

DESARROLLO DE BIOSENSORES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS

Gutiérrez Sánchez Flor de María (1), Casados Vázquez Luz Edith (2), Barboza Corona José Eleazar (2)

1 [Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, Dirección de correo electrónico: fdm.gutierrezsanchez@ugto.mx]

2 [Posgrado en Biociencias, Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, Direcciones de correos electrónicos: edith.casados@gmail.com, josebar@ugto.mx]

Resumen

En este proyecto nuestro objetivo fue diseñar un biosensor que pudiera detectar e inhibir a *Pseudomonas aeruginosa* usando como chasis a *Lactococcus lactis*. El biosensor debería producir a la Nisina, un péptido antimicrobiano, en mayor cantidad que la cepa silvestre. Actualmente tenemos la mayoría de las piezas para poder diseñar los módulos que permitan detectar e inhibir *P. aeruginosa*, los cuales en una etapa posterior podrán ser ensamblados. Asimismo, se observó que la Nisina tiene efecto inhibitorio sobre diversas bacterias patógenas de interés en alimentos, por lo que podrían desarrollarse diversos biosensores usando como chasis a *L. lactis* sobreproductor de Nisina.

Abstract

In this work our objective was to develop a biosensor to detect and inhibit *Pseudomonas aeruginosa*, using as chasis *Lactococcus lactis*. The biosensor would be able to produce Nisin, an antimicrobial peptide, in higher concentration than that produced by the parental strain. Currently, we have most of the genetic devices to design the modules that allow detecting and inhibiting *P. aeruginosa*, which must be assembled in a further work. Additionally, it was observed that Nisin had effect on several food-borne pathogenic bacteria, so using the same foundation it might be developed biosensors using as chasis *L. lactis* that overexpresses Nisin.

Palabras Clave

Cromatografía; Pirólisis; Polipropileno (PP); Hidrocarburos.

INTRODUCCIÓN

Los biosensores son circuitos biológicos constituidos por una secuencia de genes que se expresan generando respuestas a razón de señales producidas en el exterior, activándose a manera de “switch” cuando perciben el estímulo para el cual se han diseñado.

La contaminación de alimentos producida por bacterias patógenas es una problemática de salud pública, se estima que cada año las enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria o hídrica se cobran la vida de 2,2 millones de personas, en su mayoría niños [1].

La detección oportuna de bacterias patógenas en alimentos tiene como finalidad impedir que esta cifra vaya en aumento y a su vez evitar otras infecciones alimentarias.

Es muy amplia la aplicación de biosensores en la industria alimentaria se destacan: seguridad alimentaria, control de procesos, calidad alimentaria y organismos genéticamente modificados. Sin embargo, el desarrollo de muchos biosensores aún se encuentran aún en fase de investigación, debido a que es preciso establecer mejoras en la selectividad y sensibilidad, tiempo de respuesta e interacción con agentes externos [2]

En este trabajo reportamos los avances en el desarrollo de un biosensor usando como chasis a *Lactococcus lactis* para detectar y aniquilar a *Pseudomonas aeruginosa* a través de una sobreexpresión de Nisina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de la estructura genética del biosensor

Los módulos para generar el biosensor para detectar *P. aeruginosa* están constituidos de la siguiente forma: En el primer módulo se encuentra promotor constitutivo de *L. lactis*, un sitio de unión al ribosoma, el gen LasR y un terminador. En el segundo módulo, se encuentra un promotor pLasI, un sitio de unión al ribosoma, el gen de Nisina y un

terminador (Figura 1). Como chasis se tenía contemplado usar una cepa de *Lactococcus lactis*.

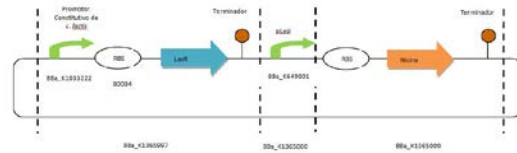


Figura 1. Diseño de los módulos para detectar *P. aeruginosa*.

Las piezas genéticas seleccionadas para la construcción del biosensor provienen de un kit de biobricks proporcionado por IGEM (www.iGEM.org).

El primer módulo se encuentra en el biobrick BBa_K1365997 (Figura 2). El promotor *pLasI* lo podemos amplificar BBa_649000 del biobrick BBa_649001 (Figura 3), mientras que el gen de la nisina la podemos obtener de BBa_K1365000 (Figura 4).

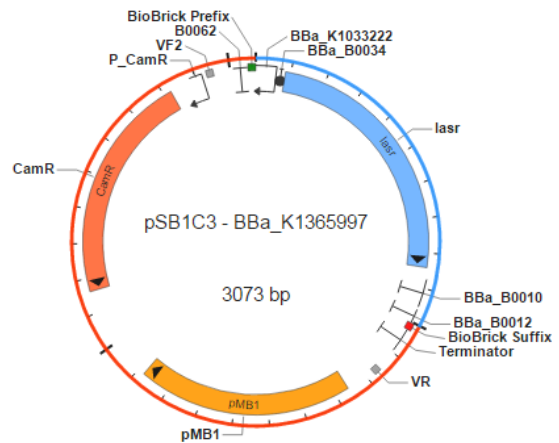


Figura 2. BBa_K1365997.Promotor constitutivo BBa_K1033222, RBS B0034, gen LasR. Tomado de www.iGEM.org

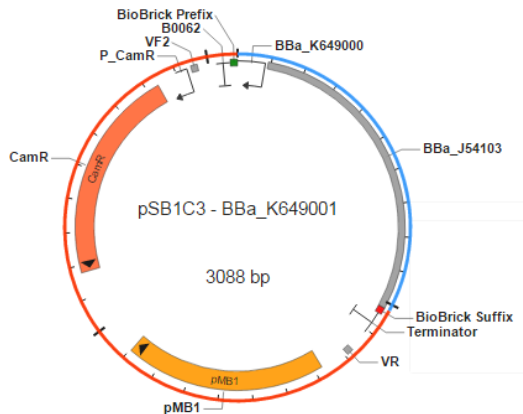


Figura 3. BBa_K649001. Promotor pLasI BBa_K649000.
 Tomado de www.iGEM.org

Obtención del primer módulo del biosensor y del gen de la Nisina

En la página del iGEM se identificaron los números de las piezas genéticas (BBa_K1365997, BBa_K1365000). Se tomaron las cajas con pocitos con las piezas. Se adicionaron 10 uL de agua destilada estéril al pocito seleccionado con la pieza liofilizada. Se tomó una alícuota se transformaron por electroporación células de *Escherichia coli*. Las transformantes fueron crecidas en LB con ampicilina y se les extrajo el DNA plasmídico.

Ensayos de inhibición mediante pozos

Se obtuvieron cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estas fueron sembradas en 5 mL de medio líquido LB para *E. coli* y BHI para las demás bacterias a 37°C y obtener cultivo fresco para realizar prueba de pozos en cajas petri. El agar de pozos contiene 6 g de agar y 0.7g de medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI) en 500 mL de agua destilada. Se inocularon en caja petri 140 µL de cultivo fresco de cada una de las bacterias con 20 mL de agar de pozos en 2 repeticiones dejando solidificar por 10 min para

después realizar los pozos con sacabocados estéril e incubar las cajas a 37°C durante 2h.

Transcurrido éste tiempo en cada pocito se colocaron 100µl de las diluciones de nisina y sobrenadante de *L. lactis*.

Diluciones con nisina

Se realizó un experimento para determinar el buffer idóneo para la activación de nisina diluyendo 50mg de Nisina SIGMA-ALDRICH N5764 de 250 000 U en 50 mL de ácido cítrico 50mM.

Posteriormente se realizó otra prueba con HCl 0.2N y Agua con diluciones 1:100.

Pruebas de pozos con sobrenadante de *L. lactis*

Crecimos la cepa MG1416 de *Lactococcus lactis* en 10mL de medio MRS líquido a 4 tiempos: 16, 20, 24 y 66 h tomando a cada tiempo 1mL para centrifugarlo y obtener el sobrenadante para con éste realizar una segunda prueba de pozos a los 3 patógenos antes mencionados y ver si existe inhibición de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestro objetivo fue diseñar un biosensor que permitiera sobreexpresar la Nisina, lo cual puede lograrse con copias adicionales del gen en *L. Lactis* usada como chasis. Para diseñar el biosensor que detectará *P. aeruginosa*, se analizaron las muestras obtenidas de las cajas con pocitos que contenían los "Biobricks" (Figura 4).

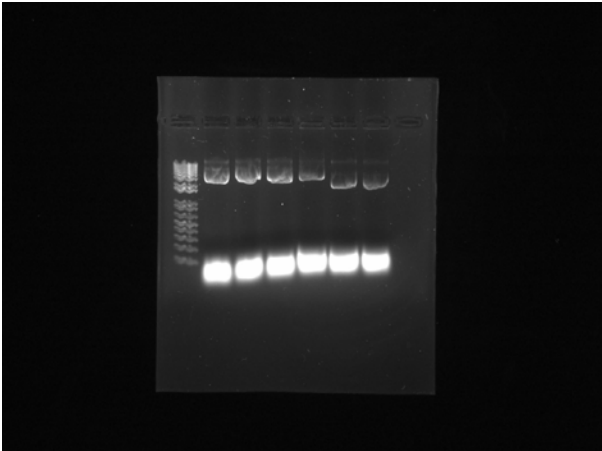


Figura 4. DE los carriles 2-5 se encuentra muestras de BBa_K1365997, mientras que en lo carriles 6 y 7 se encuentra el Biobrick BBa_K1365000.

Posteriormente en las pruebas de pozos obtuvimos resultados positivos en las diluciones de nisina en ácido cítrico (Figura 5) diluciones de nisina usando HCl 0.2N y diluciones de nisina en agua destilada (Figura 6). Por otro lado, en la prueba de pozos con el sobrenadante de *L. lactis* la respuesta fue positiva existiendo un halo de inhibición en el tiempo de crecimiento número 4 correspondiente a 66 h (Figura 7).

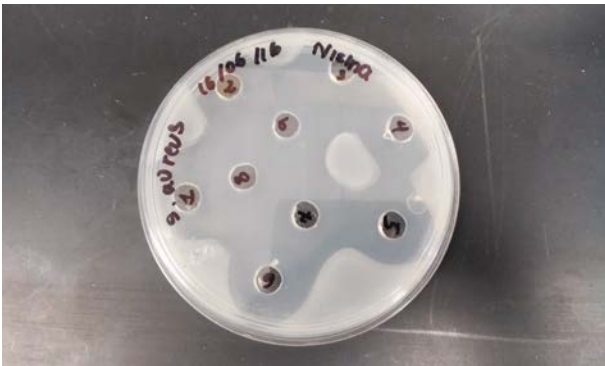


Figura 5. Prueba de pozos con nisina en ácido cítrico

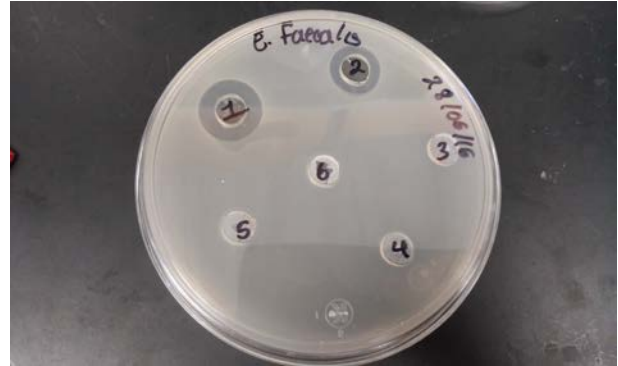


Figura 6. Prueba de pozos con nisina en agua



Figura 7. Prueba de pozos con sobrenadante de *L. lactis*.

CONCLUSIONES

En este momento tenemos la mayoría de las piezas genéticas para desarrollar un biosensor que use como chasis a *L. Lactis*, solo nos falta amplificar u obtener el promotor inducible con la proteína LasR (es decir pLasI). Aún cuando no hicimos ensayos contra *P. aeruginosa*, en el laboratorio ya se ha demostrado que la Nisina es capaz de inhibir el crecimiento de dicha bacteria, por lo nuestro sensor podrá ser útil para detectar y aniquilarla, aunque esto deberemos demostrarlo experimentalmente.

Adicionalmente observamos que la Nisina es capaz de inhibir diversas bacterias patógenas de interés en alimentos, por lo que podrian desarrollarse biosensores para detectarlas e inhibirlas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato por el apoyo financiero para la realización de este proyecto durante el Verano de Investigación. A la División de Ciencias de la Vida Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato por hacer posible el desarrollo de ésta investigación, a las compañeras y compañeros verano del equipo IGEM de quienes aprendí mucho, en especial a la Dra. Luz Casados por la paciencia y toda la disposición para mostrarnos rutas alternas a la investigación y al Dr. Eleazar Barboza por la oportunidad que me dio para realizar el trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Pineda, D. (2003). Biosensores y su aplicación en la industria de alimentos. *Inventa, alimentos y bebidas* .
- [2] WHO. (2016). *World Health Organization*. Recuperado el 16 de 07 de 2016, de http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/en/