

MÁSTER EN INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

CURSO 2013-2014

PROYECTO FIN DE MÁSTER

Estudio preliminar sobre la influencia de los  
genes *cspA*, *cpxA*, *hscA*, *recA* y *clpB* en la  
resistencia al calor de *Escherichia coli*

**ELISA CANTÁN ARNAL**

DIRECTORES: DIEGO GARCÍA GONZALO Y RAFAEL PAGÁN TOMÁS

Resumen .....	3
Abstract .....	4
1-Introducción .....	5
2-Objetivos .....	11
3- Materiales y métodos.....	13
3.1 .Microorganismos y condiciones de cultivo .....	14
3.2 Estudio de la resistencia frente al calor (55 °C) de E. coli BW25113 y de los mutantes seleccionados para el estudio .....	14
3.3. Elaboración de las curvas de crecimiento bacteriano.....	16
3.4. Estudio del daño subletal .....	16
3.4.1. Siembra en medios selectivos y determinación del daño subletal .....	19
3.5. Análisis estadístico de los datos .....	20
3.6. Construcción de mutantes E. coli MG1655 $\Delta$ cpxA y E. coli MG1655 $\Delta$ clpB.....	20
3.6.1. Transducción .....	20
3.6.2. Eliminación del marcador de la kanamicina.....	21
3. 6.2.1. Aislamiento del plásmido pCP20 a partir de NB762 .....	22
3.6.2.2. Transformación.....	22
4. Resultados y discusión .....	24
4.1. Resistencia frente al calor (55 °C) de E. coli BW25113 y de cinco cepas mutantes deletéreas para los genes cspA, cpxA, hscA, recA y clpB .....	25
4.2. Curvas de crecimiento.....	26
4.3. Resistencia frente al calor (55 °C) de E. coli BW25113 y de cinco cepas mutantes deletéreas para los genes cspA, cpxA, hscA, recA y clpB en medios selectivos: Determinación de la presencia de daño subletal.....	27
4.4. Construcción de mutantes E. coli MG1655 $\Delta$ clpB y E. coli MG1655 $\Delta$ cpxA .....	34
4.4.1 Transducción con el fago P1 .....	36
4.4.2. Eliminación del marcador de la kanamicina.....	39
5. Conclusiones.....	42

## **RESUMEN**

En esta investigación se ha realizado un estudio preliminar sobre la influencia de los genes *cspA*, *cpxA*, *hscA*, *recA* y *clpB* en la resistencia al calor de *Escherichia coli*, mediante la comparación de la resistencia de la cepa parental BW25113 y las cepas mutantes obtenidas de la colección Keio. Posteriormente, y con objeto de poder confirmar en un futuro los resultados obtenidos en una cepa de referencia (*E. coli* MG1655), se han creado mutantes deletéreos en esta cepa mediante el uso de herramientas moleculares.

Como resultado del estudio preliminar, se ha podido establecer relación directa entre la delección de los genes *cpxA*, *recA* y *clpB* y una mayor sensibilidad a los tratamientos térmicos. Concretamente, este estudio ha revelado una disminución de la resistencia intrínseca de la membrana citoplasmática como consecuencia de la delección de los genes *cpxA*, *recA* y *clpB*, por lo que la expresión de estos genes podría estar relacionada con la estabilización de esta envoltura celular frente a los tratamientos térmicos, y en el caso de los genes *cpxA* y *clpB* con los mecanismos de reparación de los daños ocasionados sobre dicha envoltura celular. Del mismo modo, el estudio ha revelado una disminución de la resistencia intrínseca de la membrana externa como consecuencia de la delección del gen *clpB*.

Así, se han seleccionado los genes *clpB* y *cpxA*, y mediante la técnica de mutagénesis dirigida mediante transducción con bacteriófagos P1 se ha introducido la mutación para los genes *clpB* y *cpxA* a partir de las cepas de la colección Keio, *E. coli* JW2573 y JW3525, respectivamente, en la cepa de referencia de *E. coli* MG1655. Posteriormente, se ha eliminado el marcador de resistencia antibiótica mediante una FLP recombinasa, lo que ha permitido que la cepa mutante construida tuviese una secuencia genómica lo más parecida posible a la secuencia original.

Una vez obtenidos estos mutantes en *E. coli* MG1655 será posible evitar cualquier posible interferencia del gen de resistencia antibiótica, y de este modo,

verificar, en un estudio posterior, el posible papel de los genes seleccionados sobre la termorresistencia de *E. coli*.

## **ABSTRACT**

In this research, a preliminary study has been carried out about the influence of *cspA*, *cpxA*, *hscA*, *recA* y *clpB* genes on the heat resistance of *Escherichia coli*, by comparing the resistance of the wild type strain BW25113 with the mutants obtained from Keio's collection. Subsequently, and in order to be able of confirming in the next future, the results obtained in a reference strain (*E. coli* MG1655), deleterious mutants of this strain were built by using molecular tools.

As a result of the preliminary study, a direct relationship has been established between the deletion of *cpxA*, *recA* y *clpB* genes and a greater microbial sensitivity to heat treatments. Precisely, the study has revealed a decrease in the intrinsic resistance of the cytoplasmic membrane as a consequence of the deletion of *cpxA*, *recA* y *clpB* genes so, the expression of theses genes might be related to the stabilization of this cell envelope against heat treatments, and in the case of *cpxA* y *clpB* genes with the repair mechanism of the damages occurred on that cell envelope. Similarly, the study has revealed a decrease in the intrinsic resistance of the outer membrane as a consequence of the deletion of *clpB* gene.

Thus, *clpB* y *cpxA* genes were selected, and by using a conducted mutagenesis technique by transduction with bacteriophage P1, the mutation for *clpB* y *cpxA* genes obtained from Keio's collection, JW2573 and JW3525, respectively, has been included in the reference strain (*E. coli* MG1655). Subsequently, the antibiotic resistance marker has been deleted by using a FLP recombinase, which has allowed us to obtaine a mutant strain with a genomic sequence similar to the original sequence.

Once the *E. coli* MG1655 mutants were obtained, it will be possible to avoid any unlikely interference of the antibiotic resistance gene, and thus, to verify in a later study the likely role of the selected genes of the heat resistance of *E. coli*.

## **1. INTRODUCCIÓN**

A medida que la población mundial crece, la disponibilidad de alimentos disminuye. Estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) señalan que la producción de alimentos para el año 2050 debería aumentar en un 70%. Por esta razón, se están invirtiendo enormes esfuerzos en el desarrollo de métodos que permitan aumentar la producción de más alimentos. Por un lado, se han propuesto investigaciones dirigidas hacia la mejora de la distribución y explotación agrícolas, tales como la selección de plantas más resistentes al calor, a la sequía, parásitos y falta de nutrientes, rotaciones de cultivos o gestión del suelo (Nature 2010). Por otro lado, el 40% de los alimentos producidos mundialmente se pierden o se estropean (UNEP 2009).

Una de las principales causas del deterioro de los alimentos es la presencia y crecimiento de microorganismos. Además de provocar el deterioro de los alimentos, la presencia de microorganismos en los alimentos puede causar graves enfermedades. Recientemente, estos problemas han sido especialmente evidentes en Europa con el brote de *Escherichia coli* O104:H4, que causó 50 muertes, y más de 4.000 casos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y no-SUH. Por esta razón, hay también una gran necesidad de mejorar la seguridad alimentaria.

Por lo tanto, mejoras en los procesos de conservación, junto con mejores técnicas agrícolas e higiénicas, podrían contribuir al aumento de la disponibilidad y seguridad de los alimentos. Los métodos de conservación de los alimentos que actúan inactivando microorganismos permiten, además de prolongar su vida útil, garantizar su inocuidad. En la actualidad el método de inactivación microbiana más usado en la conservación de alimentos es el calor (Gould 2000). Si bien se han descrito aspectos fundamentales tales como la resistencia de las especies patógenas y alterantes, o la influencia de factores medioambientales, un adecuado aprovechamiento de la potencialidad de los tratamientos térmicos requiere profundizar en el estudio de los mecanismos de inactivación microbiana por el calor. Por una parte, el fenómeno de daño subletal tras el tratamiento térmico es un aspecto relevante desde el punto de vista de la conservación de los alimentos (Mackey, 2000; Mañas y Pagán, 2005). Las células subletalmente dañadas tienen una resistencia inferior a estreses posteriores

(Mackey 2000). El estudio de la existencia de daños subletales ha permitido describir efectos sinérgicos al combinar el calor con otras barreras o métodos de conservación (García et al 2005; Somolinos et al. 2007, 2010; Leistner et al 1995; Espina et al 2010, 2011). Para obtener una adecuada comprensión del efecto de esta tecnología sobre los microorganismos, en este estudio se propone la utilización de nuevas herramientas moleculares que nos permitan profundizar en el campo de la termobacteriología y, más concretamente, en la descripción de los mecanismos de inactivación microbiana por calor. En este sentido, la investigación planteada se ha centrado en el estudio de la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta al estrés de *E. coli* sobre la termorresistencia de *Escherichia coli* BW25113.

Entre todo el genoma de *E. coli* se seleccionaron los siguientes genes candidatos, por su posible implicación en estreses de origen alimentario:

-*cspA*: Este gen codifica para CspA (Jones et al 1987), una proteína principal del choque frío que actúa como factor positivo de transcripción de los genes de choque frío *hns* (Brandi et al 1994; La Teana et al 1991; Giangrossi et al 2001) y *gyrA* (Jones et al 1992).

-*cpxA*: Este gen codifica para CpxA, un receptor quinasa de la membrana citoplasmática, que forma parte del sistema de dos componentes CpxAR de transducción de señales (Dong et al 1993). Se cree que este sistema está implicado en la respuesta a daños en las envolturas celulares (Pogliano et al 1997). De hecho, la producción de CpxA se induce bajo diversas condiciones, como pH alcalino, alteraciones en la composición lipídica de la membrana, interacción con superficies hidrofóbicas y alta osmolaridad (Dorel et al 2006), estreses relacionado con situaciones de estrés en las envolturas celulares.

-*hscA*: Este gen codifica para la chaperona HscA, que junto a HscB forman un sistema chaperona/cochaperona similar al de DnaK/DnaJ (Vickery et al 1997, Silberg et al 1998).

-*recA*: Este gen codifica para RecA, implicado en varias funciones bioquímicas, como la recombinación homóloga mediante la catálisis de las reacciones de

intercambio de cadenas de DNA, como proteína reguladora que induce la respuesta SOS frente al daño en el DNA mediante su acción sobre la proteína represora LexA, o como componente para el reemplazo mutagénico de las lesiones sobre el DNA durante la respuesta SOS (Kuzminov 1999; Courcelle et al 2003).

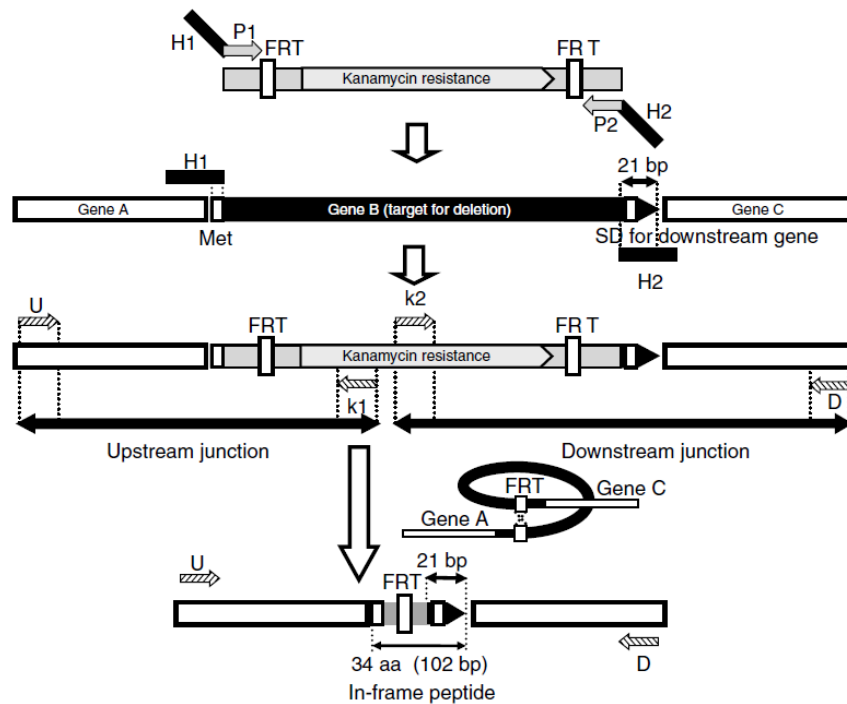
-*clpB*: Este gen codifica para ClpB, que pertenece a la superfamilia de proteínas AAA+ (ATPasas asociadas con múltiples actividades celulares). ClpB junto al sistema de chaperonas DnaK pueden resolubilizar agregados proteicos (Mogk et al 2003) in vitro e in vivo (Mogk et al 1999; Zolkiewski 1999; Goloubinoff et al 1999).

La manipulación genética de los microorganismos es una herramienta molecular basada en la tecnología del DNA recombinante especialmente útil para nuestra investigación, siendo uno de los estudios más interesantes la determinación de la resistencia microbiana de cepas mutantes con deleciones en determinados genes. La comparación de la resistencia entre las cepas parentales y sus correspondientes mutantes permiten estudiar la implicación de determinados genes en los mecanismos de inactivación, resistencia y reparación microbiana frente a tratamientos de conservación de los alimentos.

*Escherichia coli* ha sido uno de los organismos mejor caracterizados en biología molecular. De hecho, basado en este microorganismo, se desarrolló un proyecto de genómica funcional en Japón para crear nuevos recursos experimentales, establecer y desarrollar nuevos métodos de análisis y analizar la función de los genes (Mori et al 2000). Entre los objetivos de este proyecto se encontraba la construcción de una colección de mutantes deletéreos simples cubriendo todos los genes de *E. coli* (Baba et al 2006). Este objetivo se alcanzó mediante un método altamente eficiente para la inactivación de genes cromosómicos en *E. coli* (Datsenko et al 2000). Para ello, se utilizó un plásmido de pocas copias y fácil curación que expresaba la recombinasa 1 Red (sistema 1 Red). Entre las ventajas de este sistema se encuentran la posibilidad de seleccionar genes para su delección, diseñar deleciones arbitraria y eliminar fácilmente el marcador (*cassette*) de resistencia a continuación. Para la mutagénesis se utilizaron productos de PCR que contenían una *cassette* de resistencia de kanamicina flanqueada por los sitios de reconocimiento del FLP (sitios FRT) y unas secuencias de 50 pb



adyacentes a la secuencia cromosómica a deletear. La transformación del plásmido en la célula permitía la recombinación con el gen a eliminar, sustituyendo todo el gen por el marcador de la kanamicina flanqueado por los sitios FRT (**Figura 1**). Siguiendo este procedimiento de un modo masivo y sistemático se consiguió la colección Keio, que cuenta con más de 3.000 mutantes deletéreos en *E. coli* (Baba et al 2006).



**Figura 1.** Procedimiento empleado para la construcción de los mutantes deletéreos de la colección Keio de *E. coli*. En primer lugar se sustituye el gen a deletear por un fragmento que contiene el marcador de resistencia a la kanamicina. Este marcador es eliminado en el último paso con la ayuda de una FLP recombinasa. Adaptado de Baba et al (2006).

Nuestro laboratorio dispone de esta colección en la actualidad, lo que nos está permitiendo realizar un estudio detallado de la influencia de ciertos genes en los mecanismos de inactivación, resistencia y reparación microbiana frente a tratamientos de conservación de los alimentos. Sin embargo, el uso de esta colección en nuestros estudios presenta dos problemas principales:

- Por un lado, la cepa utilizada para la construcción de esta colección es *E. coli* BW25113, una cepa modificada para facilitar los trabajos de mutagénesis dirigida. Por

otra parte, la cepa elegida por el grupo de Blattner (Blattner et al 1997) para realizar la primera secuenciación del genoma de *E. coli* fue la cepa *E. coli* MG1655. Desde ese momento los estudios más relevantes acerca de la fisiología de *E. coli* se han realizado con esta cepa. Con objeto de poder comparar nuestros resultados con el de otros autores y aprovechar la gran cantidad de herramientas relacionadas con *E. coli* resulta fundamental en nuestro caso trabajar con la cepa MG1655.

- Por otro lado, la presencia del gen de resistencia frente a la kanamicina en los mutantes deletéreos de la cepa *E. coli* BW25113 podría conducir a interpretaciones erróneas en la evaluación de la resistencia de dichos microorganismos. Para la eliminación de dicha resistencia (proceso denominado curación), se necesita la producción de una FLP recombinasa dentro del mutante que permita la recombinación de los fragmentos FRT y así eliminar el gen de resistencia a la kanamicina.

## **2. OBJETIVOS**

Así, esta investigación persigue dos objetivos principales:

**Objetivo 1.** Realizar un estudio preliminar sobre la influencia de los genes *cspA*, *cpxA*, *hscA*, *recA* y *clpB* en la resistencia al calor de *Escherichia coli*, mediante la comparación de la resistencia de la cepa parental BW25113 y las cepas mutantes obtenidas de la colección Keio. De este modo, pretendemos centrar nuestra atención en aquellos genes cuya delección modifica la resistencia al calor de *E. coli*.

**Objetivo 2.** Creación de mutantes deletéreos en *E. coli* MG1655 mediante el uso de herramientas moleculares y la colección Keio. Las técnicas utilizadas fueron la transducción mediante bacteriófagos y posterior curado de los marcadores de resistencia a antibiótico mediante la activación de una FLP recombinasa. Una vez obtenidos estos mutantes en *E. coli* MG1655 será posible evitar cualquier posible interferencia, y de este modo, verificar el posible papel de los genes seleccionados sobre la termorresistencia de *E. coli* en dicha cepa de referencia.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 .Microorganismos y condiciones de cultivo.**

Para este estudio se usaron cepas suministradas por el National Institute of Genetics de Japón pertenecientes a la colección Keio (Baba et al. 2006), realizada a partir de la cepa de *E. coli* BW25113. Esta colección está constituida por cepas mutantes para cada uno de los genes no esenciales de *E. coli* mediante una delección y sustitución por un *cassette* que confiere resistencia a kanamicina (Km<sup>R</sup>). Además de la cepa parental BW25113, se estudiaron las cepas mutantes deletéreas para los genes *cspA*, *cpxA*, *hscA*, *recA* y *clpB*.

Además, la cepa *E. coli* MG1655, cepa de referencia en el estudio de la fisiología bacteriana desde los estudios de secuenciación de Blattner en 1997, se usó en la fase final de la investigación para crear mutantes de los genes que resultaran relevantes durante el transcurso de la misma, para futuros estudios.

Las cepas se conservaron en crioviales (Scharlau, Barcelona, España) a -80 °C. A partir de estos se realizaron siembras por agotamiento en estría en placas de Luria Agar (LA) (Sigma Aldrich, Milán, Italia). Las siembras se realizaron de forma semanal durante toda la fase de investigación de este trabajo.

Para la preparación de las suspensiones microbianas se sembró una colonia aislada en un tubo con 5 mL de caldo estéril Luria Broth (LB) (Sigma Aldrich) y se incubó durante 18 h a 37 °C ± 1 °C. A partir de estos precultivos se inocularon 100 µL en un frasco estéril de 200 mL con 50mL de caldo LB y se incubó en agitación continua a 130 rpm (Selecta, modelo Rotabit, Barcelona, España), a 37 °C ± 1 °C en una estufa de aire forzado (Selecta, modelo Hotcold UL). Los cultivos se incubaron durante 24 h hasta alcanzar la fase estacionaria a una concentración aproximada de 2\*10<sup>9</sup> UFC/mL.

### **3.2 Estudio de la resistencia frente al calor (55 °C) de *E. coli* BW25113 y de los mutantes seleccionados para el estudio:**

La determinación de la termorresistencia a 55 °C de los microorganismos en fase estacionaria se llevó a cabo con una incubadora de placas multipocillo (Incubador

FX, A.F. Ingeniería S.L., Valencia, España), que se adaptó para aplicar tratamientos térmicos en tubos de poliestireno de 1 mL, mediante una gradilla de acero inoxidable con 96 pocillos colocada en su interior (**Figura 3.1**). Cada uno de estos tubos estériles contenía 630  $\mu\text{L}$  del medio de tratamiento (tampón McIlvaine a pH 7,0). A cada uno de estos tubos se le inoculó 70  $\mu\text{L}$  del cultivo en fase estacionaria obteniendo una concentración final de microorganismos de  $2,9 \cdot 10^8$  UFC/mL. A diferentes tiempos de tratamiento se extrajeron muestras, se enfriaron en hielo y se realizaron diluciones decimales en tubos eppendorf estériles con 0,9 mL de agua de peptona al 0,1% a temperatura ambiente. A partir de estos tubos se realizó la siembra en estría en placas de Petri estériles de LA, y posteriormente se incubaron durante 24 h a  $37 \pm 1$  °C. El número de supervivientes se determinó mediante un contador automático de colonias por análisis de imagen (Protos, Analytical Measuring Systems, Cambridge, UK), en el rango de recuento comprendido entre 30 y 30.000 UFC/placa.

La temperatura del medio de tratamiento se controló durante todo el experimento mediante el registro de la temperatura con una sonda termopar tipo “K” (Almemo®, modelo 2450, Ahlborn, Holzkirchen, Alemania) colocada en uno de los tubos.



**Figura 3.1:** Imagen de la Incubadora FX de placas multipocillo empleada para la determinación de la termorresistencia

### **3.3. Elaboración de las curvas de crecimiento bacteriano.**

Se elaboraron las curvas de crecimiento de la cepa parental y de aquellos mutantes que mostraron una termorresistencia distinta a la de la cepa parental, con objeto de comprobar si dichas mutaciones podían también afectar al crecimiento microbiano.

Para la realización de las curvas de crecimiento, a partir de las suspensiones microbianas bajo incubación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se extrajeron muestras de 100  $\mu\text{L}$  a intervalos regulares de tiempo durante un periodo de 24 horas. Tras las diluciones seriadas en agua peptona al 0,1% se realizó la siembra en superficie en placas de LAY se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Las curvas de crecimiento se elaboraron representando el logaritmo del número de UFC/mL frente al tiempo de incubación.

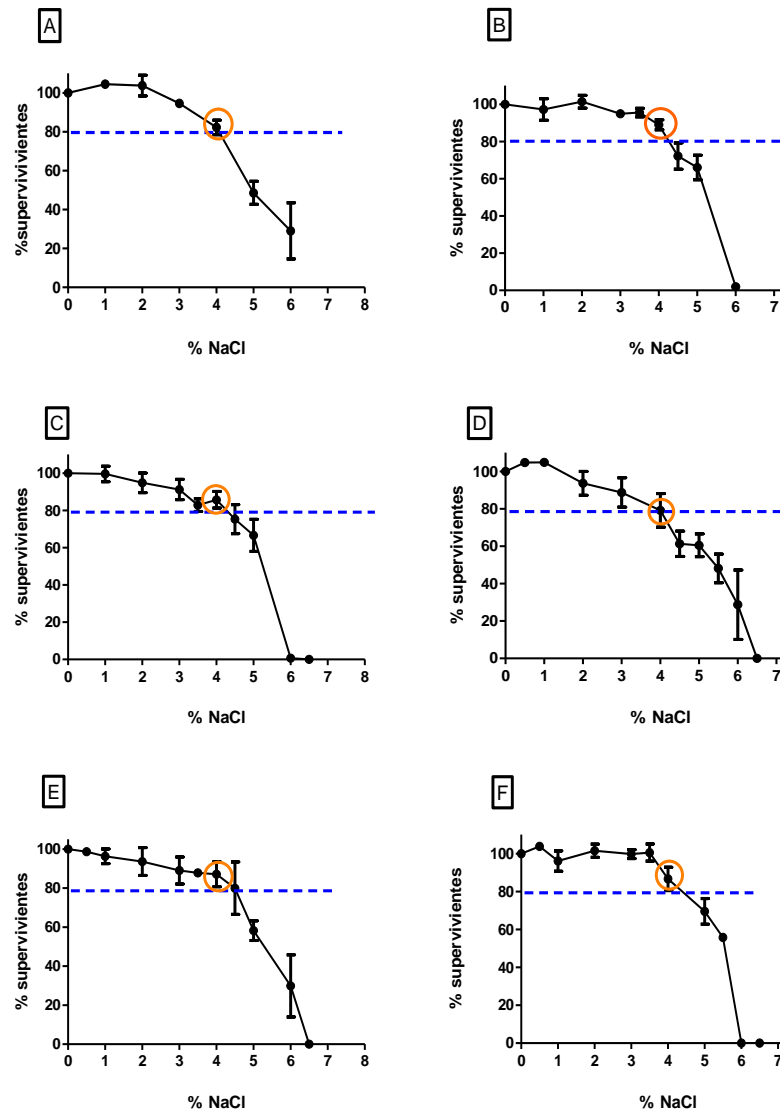
### **3.4. Estudio del daño subletal.**

Para detectar la presencia de células dañadas subletalmente en sus envolturas celulares tras el tratamiento térmico se usó la técnica de la siembra diferencial en medio no selectivo (LA) y medios selectivos (LA –NaCl: para la determinación de daños subletales en la membrana plasmática; y LA –sales biliares: para la determinación de daños subletales en la membrana externa) (Mackey, 2000).

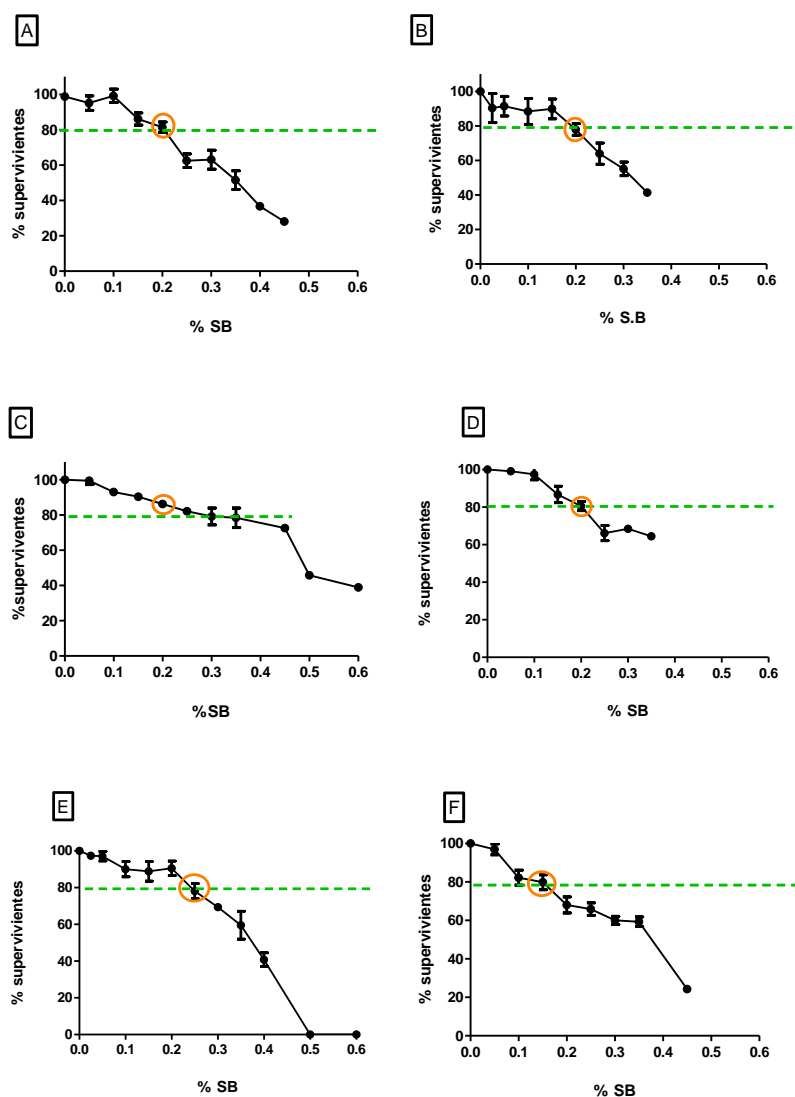
Previamente fue necesario determinar la CMNI (Concentración Máxima No Inhibitoria) para cada una de las cepas y medios selectivos. En el presente estudio se ha considerado la Concentración Máxima No Inhibitoria (CMNI) como aquella que causa una disminución en el la población de células nativas inferior al 20 %.

Para detectar los daños en la membrana plasmática se sembraron en masa placas de LA con diversas concentraciones crecientes de NaCl (Panreac, S.A., Alella, Barcelona, España), entre 0 y 6 % (p/v) y, tras 48 h de incubación, se procedió a determinar el número de supervivientes. Como se muestra en la **Figura 3.2** y la **Tabla 3.1**, la CMNI de NaCl fue coincidente para las seis cepas estudiadas.





**Figura 3.2.** Influencia de la presencia de NaCl en el medio de recuperación sobre la supervivencia de células nativas de (A) *E. coli* BW25113, (B) *E. coli* BW25113  $\Delta$ clpB, (C) *E. coli* BW25113  $\Delta$ cpxA (D) *E. coli* BW25113  $\Delta$ cspA (E) *E. coli* BW25113  $\Delta$ hscA y (F) *E. coli* BW25113  $\Delta$ recA. La concentración rodeada por el círculo señala la CMNI de NaCl.



**Figura 3.3.** Influencia de la concentración de sales biliares en el número de colonias de células nativas de (A) *E. coli* BW25113, (B) *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$ , (C) *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (D) *E. coli* BW25113  $\Delta cspA$  (E) *E. coli* BW25113  $\Delta hscA$  y (F) *E. coli* BW25113  $\Delta recA$ . La concentración rodeada por el círculo señala la CMNI de sales biliares.

De igual modo, para detectar daños en la membrana externa celular se realizaron siembras en masa en placas de LA con diversas concentraciones de sales biliares (Biolife), entre 0 y 0,35 % (p/v) y, tras 48 h de incubación, se procedió al recuento de UFC por placa mediante el contador automático. La **Figura 3.3** y la **Tabla**

**3.1** muestran las CMNI obtenidas en el medio LA-sales biliares para las distintas cepas ensayadas. Así, se obtuvo una CMNI de 0,2% para las cepas *E. coli* BW25113, *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  y *E. coli* BW25113  $\Delta cspA$ . Las células nativas de las cepas *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  y *E. coli* BW25113  $\Delta recA$  mostraron mayor sensibilidad presentando una CMNI de 0,15%; y por el contrario, la cepa mutante *E. coli* BW25113  $\Delta hscA$  mostró una mayor resistencia a la presencia de sales biliares que la cepa parental tolerando una concentración de 0,25%.

Cepa	CMNI (LA-NaCl)	CMNI (LA-sales biliares)
<i>E. coli</i> BW25113	4%	0,2%
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta clpB$	4%	0,2%
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta cpxA$	4%	0,15%
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta cspA$	4%	0,2%
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta hscA$	4%	0,25%
<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta recA$	4%	0,15%

**Tabla 3.1:** Concentraciones máximas no inhibitorias de NaCl y sales biliares adicionadas a los medios de recuperación de cultivos de células nativas de *E. coli* en fase estacionaria de crecimiento.

#### 3.4.1. Siembra en medios selectivos y determinación del daño subletal.

Una vez aplicado el tratamiento a 55 °C se realizaron las siembras en medio no selectivo (LA), y medios selectivos (LA –NaCl) o (LA-sales biliares).

Esta técnica nos permite observar si los daños causados por el calor en las envolturas celulares bacterianas son letales/irreversibles, en cuyo caso, el número de supervivientes tras el tratamiento es el mismo en medio selectivo y no selectivo. Cuando el número de supervivientes recuperados en los medios selectivos tras el tratamiento es inferior, es en ese caso cuando se detecta daño subletal. Así, se estimó la proporción de células dañadas subletalmente a nivel de membrana plasmática y de membrana externa, como la diferencia entre el número de log<sub>10</sub> de U.F.C/mL obtenidas en medios no selectivos y selectivos.

### **3.5. Análisis estadístico de los datos.**

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y en días independientes, utilizando suspensiones obtenidas en diferentes días. Las barras de error en las figuras indican las desviaciones estándar de la media para los recuentos obtenidos en esos tres experimentos independientes.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EE. UU.). Este programa se utilizó para determinar las desviaciones estándar, realizar los test *t* de student y los análisis de Varianza.

### **3.6. Construcción de mutantes *E. coli* MG1655 $\Delta$ *cpxA* y *E. coli* MG1655 $\Delta$ *clpB*.**

#### **3.6.1. Transducción.**

Para la obtención de los lisados que contuvieran partículas víricas con el material genético encapsulado de las cepas donantes de *E. coli* BW25113  $\Delta$ *cpxA* y *E. coli* BW25113  $\Delta$ *clpB*, se prepararon tubos de ensayo estériles con 2 mL de LB suplementado con MgCl<sub>2</sub> (10 mM) CaCl<sub>2</sub> (5 mM) y glucosa al 0,2 %. Estos tubos se atemperaron a 37 °C durante 15 min y se inocularon con 20 µL de las cepas donantes *E. coli* BW25113  $\Delta$ *clpB* y *E. coli* BW25113  $\Delta$ *cpxA* en fase estacionaria. Cuando los cultivos alcanzaron una OD<sub>595</sub> = 0,25 se inocularon 80 µL de bacteriófagos P1 y se incubaron a 37 °C durante unas 4 horas hasta que la turbidez en el tubo disminuyó de forma evidente debido a la lisis bacteriana. A continuación, estos cultivos se adicionaron con 100 µL de cloroformo y se realizó una resuspensión en mezclador de vórtice (Genius, modelo ika vortex 3, Königswinter, Alemania). El contenido del tubo de ensayo se pasó a tubos eppendorf estériles y se centrifugaron durante 2 min a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf, modelo Mini Spin, Hamburgo, Alemania). Los fagos procedentes del lisado que se encontraban en el sobrenadante se recogieron mediante pipeta, se les añadió 20 µL de cloroformo y se conservaron a 4 °C hasta su posterior uso.

Para el siguiente paso de la transducción se hizo crecer la cepa receptora *E. coli* MG1655 hasta alcanzar una fase exponencial tardía con una OD<sub>595</sub> = 0,8. 1 mL de este cultivo se centrifugó (6000 rpm, 2 min) y se resuspendió en 300 µL de LB suplementado con MgSO<sub>4</sub> (100 mM) y CaCl<sub>2</sub> (5 mM). A 100 µL de esta suspensión se le añadieron 100 µL del stock del lisado P1 procedente de *E. coli*  $\Delta clpB$  y se incubaron durante 30 min a 37 °C en agitación. Transcurrido este tiempo se añadió 1 mL de caldo LB y 100 µL de una solución 1 M de citrato de sodio para detener la infección de las células. Tras volver a incubar a 37 °C en agitación durante 1 h, las muestras se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 min, y el pellet se resuspendió en 100 µL de medio LB con citrato de sodio (100 mM).

Esta suspensión bacteriana se sembró en placas de LA con kanamicina (25 µg/mL) y citrato de sodio (10 mM) y se incubó a 37 °C durante 24 h. Se seleccionaron algunas de las colonias que crecieron en este medio y se sometieron a dos nuevos pases en placas de LA con kanamicina y citrato de sodio. A esta nueva cepa obtenida tras la transducción se le denominó *E. coli* MG1655  $\Delta clpB$  (+kan<sup>R</sup>). Esta cepa es una *E. coli* deletérea para el gen que codifica la chaperona ClpB y con un *cassette* de resistencia a la kanamicina en el locus de dicho gen.

Este segundo paso de la transducción se repitió de igual manera con el lisado obtenido a partir de la cepa mutante  $\Delta cpxA$  y el resultado fue la obtención de la nueva cepa *E. coli* MG1655  $\Delta cpxA$  (+kan<sup>R</sup>), que al igual que en el caso anterior presentaba un *cassette* de resistencia a la kanamicina en lugar del gen que codifica la proteína CpxA.

### 3.6.2. Eliminación del marcador de la kanamicina.

Para evitar posibles errores e interferencias del gen de resistencia a la kanamicina en la evaluación de la resistencia microbiana de las diferentes cepas mutantes se eliminó dicho gen. Este proceso se denomina curación y para tal fin se utilizó el plásmido pCP20.

### 3. 6.2.1. Aislamiento del plásmido pCP20 a partir de NB762.

El plásmido pCP20 se obtuvo a partir de la cepa NB762 (suministrada por el Profesor Beckwith de Harvard Medical School, EE.UU.). Para ello, esta cepa se cultivó en una placa de LA con ampicilina (100 µg/mL) a 30 °C durante 24 h para la sobreexpresión de este plásmido. Para el aislamiento del plásmido pCP20 se usó el kit “QIAprep Spin Miniprep” (QIAGEN, Hilden, Alemania). Este kit se basa en tecnología de membrana de gel de sílice y produce el aislamiento en tres pasos: (1) lisis alcalina, (2) adsorción del DNA a la membrana de gel de sílice en presencia de una elevada concentración salina y (3) el lavado y elución del DNA plasmídico en una solución amortiguadora de baja concentración salina.

### 3.6.2.2. Transformación

Para la transformación se cultivaron las cepas receptoras del plásmido *E. coli* MG1655  $\Delta clpB$  (+kan<sup>R</sup>) y *E. coli* MG1655  $\Delta cpxA$  (+kan<sup>R</sup>) a 37 °C en agitación hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (OD<sub>595</sub>=0,3-0,4). Se centrifugaron 10 ml de este cultivo a 4.000 rpm durante 20 min a 4 °C (centrífuga Heraeus, modelo Megafuge 1.0 R, Hanau, Alemania). El pellet se resuspendió en 5 ml de solución “transformante” compuesta por 60 mM de CaCl<sub>2</sub>, 15% de glicerol y 10 mM de PIPES (piperazine-N,N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)) y los tubos se depositaron en hielo durante 20 min. Tras volver a centrifugar a 2.500 rpm durante 5 min a 4 °C, se resuspendió en 1 mL de la solución "transformante" para obtener las células competentes.

A 200 µL de las células competentes *E. coli* MG1655  $\Delta clpB$  (+kan<sup>R</sup>) y *E. coli* MG1655  $\Delta cpxA$  (+kan<sup>R</sup>) se les añadió 20 µL del plásmido pCP20. Esta suspensión se dejó reposar en hielo 20 min tras los cuales se sometió a un choque térmico de 42 °C durante 1,5 min para la introducción del plásmido al citoplasma bacteriano, se volvió a incubar en hielo 2 min, se añadieron a la suspensión 800 µL de LB y se incubó 1 h a 37 °C.

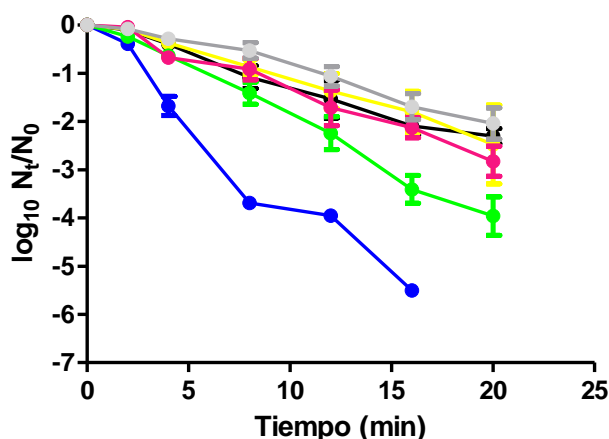
A continuación se sembraron alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  y 50  $\mu\text{L}$  en placas de LA con diferentes concentraciones de ampicilina (100, 25 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ) y tras la incubación a 30  $^{\circ}\text{C}$  durante 24 h se seleccionaron las colonias correspondientes.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### 4.1. Resistencia frente al calor (55 °C) de *E. coli* BW25113 y de cinco cepas mutantes deletéreas para los genes *cspA*, *cpxA*, *hscA*, *recA* y *clpB*

La **Figura 4.1** muestra las gráficas de supervivencia a 55 °C en tampón Mcllvaine de pH 7,0 de la cepa parental *E. coli* BW25113 y de las cinco cepas mutantes seleccionadas.



**Figura 4.1.** Gráficas de supervivencia de *E. coli* BW25113 (●), *E. coli* BW25113  $\Delta cspA$  (●), *E. coli* BW25113  $\Delta hscA$  (●), *E. coli* BW25113  $\Delta recA$  (○), *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  (●) y *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (●) tras un tratamiento a 55 °C en tampón Mcllvaine de pH 7,0.

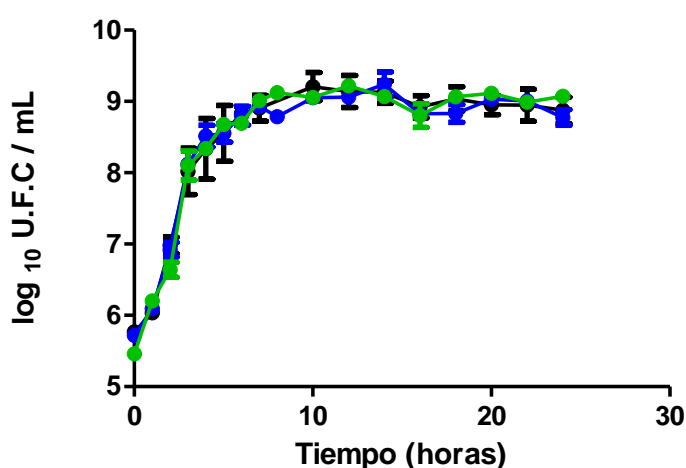
Como se observa en la gráfica, la cinética de inactivación de la cepa parental siguió un curso exponencial, lográndose la inactivación de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos tras 20 min de tratamiento a 55 °C. Del mismo modo, se observa que la inactivación de las cepas *E. coli* BW25113  $\Delta cspA$ , *E. coli* BW25113  $\Delta hscA$  y *E. coli* BW25113  $\Delta recA$  siguió también un curso exponencial, no detectándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las curvas de supervivencia, y por tanto, entre la termorresistencia a 55 °C de los tres mutantes y la cepa parental. Por el contrario, la termorresistencia a 55 °C de las cepas *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  y *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  fue significativamente menor ( $p > 0,05$ ) a la de la cepa parental. Así, tras 20 min de tratamiento a 55 °C se logró la inactivación de aproximadamente 4 ciclos logarítmicos de la cepa *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  y más de 5 ciclos logarítmicos (superándose el límite de detección) de la cepa *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$ . **La mayor sensibilidad de estas dos**

cepas sugiere que la expresión de los genes *cpxA*, y especialmente la del gen *clpB*, está directamente relacionada con la resistencia microbiana al calor.

#### 4.2. Curvas de crecimiento.

Con objeto de comprobar si la delección de los genes *cpxA* y *clpB* pudiera estar interfiriendo en la velocidad de crecimiento microbiano y, de este modo, en la menor termorresistencia microbiana de las cepas *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  y *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$ , se elaboraron las curvas de crecimiento de la cepa parental y de las dos cepas mutantes. Los microorganismos alcanzan su máxima termorresistencia durante la fase estacionaria de crecimiento (Hansen y Riemann, 1963; Pagán et al. 1998; Mañas y Pagán, 2005), por lo que un retraso en el crecimiento podría indirectamente ser responsable de la menor termorresistencia observada.

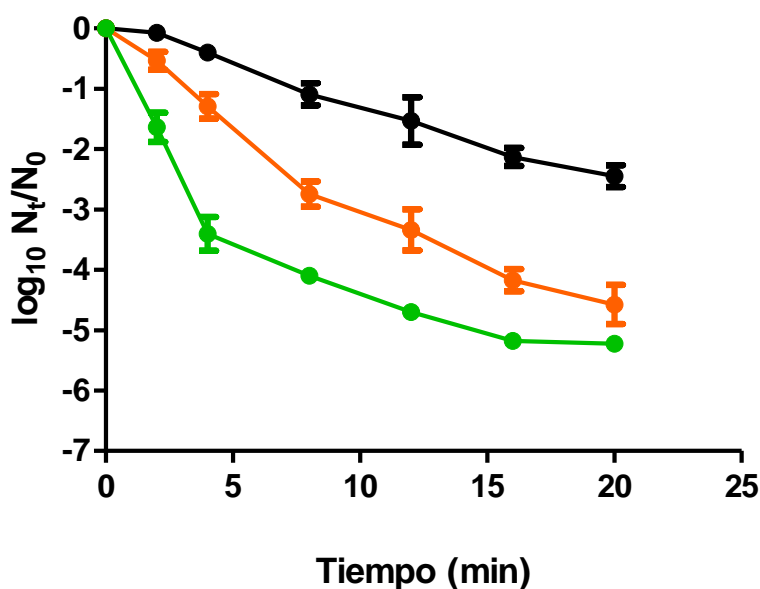
La **Figura 4.2** muestra las curvas de crecimiento de la cepa parental y las dos cepas mutantes obtenidas en caldo LB a 37 °C. Como se observa, no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las curvas de crecimiento de las tres cepas, lo que demuestra **que la delección de los genes ni *clpB* y *cpxA* no afectó ni a la velocidad de crecimiento ni al número final de microorganismos de estas cepas de *E. coli*, por lo que no puede establecerse relación directa entre el crecimiento y la menor termorresistencia.**



**Figura 4.2.** Curvas de crecimiento de *E. coli* BW25113 (●), *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (●) y *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  (●) en LB a 37 °C.

**4.3. Resistencia frente al calor (55 °C) de *E. coli* BW25113 y de cinco cepas mutantes deletéreas para los genes *cspA*, *cpxA*, *hscA*, *recA* y *clpB* en medios selectivos: Determinación de la presencia de daño subletal.**

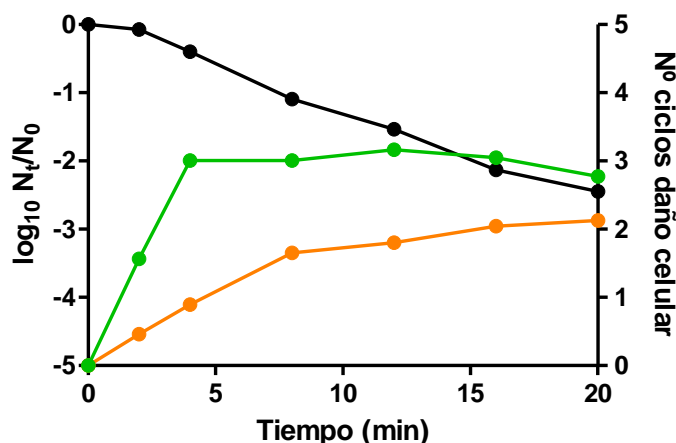
La **Figura 4.3** muestra las gráficas de supervivencia de la cepa parental tratada a 55 °C en tampón Mcllvaine de pH 7,0 tras la recuperación de los supervivientes en medio no selectivo y en medio selectivo con NaCl (LA-NaCl) y sales biliares (LA-sales biliares). Como se observa en la gráfica, el número de supervivientes de la cepa parental recuperados en los medios selectivos fue inferior al obtenido en el medio no selectivo demostrando **la presencia de daño subletal en ambas membranas celulares de una gran parte de los supervivientes.**



**Figura 4.3.** Curvas de supervivencia a 55 °C de *E. coli* BW25113, tratada en tampón Mcllvaine de pH 7,0, y recuperadas en medio no selectivo (●) medio selectivo con NaCl (●) y sales biliares (●).

La diferencia entre los recuentos obtenidos en los medios selectivos y el medio no selectivo permitió evidenciar el número de células dañadas subletalmente. Con objeto de evidenciar la magnitud del daño subletal ocasionado por el calor en

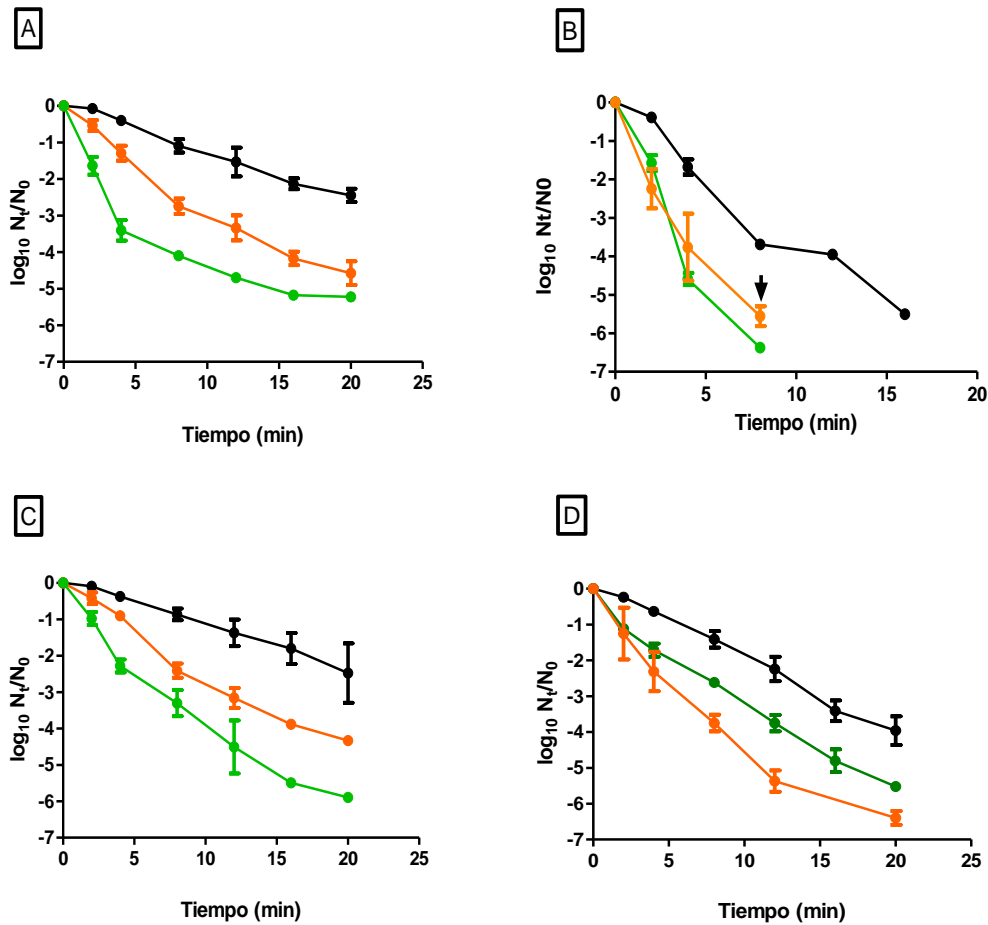
ambas estructuras, la **Figura 4.4** representa la cinética de inactivación microbiana de la cepa parental obtenida en el medio no selectivo, y la compara con el número de ciclos logarítmicos de células dañadas en ambas envolturas celulares.

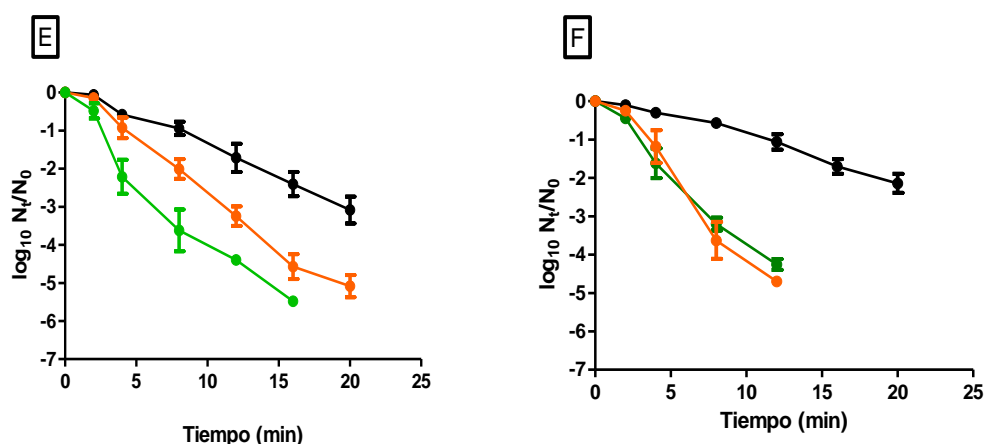


**Figura 4.4.** Curvas de supervivencia a 55 °C *E. coli* BW25113 en tampón McIlvaine de pH 7,0 y recuperación en medio no selectivo (●), y ciclos de daño celular en función del tiempo de tratamiento evidenciados por la recuperación de los supervivientes en selectivo con NaCl (○) y sales biliares (●).

Así, por ejemplo, tras 8 min de tratamiento se observa la inactivación de un 90-95% de la población, y de entre los microorganismos supervivientes, aproximadamente el 99% (2 ciclos logarítmicos) presentarían daños en su membrana citoplasmática y el 99,9% (3 ciclos logarítmicos) en la membrana externa. El porcentaje de células dañadas en su membrana externa parece aumentar hasta los 4 min de tratamiento, mientras que en la membrana plasmática continua aumentando progresivamente hasta los 20 min. De este modo, tras 20 minutos de tratamiento el porcentaje de células dañadas en ambas estructuras celulares tiende a igualarse. **El comportamiento de este microorganismo no difiere del habitualmente descrito para otras cepas de *E. coli* u otros microorganismos investigados (Pagán et al. 1998; Mackey, 2000; Mañas y Pagán, 2005; Ait-Ouazzou et al. 2011, Espina et al. 2011).**

Del mismo modo, la recuperación de los supervivientes de las cepas mutantes en medios selectivos (**Figura 4.5**) permitió demostrar que en **todas las cepas el calor ocasionaba daños subletales en las dos envolturas celulares, aunque el patrón de comportamiento difirió entre las distintas cepas**. Se incluyen nuevamente los datos de la cepa parental para facilitar la comparación de los resultados (**Figura 4.5.A**). Si bien las cepas *E. coli* BW25113  $\Delta cspA$  (**Figura 4.5C**), y *E. coli* BW25113  $\Delta hscA$  (**Figura 4.5E**) mostraron un comportamiento muy similar al de la cepa parental, observándose daño subletal en ambas membranas y en mayor medida en la externa, las cepas de *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  (**Figura 4.5B**), *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (**Figura 4.5D**) y *E. coli* BW25113  $\Delta recA$  (**Figura 4.5F**) mostraron ciertas diferencias.





**Figura 4.5.** Curvas de supervivencia a 55<sup>0</sup> C de (A) *E. coli* BW25113, (B) *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$ , (C) *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (D) *E. coli* BW25113  $\Delta cspA$  (E) *E. coli* BW25113  $\Delta hscA$  y (F) *E. coli* BW25113  $\Delta recA$ , tratadas en tampón Mcllvaine de pH 7,0, y recuperadas en medio no selectivo (●) medio selectivo con NaCl (●) y sales biliares (●).

Los resultados obtenidos en la cepa mutante en *cspA* indicarían que la proteína de choque térmico A, que previene la formación de estructuras secundarias del RNA (a modo de chaperona de RNA) a bajas temperaturas, no estaría involucrada en la resistencia al calor. De todos modos, sería conveniente determinar la termorresistencia de las células en fase exponencial de crecimiento y/o en células sometidas a un choque frío, ya que se ha observado que su expresión es mayor en fase logarítmica o tras una bajada de temperatura de 37 °C a 10 °C (Jones et al 1987; Goldstein et al 1990). Del mismo modo, la resistencia del mutante en *hscA* fue similar a la de la cepa parental, lo que indicaría o bien que la chaperona HscA perteneciente a la familia de proteínas de choque térmico 70 (Hsp70) no desempeña ningún papel en la resistencia al calor de *E. coli* o que su expresión en nuestras condiciones de cultivo es baja. Sería conveniente, al igual que en el caso del mutante *cspA*, realizar estos mismos experimentos sobre células sometidas a un choque frío, ya que se ha visto que la expresión de *hscA* es inducida por choques fríos (Lelivelt et al 2005).

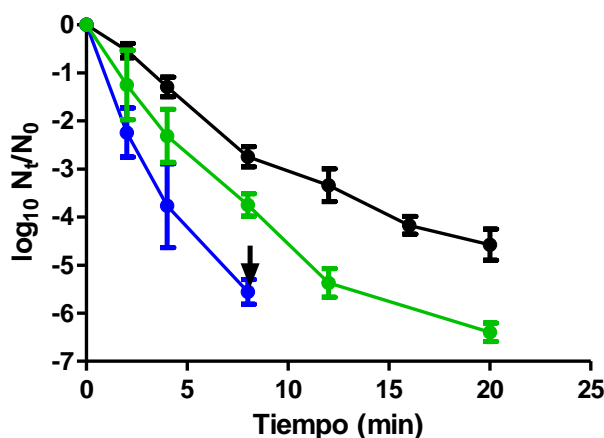
En relación a la cepa *E. coli* BW25113  $\Delta recA$  (**Figura 4.5F**), que había mostrado una resistencia similar a la de la cepa parental en medio no selectivo, ésta mostró un

comportamiento inusual cuando los supervivientes al tratamiento térmico se recuperaron en medios selectivos. Como se observa en la gráfica, los recuentos en ambos medios fueron coincidentes, lo que denota que el porcentaje de células dañadas en ambas membranas fue el mismo. Si comparamos estos recuentos obtenidos en medios selectivos con los de la cepa parental, observamos que el diferente comportamiento se debe a los menores recuentos obtenidos en el medio LB-NaCl para la cepa mutante. De este modo, estos resultados indican que la resistencia intrínseca de la membrana citoplasmática frente al calor está relacionada con la expresión del gen *recA*: **la delección de este gen provoca** que un mayor porcentaje de supervivientes al tratamiento térmico acumulen **daños subletales en la membrana plasmática**. Esta observación revela una circunstancia de un gran atractivo desde el punto de vista fisiológico, porque si el papel de RecA está únicamente relacionado con la reparación del daño al DNA (Karu et al 1982), sería esperable una menor capacidad de reparación de los mutantes *recA*, y no una menor resistencia intrínseca de la membrana citoplasmática. Por tanto, resulta de interés realizar futuros estudios para determinar la posible relación de *recA* con la membrana citoplasmática. Cabe señalar, por tanto, que **gracias a la utilización de medios de recuperación selectivos, ha sido posible establecer cierta relación entre la expresión del gen *recA* y la termorresistencia microbiana**. Además, desde un punto de vista práctico, la existencia de un mayor porcentaje de células dañadas subletalmente tras el tratamiento podría resultar de utilidad en el diseño de procesos combinados de conservación de alimentos basados, por ejemplo, en el uso de calor y antimicrobianos, que podrían aprovechar los daños subletales existentes en la membrana plasmática para penetrar al interior celular y lograr mayores niveles de inactivación (Somolinos et al., 2010).

Por otra parte, las cepas de *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  (**Figura 4.5B**) y *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (**Figura 4.5F**), que se habían mostrado menos termorresistentes en medio no selectivo (**Figura 4.1.**), mostraron algunas diferencias respecto de la cepa parental cuando se recuperaron en medios selectivos. Por un lado, también para la cepa *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  el porcentaje de células dañadas en la membrana plasmática y externa fue similar ( $p > 0,05$ ), obteniéndose menores recuentos en el medio selectivo LA-NaCl en comparación con la cepa parental, lo que denota una

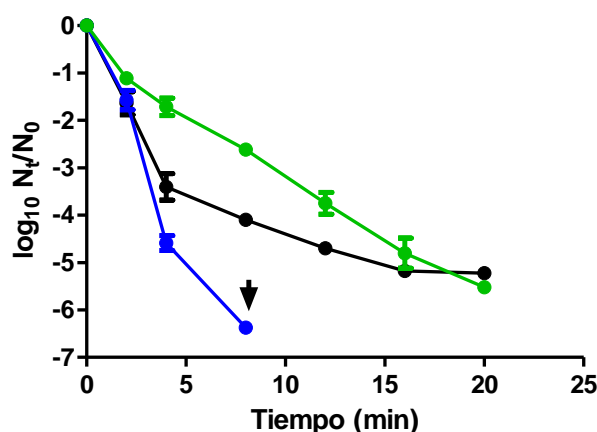
mayor termosensibilidad de la membrana plasmática frente al calor, y confirma **el papel de la expresión del gen *clpB* en la termorresistencia microbiana, concretamente sobre la estabilidad de la membrana citoplasmática**. De este modo, la chaperona ClpB implicada en la supresión y reversión de la agregación de proteínas desnaturalizadas (Mogk et al 2003), intervendría no sólo facilitando la reparación de los daños causados por el calor en las envolturas celulares, sino en la generación de unas envolturas más resistentes a la acción de este agente inactivador.

Por el contrario, los resultados obtenidos sobre *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  resultaron algo más complejos dado que, a diferencia del comportamiento de las otras cinco cepas de *E. coli*, los recuentos obtenidos en medio selectivo LA-sales biliares fueron mayores a los obtenidos en medio selectivo LA-NaCl, lo que significa que **el porcentaje de células dañadas en su membrana externa en esta cepa fue menor que el de células dañadas en su membrana plasmática**. Con objeto de comprobar si las diferencias en termorresistencia entre la cepa parental y las cepas mutantes *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  y *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  están relacionadas con una menor resistencia intrínseca de sus envolturas celulares y/o fenómenos de reparación celular, a continuación se han representado las gráficas de supervivencia de la cepa parental y las 2 cepas mutantes obtenidas en LA-sales biliares (**Figura 4.6**) y LA-NaCl (**Figura 4.7**).



**Figura 4.6.**Curvas de supervivencia a 55 °C de las cepas *E. coli* BW25113 (●), *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  (●) y *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (●) tratadas en tampón Mcllvaine de pH 7,0, y recuperadas en medio selectivo con NaCl.





**Figura 4.7.** Curvas de supervivencia a 55 °C de las cepas *E. coli* BW25113 (●), *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  (●) y *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (●) tratadas en tampón McIlvaine de pH 7,0, y recuperadas en medio selectivo sales biliares.

La falta de coincidencia entre las curvas de supervivencia de la cepa parental y las cepas mutantes obtenidas en el medio selectivo con NaCl (**Figura 4.6**) indicaría que la resistencia intrínseca de la **membrana plasmática** de ambas cepas mutantes era menor que la de la cepa parental al verse afectadas un mayor número de supervivientes, lo que sugiere que **la expresión del gen *cpxA*, al igual que la del gen *clpB*, podría estar relacionada con la estabilización de esta envoltura celular frente a los tratamientos térmicos**. Además, el mayor porcentaje de células dañadas en la membrana plasmática para un mismo tiempo de tratamiento entre la cepa parental (**Figura 4.3**) y las cepas *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  (**Figura 4.5.B**) y *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (**Figura 4.3.F**), también indicaría que **la expresión de estos dos genes no solo está relacionada con la resistencia intrínseca de esta estructura, sino también con los mecanismos de reparación de los daños ocasionados sobre dicha envoltura celular**. De este modo, la delección de los genes *cpxA*, y especialmente la del gen *clpB*, podría estar relacionada con una menor capacidad de reparación de daños subletales sobre la membrana plasmática.

La representación de las curvas de supervivencia de la cepa parental y las dos mutantes en medio selectivo con sales biliares (**Figura 4.7**) permite evidenciar que, al menos durante los primeros minutos de tratamiento, la resistencia intrínseca de la membrana externa de la cepa mutante *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$  es similar a la de la cepa

parental; no obstante, tras 8 min de tratamiento se observa un mayor número de células de la cepa mutante afectadas, indicando que **la expresión del gen *clpB* también podría estar relacionado con la mayor resistencia intrínseca de la membrana externa y/o una mayor capacidad de reparación de los daños ocasionados por el tratamiento térmico**. Por el contrario, esta figura permite comprobar que los recuentos obtenidos en el medio selectivo con sales biliares para la cepa *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  son mayores que los obtenidos para la cepa parental. Es decir, en este caso, hay un menor número de células de la cepa mutante afectadas en su membrana externa por el tratamiento térmico. Estos resultados sugieren que **la delección del gen *cpxA* supondría un aumento de la termorresistencia de la membrana externa de *E. coli***, lo que no resulta fácil de explicar, y requeriría de un estudio más amplio. Es decir, el incremento de resistencia intrínseca en la membrana citoplasmática debido a la acción de la chaperona CpxA, podría conllevar a una disminución de la resistencia de la membrana externa. Así, de confirmarse estos resultados en otras especies o cepas, se podría concluir que esta mutación es capaz de incrementar sensiblemente la resistencia al calor, lo que podría tener cierta relevancia, por ejemplo, en el desarrollo de procesos combinados basados en la aplicación simultánea de calor y antimicrobianos (Somolinos et al., 2010), para los que la mayor estabilidad de la membrana externa impediría su acción al dificultar su acceso al interior celular.

#### **4.4. Construcción de mutantes *E. coli* MG1655 $\Delta clpB$ y *E. coli* MG1655 $\Delta cpxA$ .**

El trabajo exploratorio sobre la implicación de los genes *cspA*, *hscA*, *recA*, *clpB* y *cpxA* en la termorresistencia de *E. coli* BW25113 demostró la relevancia de la expresión de *clpB* y *cpxA* en la resistencia intrínseca y los mecanismos de reparación de los daños ocasionados sobre las envolturas celulares. Estos resultados pueden ser de gran relevancia para el conocimiento de la respuesta al estrés de *E. coli*. Sin embargo, la cepa estudiada *E. coli* BW25113 es una cepa modificada para facilitar los trabajos de mutagénesis dirigida. Por ello, es necesario seleccionar una cepa de referencia más aceptada por la comunidad científica internacional para la elaboración de estudios de fisiología microbiana con el fin último de contribuir al desarrollo del conocimiento del

comportamiento microbiano ante situaciones de estrés y poder comparar estos datos con los publicados utilizando cepas de referencia. De este modo, para realizar una investigación con mayor profundidad científica, se decidió la creación de los mutantes deletéreos *clpB* y *cpxA* en la cepa *E. coli* MG1655, sobre la que, desde su secuenciación por Blattner et al. (1997), se han realizado algunos de los estudios más relevantes del campo de la fisiología microbiana.

En este estudio se utilizó una técnica de mutagénesis dirigida (Hutchison et al., 1978) para deleccionar la secuencia de los genes *clpB* y *cpxA*. Esta técnica consiste en introducir una construcción con la mutación en el genoma bacteriano a mutar. Nuestra colección Keio dispone de dichas construcciones incorporadas en el genoma de *E. coli*. De este modo, no es necesario que hagamos de nuevo esas construcciones, simplemente tenemos que "moverlas" de un genoma a otro. Con ese objetivo, utilizamos la transducción con fagos, que contienen fragmentos de la secuencia genómica del *E. coli* inicial, con las construcciones incluidas, que transferiremos a nuestro *E. coli* deseado. Este procedimiento permite crear mutantes en diferentes cepas de *E. coli* de una forma rápida, económica y precisa. Del mismo modo, la conservación de los fagos con diferentes construcciones nos permitirán en un futuro crear dobles o triples mutantes en diferentes genes para, de este modo, poder realizar análisis más detallados y dirigidos de regulación y relación génica.

No obstante, en las técnicas del DNA recombinante usadas en la mutagénesis dirigida con la cepa *E. coli* BW25113 se utilizó como marcador un gen de resistencia a la kanamicina, con objeto de detectar de una forma rápida, sencilla y económica las bacterias que han resultado mutadas. A pesar de su utilidad, una vez detectados y aislados los organismos mutantes, la presencia de estos marcadores en la secuencia genómica no es necesaria, pudiendo llegar a ser perjudicial en los estudios microbiológicos, ya que estos genes pueden intervenir en diferentes procesos del metabolismo y fisiología microbianas. Por tanto, su eliminación resulta de gran importancia para realizar estudios fiables sobre este microorganismo. De este modo, una vez realizada la transformación, resulta necesario eliminar el marcador de

resistencia antibiótica, con el objetivo de obtener una cepa cuya secuencia genómica sea lo más parecida posible a la secuencia original.

El uso de la cepa de referencia de *E. coli* MG1655, en lugar de la cepa BW25113 (colección Keio), nos permite trabajar con la cepa de referencia de *E. coli* en los estudios de fisiología bacteriana. Al ser una cepa cuya secuencia genómica es de acceso público, se permiten posteriores modificaciones genéticas y estudios transcripcionales y traduccionales. En este sentido, al trabajar con esta cepa podremos comparar directamente nuestros resultados con los de otros autores sin añadir el factor de variación de la cepa y nos permitirá el uso de herramientas bioinformáticas gratuitas como *E. coli* Gene Expression Database (<http://genexpdb.ou.edu/main/>) para el estudio de la expresión génica y el transcriptoma en situaciones de estrés.

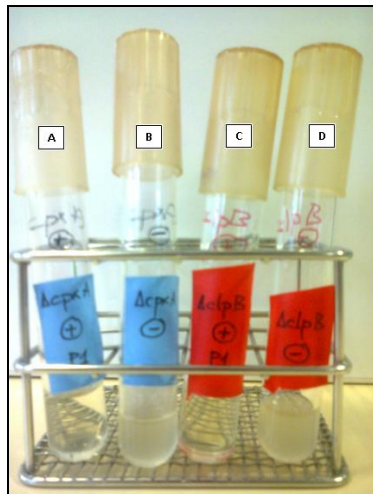
#### 4.4.1 Transducción con el fago P1.

En el proceso de la transducción se usaron como cepas donantes dos mutantes deletéreos de *Escherichia coli* pertenecientes a la colección Keio, *E.coli* BW25113  $\Delta clpB$  (JW2573) y *E.coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (JW3525). Estos mutantes se seleccionaron para esta segunda parte de la investigación debido a que fueron los que presentaron diferencias más significativas con respecto a la cepa parental en los estudios de termorresistencia. Como cepa receptora de la transducción se seleccionó *E. coli* MG1655, cepa de referencia de *E. coli* en los estudios de fisiología bacteriana.

El primer paso para lograr la transferencia de material genético se centra en la infección de las cepas donantes en fase estacionaria con el bacteriófago P1. Tras 4 horas de incubación a 37 °C se obtuvo el lisado para ambas cepas donantes.

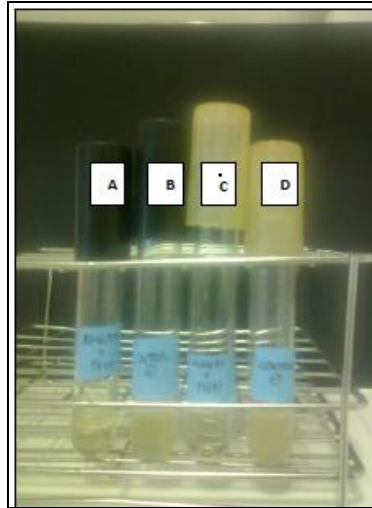
En la **Figura 4.8** se muestran los tubos preparados como control negativo **(B)** y **(D)**, a los cuales no se les añadieron bacteriófagos, en los que no se produjo lisis bacteriana y por tanto, no se detectó un descenso de la turbidez. En el caso de los tubos **(A)** y **(C)**, los cuales se inocularon fagos P1 para la infección de las células

donantes, se observa claramente un descenso de la turbidez como consecuencia de la lisis bacteriana.



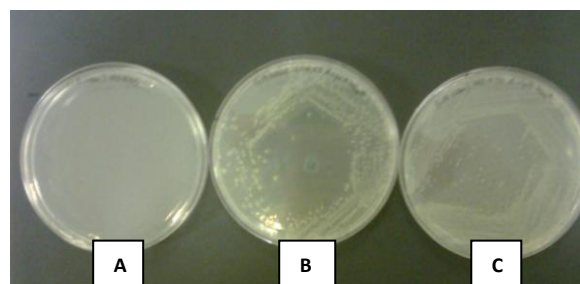
**Figura 4.8.** Obtención de los lisados de los bacteriófagos P1a partir de las cepas donantes *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$  (A), y  $\Delta clpB$  (C). La Figura incluye los controles negativos (B) y (D) sin adición de bacteriófagos P1 de (A) y (C) respectivamente.

En el siguiente paso de la transducción, las células receptoras *E. coli* MG1655, se incubaron junto con el lisado de bacteriófagos obtenidos a partir de las cepas donantes durante 4 h a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en agitación. La **Figura 4.9.** muestra los tubos (A) y (C) sin turbidez debido a la acción de los bacteriófagos P1. Además, se muestran los controles negativos (B) y (D) en los que la turbidez aumentó como consecuencia del crecimiento bacteriano en ausencia de bacteriófagos.



**Figura 4.9.** Transducción con bacteriófago P1. (A) Transducción de *E. coli* MG1655 con P1 obtenido tras lisado de *E. coli* BW25113  $\Delta cpxA$ , (C) Transducción de *E. coli* MG1655 con P1 obtenido tras lisado de *E. coli* BW25113  $\Delta clpB$ . (B) y (D) fueron utilizados como controles negativos (sin adición de bacteriófagos P1) de (A) y (C) respectivamente.

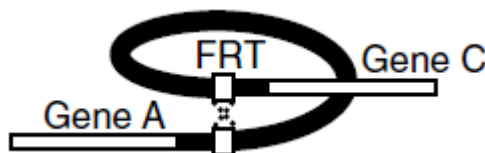
A partir de las suspensiones bacterianas obtenidas de los tubos **(A)** y **(C)**, se sembraron alícuotas de 100  $\mu$ L en placas de LA con kanamicina (25  $\mu$ g/mL), y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se aislaron colonias para su cultivo en nuevas placas con kanamicina y así verificar que las células de *E. coli* MG1655 habían incorporado el fragmento de DNA correspondiente a la delección provocada por la inserción del gen de resistencia al antibiótico. De este modo, confirmamos que habíamos obtenido las nuevas cepas *E. coli* MG1655  $\Delta clpB$  (+kan<sup>R</sup>) y *E. coli* MG1655  $\Delta cpxA$  (+kan<sup>R</sup>) (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** Placas de Luria Agar con kanamicina (25 µg/mL) sembradas con las cepas *E. coli* MG1655 (A), *E. coli* MG1655  $\Delta cpxA$  (+kan<sup>R</sup>) (B), y *E. coli* MG1655  $\Delta clpB$  (+kan<sup>R</sup>) (C).

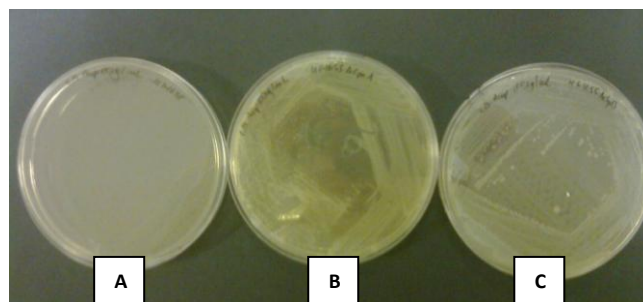
#### 4.4.2. Eliminación del marcador de la kanamicina.

En este proceso denominado curación, se eliminó el gen de resistencia a la kanamicina para evitar su interferencia en futuras evaluaciones sobre la resistencia bacteriana de las nuevas cepas. Para ello, en primer lugar, se realizó un proceso de transformación con el plásmido pCP20. El plásmido incorporado a las cepas *E. coli* MG1655  $\Delta clpB$  (+kan<sup>R</sup>) y *E. coli* MG1655  $\Delta cpxA$  (+kan<sup>R</sup>) presenta un gen de resistencia a la ampicilina y al cloranfenicol, así como un gen que permite la producción de una FLP recombinasa dentro del mutante. Esta recombinasa permite la recombinación entre los fragmentos FRT y la expulsión del marcador de resistencia a la kanamicina (Figura 4.11).



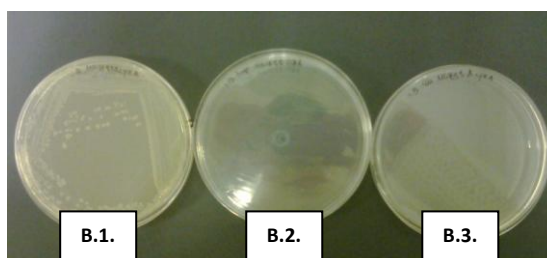
**Figura 4.11.** Reacción catalizada por la FLP recombinasa en la que se recombinan las dos secuencias de reconocimiento de flipasa (fragmentos FRT) que flanquean el gen a eliminar (Baba et al. 2006).

Tras la transformación de *E. coli* MG1655  $\Delta clpB$  (+kan<sup>R</sup>) y *E. coli* MG1655  $\Delta cpxA$  (+kan<sup>R</sup>) con el plásmido pCP20 se realizaron siembras en placas de LA con ampicilina (100 µg/mL) para confirmar la incorporación del plásmido en las bacterias (Figura 4.12).

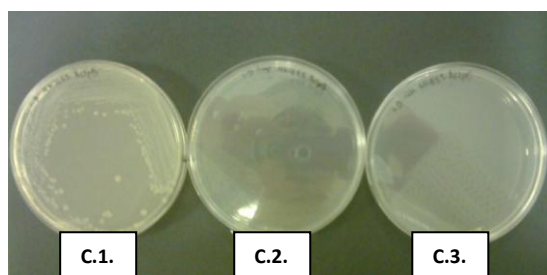


**Figura 4.12.**Placas de Luria Agar con ampicilina (100 µg/mL) sembradas con las cepas *E. coli* MG1655 (A), *E. coli*MG1655  $\Delta$ *cpxA* (+*Amp<sup>R</sup>*) (B), y *E. coli* MG1655  $\Delta$ *clpB* (+*Amp<sup>R</sup>*) (C).

Por último, se activó la expresión de la FLP recombinasa del plásmido pCP20 sensible a la temperatura sembrando colonias de *E. coli* MG1655  $\Delta$ *clpB* (+*kan<sup>R</sup>*) y *E. coli* MG1655  $\Delta$ *cpxA* (+*kan<sup>R</sup>*) transformadas con este plásmido en placas LA a 43°C durante 24 h. Tras este paso, se comprobó la pérdida de todas las resistencias antibióticas sembrando en medios con antibióticos. Estas cepas se denominaron finalmente *E. coli* y *E. coli* MG1655  $\Delta$ *cpxA* (Figura 4.13) y MG1655  $\Delta$ *clpB* (Figura 4.14).



**Figura 4.13.**Cepa *E. coli* MG1655  $\Delta$ *cpxA* en medio Luria Agar (B.1), Luria Agar con ampicilina (100 µg/mL) (B.2),y Luria Agar con kanamicina(100 µg/mL) (B.3)



**Figura 4.14.**Cepa *E. coli* MG1655  $\Delta$ *clpB* en medio Luria Agar (C.1), Luria Agar con ampicilina (100 µg/mL) (C.2),y Luria Agar con kanamicina(100 µg/mL) (C.3).



Como último paso de esta investigación, debería confirmarse con PCR la delección del gen deseado y la eliminación del gen de resistencia de la kanamicina. Una vez verificada que la delección de los genes *clpB* y *cpxA* se había realizado correctamente, se deberán realizar los correspondientes experimentos de termorresistencia sobre estas cepas mutantes y sobre la cepa parental *E. coli* MG1655 (actividad para la que ya no se ha dispuesto de tiempo suficiente para su finalización)

En resumen, la transformación mediante el uso del bacteriófago P1 nos permitió crear mutantes en la cepa de referencia MG1655 de una forma rápida y económica. La transformación de los mutantes así conseguidos con el plásmido pCP20 permitió la eliminación del gen de resistencia a la kanamicina. De esta manera hemos obtenido los mutantes “limpios” en la cepa MG1655, sobre los que deberán verificarse los resultados obtenidos en la cepa BW25113, descartando la influencia del cassette de kanamicina y de las modificaciones realizadas sobre la cepa BW25113 utilizada para la construcción de la cepa Keio. Además, estos mutantes en la cepa MG1655 nos permitirán realizar futuros trabajos de fisiología microbiana, así como utilizar los fagos con estas construcciones para crear dobles o triples mutantes destinados a estudios más detallados del papel de estos genes y su interacción con otros genes.

## **5. CONCLUSIONES**

- 1) Los estudios preliminares de termorresistencia realizados sobre la cepa parental *Escherichia coli* BW25113 y 5 mutantes deletéreos en los genes *cspA*, *cpxA*, *hscA*, *recA* y *clpB* permitieron relacionar la delección de los genes *cpxA*, *recA* y *clpB* con una mayor sensibilidad a los tratamientos térmicos.
- 2) Desde un punto de vista metodológico, cabe señalar que la relación de la termorsensibilidad y el gen *recA* ha podido establecerse gracias a la utilización de medios de recuperación selectivos, y con los genes *cpxA* y *clpB* mediante el uso de medios selectivos como no selectivos.
- 3) El estudio preliminar sobre la presencia de daños subletales en las envolturas celulares microbianas reveló una disminución de la resistencia intrínseca de la membrana citoplasmática como consecuencia de la delección de los genes *cpxA*, *recA* y *clpB*, por lo que la expresión de estos genes podría estar relacionada con la estabilización de esta envoltura celular frente a los tratamientos térmicos, y en el caso de los genes *cpxA* y *clpB* con los mecanismos de reparación de los daños ocasionados sobre dicha envoltura celular.
- 4) El estudio sobre la presencia de daños subletales en las envolturas celulares microbianas reveló una disminución de la resistencia intrínseca de la membrana externa como consecuencia de la delección del gen *clpB*. Por el contrario, la delección del gen *recA* no afectó a la estabilidad de la membrana externa y la del gen *cpxA* incluso pareció incrementarla.
- 5) Desde un punto de vista práctico, esta investigación preliminar ha demostrado que la delección de los genes *cpxA*, *recA* y *clpB* conduce a una mayor sensibilidad microbiana, por lo cual el diseño de estrategias de conservación que impidan su expresión y actividad podrían redundar en una mayor efectividad de los tratamientos conservación de los alimentos.
- 6) Las herramientas moleculares utilizadas en esta investigación han permitido la creación de mutantes deletéreos de *Escherichia coli* MG1655 para los genes elegidos, *clpB* y *cpxA*.

- 7) La técnica de mutagénesis dirigida mediante transducción con bacteriófagos P1 permitió introducir la mutación para los genes *clpB* y *cpxA* a partir de las cepas de la colección Keio, *E. coli* JW2573 y JW3525, respectivamente, en la cepa de referencia de *E. coli* MG1655.
- 8) La eliminación del marcador de resistencia antibiótica mediante una FLP recombinasa permitió que la cepa mutante construida tuviese una secuencia genómica lo más parecida posible a la secuencia original, evitando así la interferencia del gen de resistencia al antibiótico kanamicina. Así, una vez obtenidos estos mutantes se podrá evitar cualquier posible interferencia, y de este modo, verificar, en un estudio posterior, el posible papel de los genes seleccionados en la termorresistencia de la cepa de referencia de *E. coli*.

## **Bibliografía**

- Ait-Ouazzou, A., et al., The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 2011. **12**: 320-329.
- Baba, T., et al., Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2006. **2**: 2006-2008.
- Blattner, F.R., et al., The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 1997. **277**(5331): 1453-1462.
- Brandi A., et al., Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of hns. *Biochimie*, 1994. **76** (10-11): 1090-1098.
- Courcelle J., and Hanawalt P.C., RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks. *Annual Reviews of Genetics*, 1994. **37**: 611-646.
- Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**(12): 6640-6645.
- Dong J., et al., The deduced amino-acid sequence of the cloned cpxR gene suggests the protein is the cognate regulator for the membrane sensor, CpxA, in a two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *Gene* 1993. **136**(1-2): 227-230.
- Dorel C., et al., The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities?. *Research in Microbiology*, 2006. **157**(4): 306-314.
- Espina, L., et al., Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 2011. **122**: 896-902.
- Espina, L., et al., Effect of citral on the thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in citrate phosphate buffer and apple juice. *Journal of Applied Bacteriology*, 2010. **73**(12): 2189-2196.
- García, D., et al., Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium pH and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Bacteriology*, 2005. **99**(1): p. 94-104.

- Giangrossi M., et al., Mutagenesis of the downstream region of the *Escherichia coli* hns promoter. *Biochimie*, 2001. **83**(2): 251-259.
- Goldstein J., et al., Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1990. **87**(1): 283-287.
- Goloubinoff P., et al., Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.*, 1999. **96**(24): 13732-13737.
- Gould, G.W., Preservation: past, present and future. *British Medical Bulletin*, 2000. **56**(1): 84-96.
- Hansen, N.H., and Riemann, H., Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 1963. **26**: 314-333.
- Hutchison, C.A., et al., Mutagenesis at a specific position in a DNA-sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 1978. **253**(18): 6551-6560.
- Jones P.G., et al., DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 1992. **174**(18): 5798-5802.
- Jones P.G., et al., Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1987. **169**(5): 2092-2095.
- Karu A.E., and Belk E.D., Induction of *E. coli* recA protein via recBC and alternate pathways: quantitation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Molecular and General Genetics*, 1982. **185**(2):275-282.
- Kuzminov A., Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999. **63**(4): 751-813.
- Leistner, L. and Gorris, L.G.M., Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Science and Technology*, 1995. **6**: 41-46.
- Lelivelt M.J., and Kawula T.H., Hsc66, and Hsp70 homolog in *Escherichia coli* is induced by cold shock but not by heat shock. *Journal of Bacteriology*, 1995. **177**(17): 4900-7.
- Mackey, B.M., Injured bacteria. In B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, & G. W. Gould (Eds.), *The Microbiological Safety and Quality of Food*, 2000. (pp. 315-341). Gaithersburg: Aspen Publisher, Inc.
- Mañas, P., and Pagán, R., Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 2005. **98**: 1387-1399.

- Mogk A., et al., Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular Microbiology*, 2003. **50**(2): 585-595.
- Mogk A., et al., Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *The EMBO journals*, 1999. **18**(24):6934-6949.
- Mori, H., et al., Functional genomics of *Escherichia coli* in Japan. *Research in Microbiology*, 2000. **151**(2): 121-8.
- Nature, How to feed a hungry world. *Nature*, 2010. **466**(7306): 531-532.
- Pagán, R., et al., Heat resistance in different heating media of *Listeria monocytogenes* grown at different temperatures. *Journal of Food Safety*, 1998. **18**: 205-219.
- Silberg J.J., et al., The Hsc66-Hsc20 chaperone system in *Escherichia coli*: chaperone activity and interactions with the DnaK-DnaJ-grpE system. *Journal of Bacteriology*, 1998. **180**(24): 6617-6624.
- Somolinos, M., et al., Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*, 2010. **108**: 1928-1939.
- Somolinos, M., et al., Relationship between sublethal injury and inactivation of yeast cells by the combination of sorbic acid and pulsed electric fields. *Applied and Environmental Microbiology* 2007. **73**(12): 3814-3821.
- U.N.E.P., The environmental food crisis - The environment's role in averting future food crises. A UNEP rapid response assessment ed. C. Nellemann, et al. 2009: GRID-Arendal.
- Vickery L.E., et al., Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. *Protein Science*, 1997. **6**(5): 1047-1056.
- Zolkiewski M., ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli* *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(40): 28083-28086.