

Diseño de un sistema heterólogo de expresión de la Thurincina H

Z.S. Oros-Flores¹, L.E. Casados-Vázquez*², y J.E. Barboza-Corona*².

1 Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. **2** Departamento de Alimentos División de Ciencias de la vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. *Laboratorio de biotecnología y microbiología molecular. Exhacienda El copal Km. 9, carretera Irapuato-Silao C.P: 36500. Irapuato, Gto, México. Correo electrónico: josebar@ugto.mx

RESUMEN:

La Thurincina H es una bacteriocina sintetizada ribosomalmente por algunas cepas de *Bacillus thuringiensis* y posee un amplio espectro antimicrobiano, muestra el inconveniente de no ser producida por una bacteria GRAS (generalmente reconocida como segura) y, por tanto, no puede utilizarse en alimentos para combatir microorganismos patógenos. La finalidad de este estudio es diseñar un sistema heterólogo para la expresión de la Thurincina H mediante el vector de expresión pREXC3H en una cepa de *Lactococcus lactis*, ampliando el espectro antimicrobiano de la misma y su producción segura para uso alimentario. La Thurincina H se produjo a partir de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269 y se probó su actividad antimicrobiana. Se encontró que inhibe a *Lactococcus lactis* en cantidades mayores a 4.42 U/μg, *Bacillus cereus* mayores de 3.77 U/μg y *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269, mayores de 35.42 U/μg. De la cepa *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269, se obtuvo DNA total y mediante PCR se amplificó el clúster genético de la Thurincina H correspondiente a 8,143pb.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*, bacteriocinas, Thurincina H.

ABSTRACT:

Thurincin H is a bacteriocin synthesized ribosomally by some strains of *Bacillus thuringiensis* and has a wide antimicrobial spectrum, but has the disadvantage of not being produced by a GRAS bacteria (generally recognized as safe) and therefore it cannot be used in foods to combat pathogenic microorganisms. The aim of this study is to propose a heterologous expression of Thurincin H using the expression vector pREXC3H in a strain of *Lactococcus lactis*, broaden its antimicrobial spectrum and its safe production for food use. Thurincin H was produced from *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269 and tested its antimicrobial activity. It was found that inhibits *Lactococcus lactis* in amounts greater than 4.42 U/μg, *B. cereus* greater than 3.77 U/μg and *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269, greater than 35.42 U/μg. From *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269, total DNA was obtained and genetic cluster of Thurincin H was amplified by PCR corresponding to 8,143pb.

Keywords: *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*, bacteriocina, Thurincin H.

INTRODUCCIÓN

Cada año, millones de personas mueren por ingerir alimentos contaminados con microorganismos patógenos por falta de inocuidad alimentaria (OMS, 2015). A pesar del esfuerzo del gobierno por aumentar la seguridad alimentaria, las enfermedades transmitidas por bacterias presentes en los alimentos, continúan siendo un gran problema de salud (SINAVE, 2015). Aunado a lo anterior, las tendencias alimentarias han cambiado y los consumidores exigen alimentos nutritivos, inocuos y libres de conservadores químicos. Lo anterior ha dirigido a la investigación hacia la búsqueda de agentes naturales de conservación; las bacteriocinas producidas por algunos microorganismos constituyen una alternativa eficaz contra este problema (Álvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente por bacterias, su principal característica es que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Cotter *et al.*, 2005). Las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido-lácticas son de particular interés debido al largo historial de uso seguro en su aplicación en alimentos (Beristain-Bauza *et al.*, 2012), y su acción contra bacterias implicadas en infecciones alimentarias como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, entre otros (Rodríguez, 1996).

Lactococcus lactis es una bacteria ácido-láctica que fermenta azúcares, produce ácidos orgánicos y bacteriocinas (De Vos, 1999). La bacteriocina más importante y estudiada hasta este momento es la nisina, la cuál es la única considerada segura por la FDA para su uso como aditivo alimentario, es sintetizada por *Lactococcus lactis* subps. *lactis* y presenta un espectro de acción para bacterias Gram-positivas, pero nulo para bacterias Gram-negativas (García-Almendáriz *et al.*, 2011).

La diferencia entre las diversas bacteriocinas existentes es su rango de actividad (Gordon y O'Brien, 2006). En 2008, De la Fuente-Salcido y colaboradores reportaron que las bacteriocinas producidas por el género *Bacillus*, presentan actividad frente a bacterias Gram negativas implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos como: *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella* spp. Una de las cepas productoras de bacteriocinas es *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269, bacteria gram positiva esporogénica que sintetiza Thurincina H; ésta tiene un rango de actividad contra bacterias Gram negativas.

Con lo anterior, se planteó expresar la Thurincina H en una cepa de *L. lactis* con la finalidad de ampliar el espectro antimicrobiano y disminuir la incidencia de bacterias patógenas en alimentos. Se determinó la concentración mínima de Thurincina H que afecta a *L. lactis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* y se amplificó el clúster de la Thurincina H para su clonación en un vector de expresión para *Lactococcus lactis*, *Bacillus thuringiensis* y *Escherichia coli* bajo la regulación de un promotor inducible.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

B. thuringiensis subsp. *morrisoni* LBIT-269 y *B. cereus* 183 se obtuvieron de la colección de bacterias de CINVESTAV, Irapuato, México. Las cuales se crecerán a 28°C en caldo de soya tripticaseína (TSB) o agar de soya tripticaseína (TSA) (Becton–Dickinson, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se obtendrá de la colección de bacterias de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), Querétaro, México. La cual se crecerá a 37°C en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS). Los plásmidos recombinantes se propagaran en *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) a 37°C en caldo Luria-Bertani (LB) (Invitrogen, Carlsbad CA, USA).

2. Ensayo de actividad por el método de difusión en pozos.

Las placas para la determinación de actividad se prepararon con agar de pozos, inoculando con 2% (v/v) de un cultivo de la bacteria indicadora. En cada caja se hicieron 6 perforaciones equidistantes con un horador. En cada perforación se colocaron 50 µL de la Thurincina H con sus réplicas correspondientes. Las placas se mantuvieron refrigeradas toda la noche y después se incubaron 16h a la temperatura de crecimiento de la bacteria indicadora. Transcurrido el tiempo de incubación se midió el halo de inhibición.

3. Ensayo para determinar sensibilidad a la Thurincina H.

A partir del extracto de la thurincina H se realizaron diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) y fueron probadas con el método de difusión de pozos contra la bacteria indicadora. Se midió el halo de inhibición y se determinó la concentración mínima que muestre inhibición tras haber realizado una cuantificación de proteínas del extracto crudo por el método de Bradford (De acuerdo a las especificaciones del fabricante BIO-RAD Quick Start TM Bradford 1x Dye Reagent).

4. Obtención de DNA total de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269.

A 50 mL de caldo Spizizen se le añadió 1mL de preinóculo de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269 crecido por 16h a 28°C y se incubó a 28°C/250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0.9 a 1.1. El cultivo se centrifugó a 20,200 x g por 15 min a 4°C eliminando el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 20 mL de buffer TES frío y se centrifugó bajo las mismas condiciones. La pastilla se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis y se incubó a 37 °C por 90 min o hasta que se obtuvo más del 90 % esferoblastos. A la suspensión de esferoblastos se le añadieron 3 mL de buffer TES suplementado con 8 % SDS y se incubó 10 min a 68 °C. Se añadieron 1.5 mL de acetato de sodio 3 M (pH 4.8) y la suspensión se incubó a -20 °C por 30 min. Se centrifugó a 20,200 x g por 20 min a 4 °C, el sobrenadante debe ser transparente. Se añadieron dos volúmenes de etanol al 96% frío al sobrenadante y se incubó toda la noche a -20 °C. El sobrenadante se centrifugó a 20,200 x g por 20 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se deja secar el tubo. El DNA total se resuspendió en 100 µL de agua bidestilada y se almacenó a -20°C (Reyes-Ramírez e Ibarra, 2008).

5. Amplificación del clúster.

La amplificación del clúster se realizó utilizando los oligonucleótidos mostrados en la Tabla I. La mezcla de PCR contenía ~100 ng de ADN total, 5X Phusion HF buffer con 1.5 mM de MgCl₂, 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 0.3 mM dNTPs, y 1U de Phusion High-fidelity DNA polimerasa (ThermoFisher scientific). La amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: 98 °C durante 30 s, seguido de 30 ciclos de 10 s a 98 °C y 30 s a 55 °C, el tiempo de amplificación de 4 min a 72 °C y con una extensión final de 72 °C durante 7 min.

Tabla I. Oligonucleótidos usados para generar la amplificación del clúster.

Nombre	Secuencia	Usados para
ThnP-Fw/EcoRI	5'-CCGGAATTCTTATTGGGAAATCGCTTAT-3'	ThnP-ThnI
ThnI-Rv/PstI	5'-CAAAACTgCAgCTATATTTCTGAAGTATACAA-3'	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Ensayo de actividad mínima.

La Thurincina H es una bacteriocina que presenta actividad frente a bacterias gram positivas y gram negativas (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008)., por tanto, resultó importante determinar la concentración mínima en la cuál ésta bacteriocina afecta a la célula hospedera. Se probó la actividad antimicrobiana de la Thurincina H sin purificar con una concentración inicial de 1,417 $\mu\text{g/mL}$ y se hicieron diluciones seriadas hasta llegar a una dilución de 1/32 correspondiente a 44.28 $\mu\text{g/mL}$. Se probó contra cuatro cepas: *B. cereus*, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269, *Lactococcus lactis* MG1416 y *Lactococcus lactis* UQ2 debido a que algunas de éstas cepas se utilizarán para producir heterológamente la Thurincina H.

En la Figura 1 se muestra la sensibilidad de cuatro bacterias frente a la Thurincina H. Las dos cepas de *Lactococcus lactis* presentaron el mismo comportamiento de inhibición frente a las diversas concentraciones a las que fueron sometidas, la cantidad de Thurincina H máxima que soportan antes de

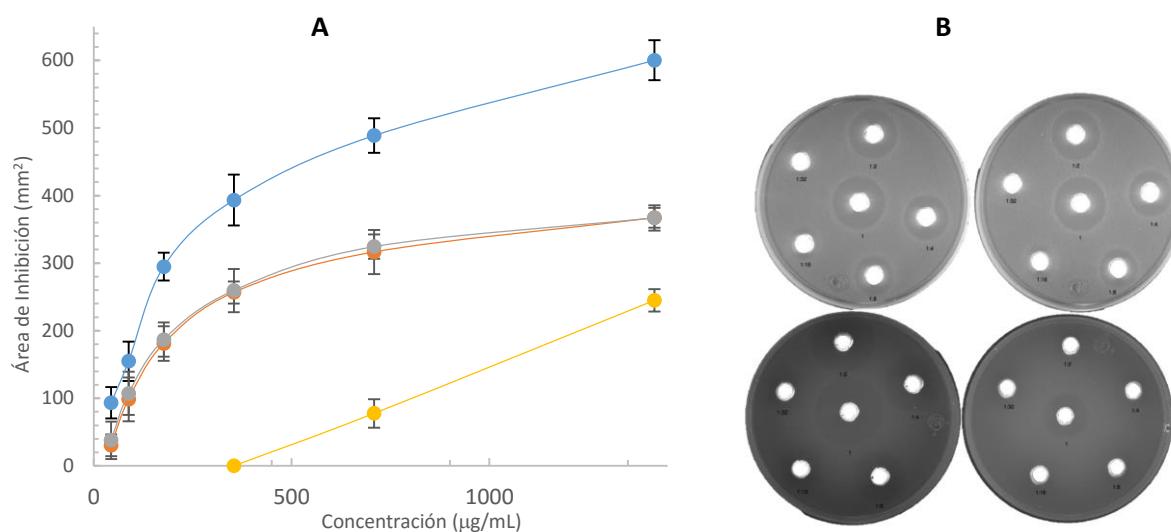


Figura 1. Sensibilidad de diversas bacterias a la Thurincina H por el método de difusión en pozos. **Cuadro A:** Azul: *Bacillus cereus* Gris: *Lactococcus lactis* MG1416 Naranja: *Lactococcus lactis* UQ2 Amarillo: *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269. **Cuadro B:** Halos de inhibición. Superior izquierda *L. lactis* MG1416, superior derecha *L. lactis* UQ2, inferior izquierda *B. cereus* e inferior derecha *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269.

mostrar inhibición es de 4.42 U/ μg . *B. cereus* es una cepa indicadora sensible, por tanto, la cantidad que requirió de Thurincina para no mostrar halo de inhibición fue de 3.77 U/ μg (extrapolación logarítmica) La cepa productora de la Thurincina H, *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269 presentó una resistencia a su propia bacteriocina hasta una concentración de 35.42 U/ μg .

2. Amplificación del clúster de la Thurincina H

En la Figura 2 se muestra el clúster genético de la Thurincina H, el cual consta de 10 genes, desde *thnP* a *thnI* implicados en la formación del péptido antimicrobiano maduro y activo. Tiene tres genes estructurales en tándem que codifican para la Thurincina H (*thnA1*, *thnA2* y *thnA3*), el *thnP* codifica para una serin-proteasa, *thnB* codifica la enzima radical SAM, encargada de llevar a cabo las modificaciones post-traduccionales; *thnD*, *thnE* y *thnT*, codifican para el sistema de transporte y la proteína de membrana, *thnR* codifica para un regulador transcripcional y *thnI* codifica una proteína de la que no se conoce su función (Sit et al., 2011).

Para la amplificación del clúster genético completo, se partió del DNA total obtenido por spizizen (Figura

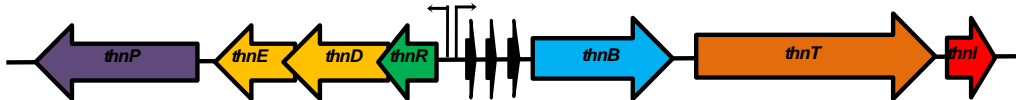


Figura 2. Clúster genético de la Thurincina H.

3A) como DNA molde y mediante PCR con enzima de alta fidelidad y las condiciones mostradas en la metodología, se obtuvo un amplicón de aproximadamente 8,143 pb correspondiente al tamaño del clúster (Figura 3B).

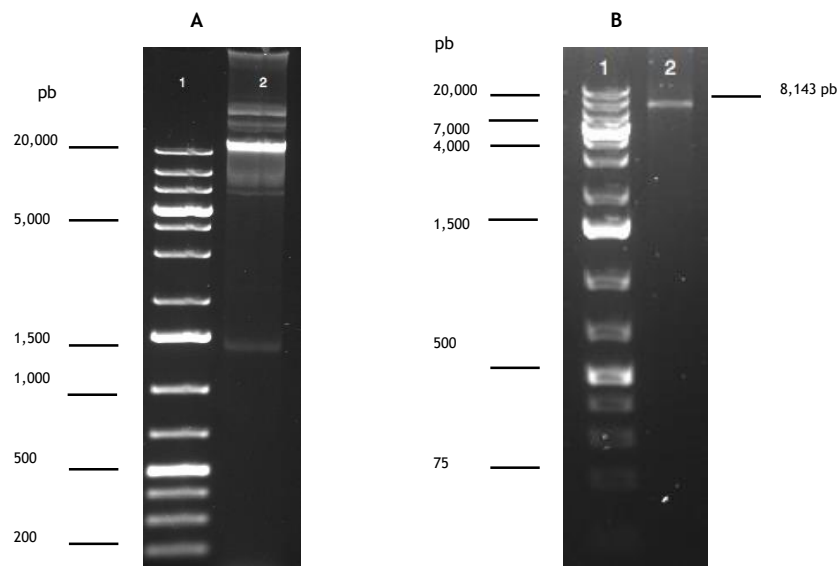


Figura 3. A. Carril 1: GeneRuler 1kb, Carril 2: DNA total de *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269. B. Carril 1: GeneRuler 1kb, Carril 2: Amplicón del clúster genético de la Thurincina correspondiente a 8,143pb.

3. Diseño del sistema heterólogo de expresión de la Thurincina H.

Para el diseño del sistema de expresión se utilizarán dos vectores. El primer vector será pHT3101, un vector de conservación con origen de replicación para *B. thuringiensis* y *E. coli* con un tamaño de 6.6 kb con resistencia a a ampicilina y eritromicina; el segundo vector pREXC3H (addgene), es un vector de expresión con origen de replicación para *E. coli* y *L. lactis* con un tamaño de 5.5 kb con resistencia a ampicilina. El diseño de oligonucleótidos para la clonación del clúster genético de la Thurincina H en los vectores antes mencionados, se muestran en la tabla II.

Tabla II. Oligonucleótidos usados para clonar el clúster de la Thurincina H en dos vectores.

Vector	Secuencia	Usados para
pHT3101	5'-CCGGAATTCTTATTGGGAAATCGCTTTAT-3'	ThnP-Fw/EcoRI
	5'-CAAAACTGCAGCTATATTTCTGAAGTATACAA-3'	ThnI-Rv/PstI
pREXC3H	5'- GGACTAGTCCTTATTGGGAAATCGCTTTATAGACATCAAG- 3'	ThnP-Fw/SpeI
	5' - GGACTAGTCCCTATATTTCTGAAGTATACAATGTGACCAT- 3'	ThnI-Rv/SpeI

CONCLUSIONES

La Thurincina H presentó actividad antimicrobiana frente a *Lactococcus lactis* en concentraciones mayores a 4.42 U/μg, para *B. cereus* mayores de 3.77 U/μg y para *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269, a concentraciones mayores de 35.42 U/μg. Se amplificó el clúster genético de la thurincina H correspondiente a 8,143pb y se realizó el diseño del sistema heterólogo de expresión de la Thurincina H en un vector de conservación y expresión.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Dongdong, M. y Kuipers, O. 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100:2939–2951. DOI 10.1007/s00253-016-7343-9.
- Beristain-Bauza, S., Palou, E. y López-Malo, A. 2012. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 6:64-78
- Cotter, P., Hill, C. y Roos, R. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology.* 3(10):777- 788.
- De la Fuente-Salcido, N., Alanís-Guzmán, M., Bideshi, D., Salcedo-Hernández, R., Bautista-Justo, M y Barboza-Corona J. 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol.* 190:633-640 DOI 10.1007/s00203-008-0414-2
- De Vos, W. 1999. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2:289-295.
- García-Almendáriz, B.E., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S.L., Regalado-González, C., Uribe-Díaz, Carina. y Piña-Suárez, A. D. 2011. Producción de nisina por *Lactococcus lactis* uq2 usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del secado por aspersión. *CA Biotecnología.* Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gordon, M. y O'Brien, L. 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* 152: 3239-3244.
- OMS. 2015. Día mundial de la salud 2015: Inocuidad de los alimentos. 2015. Disponible en <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/event/es/>
- Reyes-Ramírez, A. e Ibarra, J. 2008. Plasmid Patterns of *Bacillus thuringiensis* Type Strains. *Appl Environ Microbiol.* 74(1): 125–129.
- Rodríguez, J., Martínez, M., Suárez, A., Martínez, J. y Hernández, P. 1996. Unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide producing lactic acid bacteria. *Letters Appl. Microbiol.* 25: 73-74.
- SINAVE. 2015. El impacto de la inocuidad alimentaria en la salud. 14(32):1-63 Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2015/sem14.pdf>
- Sit, C., Van-Belkum, M., McKay, R., Worobo, R. Y Vederas, J. 2011. The 3D Solution Structure of Thurincin H, a Bacteriocin with Four Sulfur to a-Carbon Crosslinks. *Angew. Chem. Int.* 50, 8718 –8721. DOI: 10.1002/anie.201102527