

## CARACTERIZACIÓN DE LOS DETERMINANTES GENÉTICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA BACTERIOCINA DE *Enterococcus faecium* UQ1

Luz Ma. Medina, Blanca García-Almendárez, Carlos Regalado, Carlos Cervantes\*. DIPA, PROPAC. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. C. U., Cerro de las Campanas S/N, CP 76010. Fax: 4 2156867.

\*UMSNH. Lab. Microbiología, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Morelia, 58030 Mich. Email: blancag@sunserver.uaq.mx

Palabras clave: bacteriocina, electroporación, plásmido.

**Introducción.** Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica; poseen propiedades inhibitorias contra especies bacterianas relacionadas taxonómicamente, psicrotrofos como *Listeria monocytogenes*, así como otras bacterias patógenas y deterioradoras. Varían en su modo de acción, espectro de actividad, peso molecular, propiedades bioquímicas y determinantes genéticos. Algunas desventajas son su reducido espectro de inhibición, bajos niveles de producción ó inestabilidad durante su producción. Los determinantes genéticos de las bacteriocinas y el empleo de técnicas para la manipulación genética, pueden utilizarse como herramientas para su sobre-expresión y para la transferencia de los genes responsables de su producción a otras especies (1). El objetivo de este trabajo fue conocer los determinantes genéticos de la bacteriocina producida y transferir este material genético mediante electroporación a células competentes.

**Metodología.** Las condiciones de crecimiento de *E. faecium* UQ1 y el efecto antilisterial de la bacteriocina producida se realizó de acuerdo a (2). El material genético se extrajo usando el método de Kieser (3) y se transfirió mediante electroporación a *E. faecium* ATCC 12952 y *Lactobacillus plantarum* 18L. Para la selección de transformantes se emplearon: potencial bacteriocinogénico, resistencia a metales, así como la susceptibilidad a antibióticos. La actividad antimicrobiana se valoró por la técnica de difusión en agar(4).

**Resultados y discusión.** *E. faecium* UQ1 presentó dos bandas plasmídicas de 33.5 y 120 kb. El empleo de metales pesados y susceptibilidad a antibióticos permitió una selección más eficiente de células transformantes. Se obtuvo una alta eficiencia de transformación (Tabla 1). Cabe aclarar que la eficiencia reportada se aplica a las condiciones utilizadas y que fue exitosa, a pesar de que una de las cepas receptoras pertenece a un género y especie diferente.

Tabla 1. Eficiencia de transformación de las cepas (Bac-)

Cepa Donadora	Cepa Receptora	Eficiencia Transformantes. mg de ADN	Capacidad Bacteriocinogénica
<i>E. faecium</i> UQ1	a) <i>E. faecium</i> ATCC 12952	$1.6 \times 10^7$	+
	b) <i>L. plantarum</i> 18L	$8.0 \times 10^5$	+

Muchas bacteriocinas producidas por el género *Enterococcus* son codificadas por plásmidos, con pesos moleculares

variados. La actividad de la cepa transformada *E. faecium* ATCC 12952 fue igual a la de la cepa donadora, pero la observada en *L. plantarum* 18L transformada fue ocho veces menor. Mediante la curación de plásmidos con una mezcla de bromuro de etidio y naranja de acridina se logró definir cuál de los plásmidos presentes era el responsable de la producción de la bacteriocina.

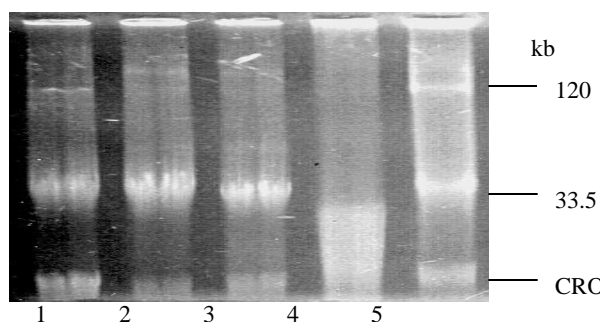


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de cepa donadora carril 1. Cepas a y b antes de la transformación carriles 3 y 4; después de la transformación carriles 2 y 5. CRO: cromosoma.

**Conclusiones.** La capacidad de producción de bacteriocinas de *E. faecium* UQ1 se debe a un plásmido de 120 kb. Se utilizó electroporación para obtener cepas transformadas, que adquirieron la capacidad de producir bacteriocinas; medido por método de difusión en agar y confirmado por los patrones de susceptibilidad a antibióticos así como el curado del plásmido mediante una mezcla de agentes mutagénicos.

### Bibliografía.

- (1) Horn, N., Martínez, J.M., Hernández, P.E., Gasson, M.J., Rodríguez, J. M. y Dodd, H. M. (1999). Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4443-4450.
- (2) García-Almendárez, B., Ibarra-Silva, J., Mayorga-Martínez, L., Domínguez-Domínguez, J. y Regalado, C. (2000). Modelling conditions affecting the production of a bacteriocin by *Enterococcus faecium* UQ1 and the kinetics of the bacteriocin antilisterial activity. *ICEF 8*. April 9-13, Puebla. ( en prensa).
- (3) Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of cDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 12:10-36.
- (4) Schillinger, U. y Lucke, F. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1901-1906.