

## EFFECTO DE LA NISINA SOBRE LA LUMINISCENCIA DE *Listeria monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-P<sub>hlyA</sub>

Vázquez-García, A.<sup>a</sup>, De la Fuente-Salcido, N. M.<sup>b</sup>, Patiño Galván H.<sup>c</sup> y Salcedo-Hernández, R.<sup>d,\*</sup>

- a) Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ing. Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km. 12.5, C.P. 36821, Gto, Irapuato.
- b) Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Coahuila, México.
- c) Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad Químicas, Ciencia y Tecnología de Alimentos, <sup>d,\*</sup>Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, Departamento de Alimentos. CAC Biotecnología Agrícola. Irapuato, Gto., México. [salcedo@ugto.mx](mailto:salcedo@ugto.mx)

### RESUMEN

La nisina es un antibiótico muy importante para la industria alimentaria, por lo que contar con un método rápido y confiable es deseable. Para desarrollar una forma de medir la nisina se estudió su efecto sobre la luminiscencia en *L. monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-P<sub>hlyA</sub>, una cepa recombinante con luminiscencia constitutiva. Los experimentos mostraron que la nisina produce un aumento significativo de la luminiscencia de 10 a 150 veces en presencia de 40 UI mL<sup>-1</sup>, en una fase inicial sigmoide, seguido de un decaimiento con dos componentes exponenciales. Se mostró que condiciones de estrés por frío aumenta la respuesta luminosa de las células. El aumento inicial de la luminiscencia inducida por nisina podrá permitirnos desarrollar un método rápido para la determinación de nisina, tanto en cultivos lactobacterinos como en alimentos.

### ABSTRACT

Nisin is an important antibiotic for the food industry, for that reason is essential to have a method for nisin quantification. In order to have a measurement way it was studied the nisin effect on the bioluminescence of *L. monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-P<sub>hlyA</sub>, a recombinant strain with constitutive luminescence. Experiments shown a significant luminescence as a response to nisin, an initial sigmoidal signal rise between 10 to 150 times was induced by nisin 40 UI ml<sup>-1</sup> follow by an extinction with two exponential components, as well it was shown a bigger response from cold stressed cells. The nisin induced initial luminescence rise will allow us to develop a nisin quantification fast method for food samples as well as lactic culture samples.

**Palabras clave:** Bioluminiscencia, nisina, *Listeria monocytogenes*.

**Área:** Microbiología y Biotecnología

### INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas con péptidos de origen ribosomal que producen las bacterias para competir con otras especies en su medio ambiente natural, son un interesante objeto de estudio debido a que son muy específicas contra bacterias y no tienen

efecto en los mamíferos, por lo que su uso como aditivo para alimentos es un área de investigación muy activa. Actualmente la única bacteriocina autorizada como aditivo en alimentos es la nisina, por lo que su cuantificación es necesaria para la mayoría de las pruebas relacionadas con su caracterización y la cantidad contenida en alimentos (de Vust & Vandamme, 1994). Varios métodos han sido usados para la cuantificación del lantibiótico nisina, los métodos para el ensayo de actividad de las bacteriocinas son usualmente derivados de modificaciones al procedimiento tradicional por difusión de pozos o bien por difusión de discos impregnados con los antimicrobianos en agar. Las modificaciones de estos métodos y los métodos fotométricos son las metodologías más utilizadas y/o sus adaptaciones para cuantificar la actividad de las bacteriocinas. Además los métodos basados en la conductancia y bioluminiscencia han sido usados con menos frecuencia, no obstante, pueden representar una alternativa para determinar más rápida y efectivamente la actividad de las bacteriocinas (Reid *et al.*, 1990). En el laboratorio hemos desarrollado un método para cuantificar la bacteriocinas (de la Fuente-Salcido N, *et al.* 2012), sin embargo debido a diferencias importantes en el mecanismo de acción de la nisina, el método no fue aplicable (Salcedo *et al.*, 2014. publicación en preparación). Brevemente, el mecanismo propuesto para la nisina es de doble acción, inicia uniéndose al lípido II de la membrana bacteriana (cuyo residuo hidrofílico está involucrado en la síntesis de la pared celular, por lo que altera la síntesis de la pared causando lisis celular), al alcanzar una concentración crítica varias moléculas de nisina (posiblemente complejos lípido II-nisina), forman una estructura parecida a un canal iónico, el cual disipa el potencial electroquímico de la membrana bacteriana (dicho potencial es esencial para la homeostasis celular, de él depende el equilibrio iónico intracelular y parte importante del transporte de nutrientes y desechos celulares). El canal (o poro) formado por la nisina es temporal, se abre en presencia de potencial de membrana y se cierra al disiparse. Puntualizando, el mecanismo de la nisina es doble: un efecto lento, al alterar la síntesis de la pared provoca el rompimiento de la bacteria y un efecto rápido; la despolarización de la membrana. ¿Cuál es más importante?, depende del tipo de bacteria y de su estado de desarrollo (Gut *et al.* 2011).

En este trabajo presentamos experimento preliminares conducentes a detectar y cuantificar la nisina, utilizando la bacteria bioluminiscente, *Listeria monocytogenes* EGD-e::pPL2*lux*-P<sub>hlyA</sub>. La cepa de *Listeria* utilizada contiene el operón lux integrado al cromosoma y la expresión de la bioluminiscencia es constitutiva, se detecta la mayor bioluminiscencia al llegar a la fase estacionaria (Peter A. Bron, *et al.* 2006). Se presentan datos que muestran que la nisina inhibe la bioluminiscencia lentamente (más de 30 minutos), sin embargo se detectó un importante estímulo de la producción de luz en tiempos cortos (ente 3 y 6 minutos), el aumento de la

bioluminiscencia pareció ser más apropiado para el desarrollo de una técnica para cuantificar nisina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de crecimiento de la cepa indicadora, a partir de una colonia aislada de *Listeria monocytogenes* EGD-e::pPL2*lux-P<sub>hlyA</sub>* se cultivó en LB – cloranfenicol  $7.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , se incubó por 20 h,  $37^\circ\text{C}$  y 180 rpm. Preparación de nisina, 50 mg nisina (Sigma Co.) se disolvió en 5 mL de ácido cítrico 10 mM, se mantuvo protegida de la luz, en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso. Determinación de Luminiscencia, de un cultivo en fase estacionaria (20 horas) se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  y se depositaron en tubos eppendorff, la luminiscencia se midió directamente en el tubo agitando antes de medir en un luminómetro GloMax Multi Jr de Promega, en alícuotas similares se hicieron las adiciones (ver resultados y discusión). El fondo del instrumento (un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL con 500  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo) varió entre 70 y 100 UA (Unidades Arbitrarias). Se midió la luminiscencia producida por la cepa *L. monocytogenes* en los tiempos indicados en las gráficas. La luminiscencia del control positivo (500  $\mu\text{L}$  de cultivo en fase estacionaria) no varió significativamente durante el tiempo experimental. Se utilizó el desacoplante m-chlorophenylhydrazine (CCCP) 5  $\mu\text{M}$  como control negativo, este añadido al cultivo al momento de medir la bioluminiscencia. Para el análisis de las gráficas se utilizó el programa OriginPro SR0 ver. 8.07224.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bacterias luminiscentes mostraron una emisión de luz basal baja, de no más de 30 veces el fondo del luminómetro, en el rango de 500 a 3000 UA y ocasionalmente hasta 6000 UA. Desafortunadamente, debido a las características técnicas de los luminómetros, no fue posible comparar directamente nuestros datos con los reportados por Peter A. Bron, *et al.* 2006. Debido al mecanismo de acción de la nisina sobre las bacterias blanco (Heike and Hanz-Georg. 2000), se esperaba medir una disminución de la luminiscencia producida por la cepa de *L. monocitogenes*. En el control negativo con el desacoplante CCCP la luminiscencia aumentó ligeramente, de 540 a 1059 UR, posteriormente disminuyó lentamente y se mantuvo constante alrededor de 850 UR. Este resultado nos indica que la reserva energética de las bacterias es mayor de lo esperado; en presencia del desacoplante CCCP no hay potencial de membrana y por lo tanto los niveles de energía (necesarios para la producción de fotones por la luciferasa y por supuesto, fundamental para la homeostasis celular) tendrían que bajar. La persistencia de la luminosidad en las células nos indica que los niveles metabólicos no se abaten por completo.

A pesar de la señal tan baja que se tuvo inicialmente (alrededor de 1000 UA con un fondo de alrededor del 10%), se midió el efecto de la nisina sobre la luminiscencia del cultivo. Los resultados esperados fueron una disminución de la luz producida. Sin embargo la respuesta celular fue totalmente opuesta al resultado esperado, la nisina indujo un aumento muy importante en la luminiscencia de las bacterias, ver

Figura 1. El aumento de la bioluminiscencia en los primeros minutos podría deberse a una respuesta al estrés por parte de *L. monocytogenes*, se podría inducir el aumento de la actividad de la luciferasa “acoplado” a la respuesta al estrés de la propia bacteria. Así como la disminución posterior de la luminiscencia podría deberse al agotamiento de los metabolitos celulares, inducido por la actividad de la nisina. .

El análisis detallado del comportamiento de la respuesta celular a la nisina, mostró un curso temporal con tres componentes:

- El primer componente fue un aumento rápido de la emisión de luz por las bacterias. La cinética mostrada se ajustó a un modelo sigmoideal (Figura 1,

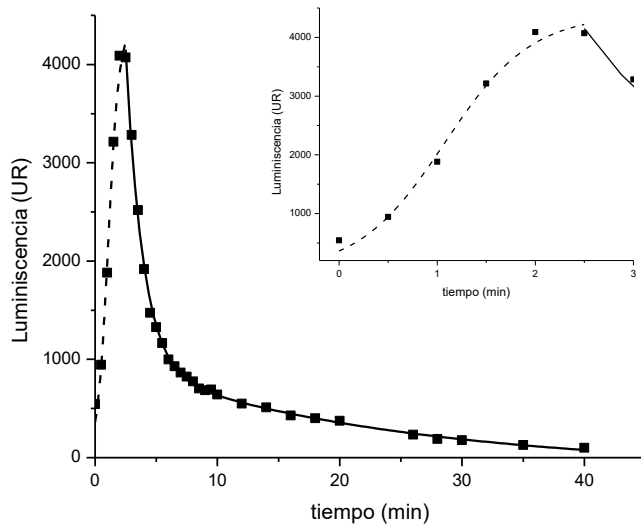


Figura 1 Bioluminiscencia de *L. monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-P<sub>hlyA</sub>. En presencia de nisina 40 UI mL<sup>-1</sup>. El inserto muestra la luminiscencia durante los primeros 3 minutos. Promedio de dos experimentos.

inserto), el tiempo medio (velocidad máxima) fue de alrededor de un minuto (1.075 minutos), el máximo se observó entre los 2 y 2.5 minutos. Éste aumento de la luminiscencia fue reproducible y podría usarse el aumento de la luminiscencia para la cuantificación de nisina. falta por explorar el comportamiento de la luminiscencia con respecto de la concentración de nisina. Si se compara la respuesta a 40 UI

de nisina por mL de células, con el método estándar (basado en el recíproco de la dilución cuya concentración produce un halo de inhibición observable de 1 mm), la concentración usada está dentro del rango de éste. Por lo que un método basado en el aumento de la luminiscencia podría ser igual o más sensible, con la diferencia importante del tiempo de respuesta, mientras que para el método estándar, una vez que se tiene el cultivo indicador hay que mezclar las bacterias con su medio de cultivo en agar (cuidando la temperatura), perforar pozos de 7 mm de diámetro, poner la muestra y una serie de diluciones 1:2, e incubar de 24 a 48 horas para observar los halos de inhibición; con un método basado en el aumento de la bioluminiscencia sólo habría que poner la muestra en el cultivo y medir la luminiscencia en 2 a 3 minutos, por supuesto también se tendrían que hacer varios estándares con actividad conocida para poder

cuantificar la actividad en la muestra. El procedimiento podría hacerse en menos de 1 hora.

- El segundo y tercer componente de la cinética los encontramos en la fase de decaimiento de la luminiscencia, ésta parte de la curva se ajustó bien a la suma de dos curvas exponenciales. El primer componente exponencial, componente rápido, mostró una vida media de 1.4 minutos, mientras que el componente lento tuvo una vida media de 22.6 minutos. Debido al componente lento de decaimiento la curva se extendió hasta los 40 minutos, tiempo en el cual la luminiscencia se acercó al fondo y por supuesto fue menor que la luminiscencia inicial. También podría desarrollarse un método basado en la disminución de la luminiscencia (como fue la hipótesis inicial), sin embargo se observaron dos problemas que dificultarían el desarrollo de la técnica: El problema principal es la escasa diferencia entre la luminiscencia inicial y el fondo, un rango tan pequeño y en el límite de detección del instrumento darían medidas con mucha variación. El segundo problema es el tiempo, para permitir que el componente lento llegara a la basal se requeriría al menos una hora de incubación (en términos bacterianos podría ser una generación o más).

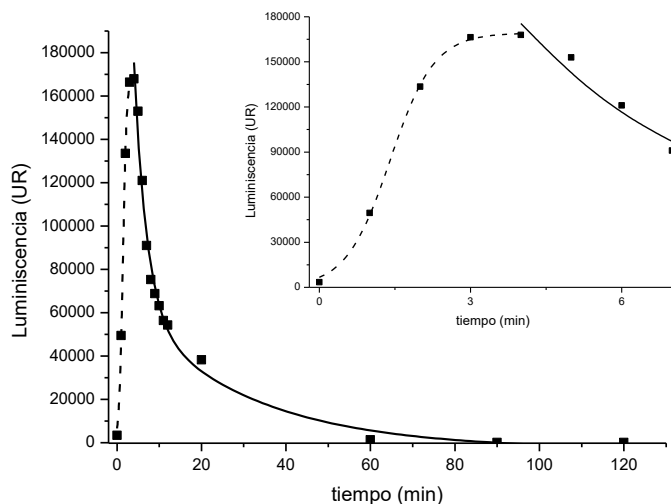


Figura 2 Bioluminiscencia *L. monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-P<sub>hlyA</sub>. Sometida a estrés por frío, en presencia de nisina 40 UI mL<sup>-1</sup>. El inserto muestra la luminiscencia durante los primeros 7 minutos. Promedio de dos experimentos.

diferencia fue que éstas estuvieron sometidas al frío y posteriormente retadas con nisina 40 UI\*mL<sup>-1</sup>. El curso temporal de la respuesta a nisina fue similar al mostrado en la Figura 1, sin embargo los tres componentes en las células estresadas, mostraron constantes de tiempo mayores que en las células no sometidas al frío. La constante de tiempo del componente inicial (curva sigmoidea) fue de 1.4 minutos un 30% mayor que las células sin estrés térmico (inserto en la Figura 2) . Los dos

Al explorar algunas condiciones para tener una mejor señal; observamos que condiciones de estrés aumentan la respuesta. Una de las condiciones que mostró mejor comportamiento fueron las células sometidas a estrés térmico, bacterias en frío durante 24 horas mostraron una señal 34 veces mayor (Figura 2). Las células fueron cultivadas en condiciones iguales a las mostradas en la Figura 1, la única

componentes de la curva de decaimiento mostraron vidas medias de 3.0 y 28.5 minutos un 114% y 26% más lento.

El sistema de determinación de nisina mediante el uso de una bacteria indicadora bioluminiscente, puede proporcionarnos un método rápido para la medición de esta importante bacteriocina. Uno de los factores más importantes en el desarrollo de un método de medida es la sensibilidad de éste, en el caso de las mediciones lumimétricas se tiene la gran ventaja de tener señales de fondo muy pequeñas, lo que permite detectar fenómenos muy débiles (como es el caso de la luminiscencia basal de la cepa de *L. monocytogenes* bioluminiscente utilizada), la respuesta inesperada de la cepa indicadora (aumento inicial de la luminiscencia en vez de un decremento) nos permitió tener una excelente señal en presencia de nisina. En el curso de esta investigación nos falta explorar las condiciones óptimas para medir la nisina con respecto de su concentración, sin embargo los experimentos presentados dieron claves importantes para tener una excelente señal y poder observar una buena respuesta de las células a la concentración de nisina.

## BIBLIOGRAFÍA

- de la Fuente-Salcido N, Barboza-Corona JE, Espino Monzón AN, Pacheco Cano RD, Balagurusamy N, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R. 2012..Expanding the use of a fluorogenic method to determine activity and mode of action of *Bacillus thuringiensis*
- de Vust, L., & Vandamme, E. (1994). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. En L. de Vust, & E. J. Vandamme, *Bacteriocins of lactic acid bacteria* (págs. 152-159). Londres: Blackie Academic and Professional.
- Gut Ian M., Steven R. Blanke, and Wilfred A. van der Donk. 2011. Mechanism of Inhibition of *Bacillus anthracis* Spore Outgrowth. by the Lantibiotic Nisin. *ACS Chem. Biol.* 6, 744–752
- Heike Brötz and Hanz-Georg Sahl. 2000. New insights into the mechanism of action of lantibiotics- diverse biological effects by binding to the same molecular target. *JAC* 46:1-6.
- Martín, A., Serrano, S., Santos, A., Marquina, D., & Vázquez, C. (2010). Bioluminiscencia bacteriana. *Reduca*, 3(5), 75-86.
- Reid, F., Ahmed, K., Waites, W., & Stewart, G. (1990). The rapid detection of antimicrobials using bioluminescent lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol*, 88.
- Peter A. Bron, Ian R. Monk, Sinead C. Corr, Colin Hill, and Cormac G. M. Gahan. 2006. Novel Luciferase Reporter System for In Vitro and Organ-Specific Monitoring of Differential Gene Expression in *Listeria monocytogenes*. *Apl. Env. Microbiol*, 72(4), 2876-2884.