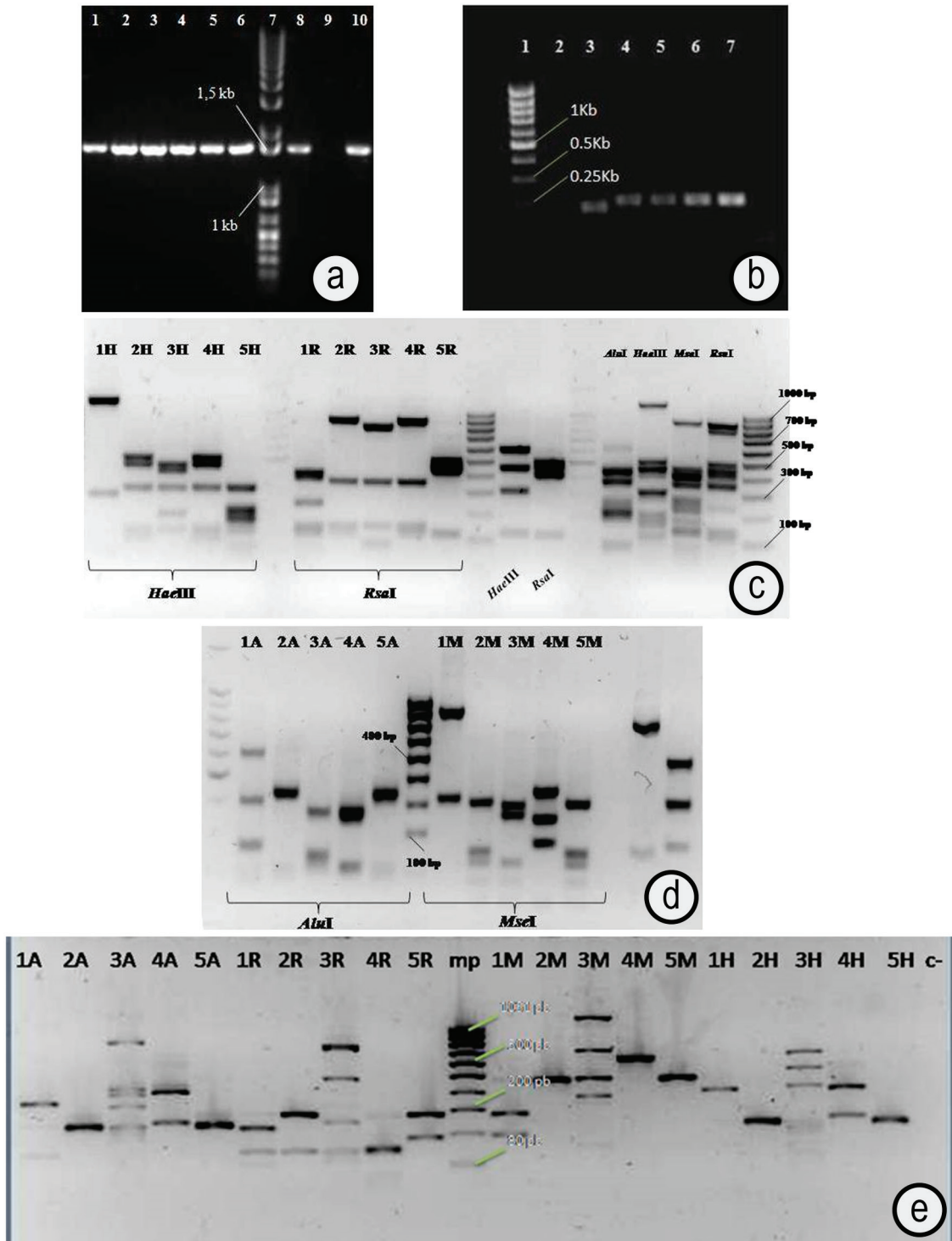
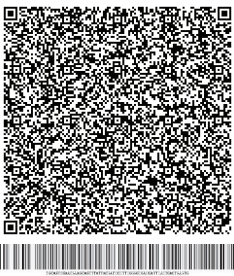

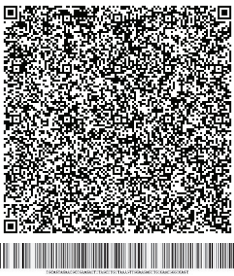

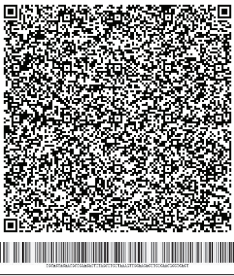

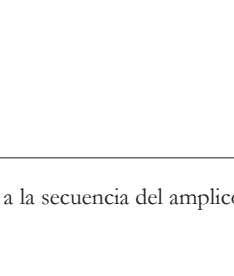


Figura 1. a. Amplificación de la región 16s del ADNr. 1: B9; 2 y 3: C2; 4 y 5: G8; 6: *Bacillus* sp.; 7: Marcador de peso 1Kb ladder Invitrogen®; 8: *Paenobacillus* sp.; 9: Control negativo; 10: *Paenobacillus* sp.; b. Amplificación de parte del gen rpoB (primers rpoB Long F y R, Perumbakkan & Craig (2011)). 1: Marcador de peso 1Kb ladder Invitrogen®; 2: Control negativo; 3: B9; 4 y 5: C2; 6 y 7: G8; c. Perfil de restricción del ADNr 16s con las enzimas HaeIII (H), RSA I (R). 1: B9; 2: C2; 3: *Bacillus* sp.; 4: *Paenobacillus* sp.; 5: G8; d. Perfil de restricción del ADNr 16s con las enzimas AluI y MseI I. 1: B9; 2: C2; 3: *Bacillus* sp.; 4: *Paenobacillus* sp.; 5: G8; e. Perfil de restricción del gen rpoB. A: AluI, R: RsaI, M: MseI, H: HaeIII; 1: B9; 2: C2; 3: *Bacillus* sp.; 4: *Paenobacillus* sp.; 5: G8.

Fallahizadeh *et al.* 2019; Jiménez *et al.* 2011), generándose perfiles de restricción ricos en polimorfismos únicos, suficientemente diferenciables, como para establecer una huella genómica reproducible; no obstante, los amplicones son más informativos que las restricciones, razón, por la cual, se usaron para generar los códigos. La estrategia permitió codificar una información mucho más exacta y fiable,

que ofrece reproducibilidad y moderada variación, en términos de identidad. Una vez se estableció la similitud de las secuencias editadas con el programa CLC-Workbench® contra las anotaciones de las bases de datos (Tabla 1), se corroboró la identidad de las cepas del probiótico. Dicha composición, ya se encuentra patentada y es pública (AGROSAVIA, 2018).

Tabla 1. Resultados de similitud y códigos de barras de las secuencias de los genes 16s y rpoB.

| BD | CEPA | Pb* | | SIMILITUD % | | ESPECIE (ACCESIÓN) | | Código*** | |
|------|------|------|------|-------------|-------|--|--|--|---|
| | | 16s | rpoB | 16s | rpoB | 16s | rpoB | 16s | rpoB |
| NCBI | B9 | 1388 | 729 | 98,70 | 92,70 | <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> KF156792.1 | <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> FP929036.1 |  |  |
| | C2 | 1416 | 391 | 99 | 98,47 | <i>Streptococcus bovis</i> AY442813.1 | <i>Streptococcus bovis</i> AF535189.1 |  |  |
| | G8 | 913 | 372 | 99,67 | 98,39 | <i>Ruminococcus flavefaciens</i> AM920691.1 | <i>Streptococcus</i> sp. CP046624.1 |  |  |
| RDP | B9 | 1388 | | 95,4 | | <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> AJ270493 | |  | |
| | C2 | 924 | | 95,9 | | <i>Streptococcus</i> sp. AF298199 | | | |
| | G8 | 913 | | 99,3 | | <i>Ruminococcus flavefaciens</i> AY445597 | | | |

*: Pares de bases. **: cepa contaminada con enterobacterias, descartada. ***: para acceder a la secuencia del amplicón basta con escanear el código.

Código de barras. Ambos códigos contienen toda la secuencia de cada cepa para cada gen y, en el caso del código QR, está vinculada la simbología con los caracteres de origen (Tabla 1). La inclusión del código QR responde a las tendencias en las cadenas logísticas de mercadeo que, actualmente, se dan en el mundo (Gonzalez-Argote & Garcia-Rivero, 2016), donde la protección de los bioinsumos ha

superado el nivel de especies-razas a la de individuo-secuencia. Con la conformación de estos códigos, se asegura un insumo importante, para contribuir a la estrategia de propiedad y protección intelectual de la mezcla probiótica, a la par, que se brinda una herramienta fiable de monitoreo de su pureza.

Agradecimientos: Este trabajo fue llevado a cabo bajo el programa Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda”, del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias), Colombia, bajo el Convenio Especial de Cooperación con la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA (en su momento Corpoica) COLCIENCIAS Y CORPOICA, 2011. El autor agradece a Agrosavia, por proveer los materiales, reactivos e instalaciones durante la estancia del becario; a Martha Carrero, por las secuencias del DNAr 16s de la cepa G8; a Fernando Rodríguez Villamizar, por la dirección, planeación, interpretación de los resultados y revisión de la versión final del manuscrito. **Conflicto de intereses:** El autor declara que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados. **Financiación:** Este estudio fue financiado bajo el programa Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Pineda”, del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias), Convenio Especial de Cooperación con la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA.

REFERENCIAS

- ACOSTA, A.; MARTÍNEZ, E. 2015. Biopiratería: La biodiversidad y los conocimientos ancestrales en la mira del capital. Ediciones Abya-Yala. Quito-Ecuador. 366p.
- ALDANA, C.; CABRA, S.; OSPINA, C.; CARVAJAL, F.; RODRÍGUEZ, F. 2009. Effect of a probiotic compound in rumen development, diarrhea incidence and weight gain in young Holstein calves. *World Academy of Science, Engineering and Technology*. 33:378-382.
- ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. <https://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- ARANCETA, J.; GIL, A. 2010. Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 216p.
- ARVANITTOYANNIS, I.; VAN HOUWELINGEN-KOUKALLIAROGLOU, M. 2005. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45(5):385-404. <http://dx.doi.org/10.1080/10408390590967667>
- BOU, G.; FERNÁNDEZ-OLMOS, A.; GARCÍA, C.; SÁEZ-NIETO, J.; VALDEZATE, S. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 29(8):601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- CORPORACIÓN COLOMBIANA DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA, AGROSAVIA. 2018. RUMITEC. Número del registro: 11786, Nombre del titular: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia. Mosquera, Cundinamarca, Colombia.
- FALLAHIZADEH, S.; ARJMAND, R.; JELOWDAR, A.; RAFIEI, A.; KAZEMI, F. 2019. Determination of *Echinococcus granulosus* genotypes in livestock slaughtered in Shush County, Southwest Iran using PCR-RFLP. *Helminthologia*. 56:196-201. <http://dx.doi.org/10.2478/helm-2019-0023>
- FAO. 2002. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO alimentación y nutrición 85. 52p.
- GONZALEZ-ARGOTE, J.; GARCIA-RIVERO, A. 2016. Códigos QR y sus aplicaciones en las ciencias de la salud. *Rev. Cubana de Información en Ciencias de la Salud*. 27(2):239-248.
- HUNGATE, R. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. En: Norris, J.R.; Ribbons, D.W. *Methods in Microbiology*. Academic New York. 117p.
- ICA INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. 2004. Resolución No. 00375 (27 de febrero de 2004) por la cual se dictan las disposiciones sobre Registro y Control de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia. 34p.
- JAMES, G. 2010. Universal Bacterial Identification by PCR and DNA Sequencing of 16S rRNA Gene. In: Schuller, M.; Sloots, T.; James, G., Halliday, C.; Carter, I. (eds). *PCR for Clinical Microbiology*. p.209-214. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9039-3_28
- JIMÉNEZ, D.; MONTAÑA, J.; MARTINEZ, M. 2011. Characterization of Free Nitrogen Fixing Bacteria of The Genus *Azotobacter* In Organic Vegetable-Grown Colombian Soils. *Brazilian J. Microbiology*, 42:846-858. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000300003>
- MARIÑO-GARCÍA, A.; NÚÑEZ-VELÁZQUEZ, M.; BARRERO-PENIÉ, J. 2016. Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. *Acta Médica de Cuba*. 17(1):1-21.
- MATA, W.; CHANMALEE, T.; PUNYASUK, N.; THITAMADEE, S. 2020. Simple PCR-RFLP detection method for genus- and species-authentication of four types of tuna used in canned tuna industry. *Food Control*. 108:106842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106842>
- MO BIO®, LABORATORIES INC. 2012. Power Soil^{1m} DNA Isolation Kit – Intruccion manual Mo BIO®, versión

05182007. Disponible desde Internet en:
<http://ambiosci.com/protocols/PowerSoil-Flyer.pdf> (con acceso 12/03/2019)
18. PERUMBAKKAM, S.; CRAIG, A.M. 2011. Design and *in vitro* evaluation of new rpoB-DGGE primers for ruminants. *FEMS Microbiol Ecol.* 76(1):156-169.
<http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01042.x>
 19. RODRÍGUEZ, S.; SANABRIA, G.; RODRÍGUEZ, F. 2004. Protocolo Para el Envío de Muestras a Secuenciación. Laboratorio de Microbiología Molecular (LMM). Programa de Fisiología y Nutrición Animal. Corpoica Tibaitatá. Mosquera, Colombia. 11p.
 20. SANTILLÁN-URQUIZA, E.; MÉNDEZ-ROJAS, M.; VÉLEZ-RUIZ, J. 2014. Productos lácteos funcionales, fortificados y sus beneficios en la salud humana. Temas selectos de ingeniería de alimentos. 8(1):5-14.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.2999980>
 21. SILVESTRI, L. 2015. La conservación de la diversidad genética argentina: tres desafíos para implementar el régimen de acceso a los recursos genéticos y la distribución de los beneficios. *Ecología Austral.* 25(3):273-278.
<https://doi.org/10.25260/EA.15.25.3.0.92>
 22. UDE, G.; IGWE, D.; BROWN, C.; JACKSON, M.; BANGURA, A.; OZOKONKWO-ALOR, O.; IHEARAHU, O.; CHOSEN, O.; OKORO, M.; ENE, C.; CHIEZE, V.; UNACHUKWU, M.; ONYIA, C.; ACQUAAH, G.; OGBONNA, J.; DAS, A. 2020. DNA barcoding for identification of fish species from freshwater in Enugu and Anambra States of Nigeria. *Conservation Genetics Resources.* 1:1-16.
<https://doi.org/10.1007/s12686-020-01155-7>
 23. VALENZUELA-GONZÁLEZ, F.; CASILLAS-HERNÁNDEZ, R.; VILLALPANDO, E.; VARGAS-ALBORES, F. 2015. El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas.* 41(4):297-313.
<http://dx.doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
 24. VARGAS, Y. 2020. Secuenciación Sanger. Protocolo. Departamento de Laboratorios de Investigación y Servicios. AGROSAVIA, Tibaitatá. Mosquera. 11p.
 25. ZHOU, W.; PIRAMUTHU, S. 2017. Identification shrinkage in inventory management: an RFID-based solution. *Annals of Operations Research.* 258(2):285-300.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10479-015-2022-2>