

Carrera de Bioquímica Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia-UNS
Práctica de Investigación Bioquímica (optativa)
Código de la Materia: Carga horaria: 50 horas
Profesor –Investigador: Dra. Lorena Brugnoni Asistente/Ayudante de docencia:
Asignatura (s) Obligatoria (s) Aprobada /Cursada(s): Aprobadas: Microbiología General y Bacteriología y Micología.
Lugar de Trabajo (Laboratorio /Instituto) (Laboratorio /Instituto) Laboratorio de Microbiología Industrial y de los Alimentos, 12 de octubre 991.
Título del Proyecto de Investigación Acreditado: El desafío de los biofilms mixtos en la industria alimentaria: compuestos de origen microbiano como estrategias de biocontrol. Código Proyecto: PICT 2020 Serie A 00377. Director: Dra. Lorena Brugnoni
<p>Resumen del Proyecto</p> <p>La adhesión de los microorganismos a las superficies en contacto con alimentos y la subsecuente formación de biofilms es la causa principal de contaminación del producto final, comprometiendo la calidad microbiológica del producto, la salud del consumidor y la vida comercial del mismo. Uno de los mayores riesgos para la industria alimentaria es la inclusión de bacterias patógenas en biofilms pre-existentes formados por la microbiota residente que coloniza las superficies de las plantas elaboradoras de alimentos, siendo de especial importancia aquellas responsables de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), tales como <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella enterica</i>. Los procesos tradicionales de sanitización utilizados para reducir o eliminar los microorganismos adheridos sobre las superficies de producción presentan conocidas desventajas, como la toxicidad de los agentes químicos utilizados y la promoción de resistencia y/o tolerancia microbiana a los mismos. Esta última es una de las principales causas de persistencia de patógenos sobre las superficies de producción y un problema de salud a nivel mundial, por lo que la utilización de nuevas estrategias de biocontrol de biofilms basadas en sustancias naturales producidas por microorganismos representan alternativas promisorias.</p> <p>En la actualidad, la mayor parte de los estudios y el desarrollo de aplicaciones prácticas de antagonismo microbiano se han enfocado en las bacterias lácticas o en productos de su metabolismo, como son las bacteriocinas. Estudios sobre el uso de bacteriocinas para el control de biofilms evidencian el potencial promisorio de las mismas debido a su elevada eficiencia, resistencia al calor y a las variaciones de pH. Además, presentan un amplio espectro de inhibición frente a microorganismos contaminantes y patógenos y son consideradas GRAS (<i>Generally Recognized As Safe</i>) o de grado alimentario.</p> <p>A tal fin, se propone en este plan de trabajo evaluar la eficacia de dos bacteriocinas termoestables (<10 KDa), lactocina 705 producida por <i>Latilactobacillus curvatus</i> CRL705 y nicina producida por <i>Lactococcus lactis</i> CRL1109, como agentes biosanitizantes para prevenir y/o erradicar biofilms formados por microorganismos patógenos asociados a ETA.</p>
<p>Plan de trabajo (resumido)</p> <p>Se propone evaluar el efecto de dos bacteriocinas, lactocina 705 y nicina sobre microorganismos patógenos causantes de ETA para prevenir y/o erradicar biofilms en comunidades mixtas.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Determinar cualitativamente el efecto de las bacteriocinas sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>E. coli</i> O157:H7 (EDL 933), <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 (serotipo 1/2c), <i>L. monocytogenes</i> FBUNT (serotipo 4b), <i>L. innocua</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mediante ensayos de difusión en agar. -Establecer cuantitativamente la actividad de la/s bacteriocina/s expresada como unidades arbitrarias por mililitro (UA/ml) en aquellos microorganismos donde se observe efecto inhibitorio. -Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM). -Evaluar el efecto antagonista de las bacteriocinas en la formación de biofilms por bacterias patógenas en superficies de la industria alimentaria (acero inoxidable). <p>Hipótesis de trabajo:</p> <ul style="list-style-type: none"> -El uso de bacteriocinas con actividad frente a bacterias patógenas evita y/o mitiga la formación de biofilms en comunidades mixtas. <p>Metodología:</p> <p>1. Determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas.</p>

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas a una concentración de 1 mg/ml se evaluará mediante el método de difusión en agar. Tubos conteniendo 10 mL de caldo Tripticasa Soja (TSB) + 0,5 % de extracto de levadura (EL) + 0,7% de agar serán inoculados con 10 µL de un cultivo overnight de las bacterias a una concentración final de 10⁶ células/ml. El contenido se colocará en una placa de Petri hasta solidificar y luego se sembrarán 5 µL de cada bacteriocina. Las placas se incubarán sin invertir a 35-37 °C durante 24 h. La presencia de halos de inhibición de crecimiento alrededor de los puntos sembrados indicará reacción cualitativa positiva. Aquellos microorganismos sobre los que la/las bacteriocina/s tengan acción inhibitoria, serán utilizados para las determinaciones detalladas en los ítems 2, 3 y 4.

2. Determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas.

La titulación de la/s bacteriocina/s que presente/n actividad inhibitoria sobre los microorganismos ensayados en el ítem 1 se llevará a cabo en base al siguiente protocolo: a partir de un cultivo celular obtenido según se detalla en el ítem 1, se inocularán 10 mL de medio TSB+EL (0,7% agar) en una concentración final de 10⁶ células/mL y serán vertidos en una placa de Petri. A partir de una solución stock de la bacteriocina concentrada (1 mg/mL) se realizarán diluciones sucesivas (hasta 1/2048) y se sembrarán 5 µL sobre placas ya solidificadas. Las placas se incubarán sin invertir a 35-37 °C durante 24 h. El título se expresará como unidades arbitrarias (UA) por mL y se calculará como la inversa de la máxima dilución de la bacteriocina con actividad inhibitoria (observación del halo de inhibición), dividido en los mililitros sembrados:

$UA/ mL = (1/ mL sembrados) \times (1/máxima dilución con actividad inhibitoria)$

3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM).

La CIM para la/s bacteriocina/s que presente/n actividad frente a las bacterias ensayadas en el ítem 1 se realizará por el método de dilución en caldo Muller Hinton (MH). Brevemente, se colocarán concentraciones decrecientes de la bacteriocina en tubos con caldo MH. Luego, se colocará un inóculo bacteriano de 10⁵ UFC/mL y se incubará a 37 °C durante 24 h. Se realizarán los correspondientes controles positivos (MH + inóculo bacteriano) y negativos (MH + antimicrobiano). La CIM se determinará por observación directa y se establecerá como la menor concentración del antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible.

Para establecer la CBM, se tomarán alícuotas de los tubos que no presenten crecimiento visible en la CIM, se realizarán diluciones seriadas y se sembrarán en profundidad en un medio de crecimiento adecuado. Las placas se incubarán a 37 °C durante 48 h. Después de la incubación, se observará la presencia de colonias en las distintas placas para determinar el efecto bactericida. La CBM se define como la mayor dilución del antimicrobiano que produce la muerte del 99,99% de los microorganismos viables, evidenciado por la ausencia de colonias.

3. Actividad anti-biofilm

Una vez establecida la CIM sobre los microorganismos blanco, los mismos se ensayarán en distintos estadios de formación de biofilms.

Las bacterias se cultivarán a 35-37 °C durante 24 h en medios que sustenten el crecimiento. Luego, las células se colectarán por centrifugación a 1200 x g por 5 min, se lavarán con buffer fosfato salino (PBS) y se resuspenderán en medio TSB hasta una concentración final de 10⁵ UFC/ml.

La suspensión ajustada de los microorganismos se colocará sobre las superficies de acero inoxidable junto con la bacteriocina a su correspondiente CIM durante 24 h a 37°C. Transcurrido el tiempo, las superficies se enjuagarán con PBS. Se incluirán muestras controles reemplazando los tratamientos por volúmenes similares de solución fisiológica. El número de microorganismos adheridos se evaluará mediante recuento en placa, y la estructura y organización de los biofilms mediante microscopía.

Descripción de las Actividades a realizar:

El alumno participará en la realización de las tareas básicas de un laboratorio de microbiología: esterilización por calor (autoclave) de material y medios de cultivo, preparación de soluciones y buffers mediante esterilización por filtración. Asimismo, realizará las determinaciones microbiológicas asociadas a los ensayos: técnica de recuento en placa en medios comunes, selectivos, diferenciales y cromogénicos.

Recibirá entrenamiento en técnica aséptica y preparación de muestras para microscopía.

Realizará la búsqueda e interpretación de artículos científicos.

Participará en el desarrollo de protocolos experimentales, analizará los datos en conjunto con el investigador responsable y elaborará un informe del trabajo realizado aplicando análisis estadístico.

Cuatrimestre: Segundo

Cupo de alumnos: 1

Carga horaria semanal: 5 h

Modalidad de Evaluación:

- Entrega de un informe con formato de trabajo científico
- Exposición Oral: Se realizará en presencia de todos los alumnos de la materia y los profesores respectivos y al menos un integrante de la CCB (hasta 15 minutos)