

NUEVO PÉPTIDO ANTIMICROBIANO TEN PRODUCIDO POR *Bacillus thuringiensis* SUBSP *Tenebrionis*

García Pérez A.P.^{a*}, De la Fuente-Salcido N.M.^{a*}, Barboza-Corona J.E.^b.

a Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, Departamento de Posgrado, Bioprospección y Bioprocesos. Boulevard Torreón-Matamoros Km. 7.5, Ciudad Universitaria. C.P. 27104. Torreón, Coahuila, México.

b Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, Campus Irapuato-Salamanca, Irapuato, Guanajuato, 36500, México.

* normapbr322@gmail.com; *adapgarciap@gmail.com

RESUMEN

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por bacterias, las más estudiadas son los sintetizados por bacterias ácido lácticas. Actualmente existen 18 diferentes bacteriocinas producidas por *Bacillus thuringiensis* con espectros antimicrobianos contra bacterias grampositivas, gramnegativas y hongos. Aquí, reportamos la producción del péptido antimicrobiano TEN, bacteriocina sintetizada por *B. thuringiensis* subsp *tenebrionis* semipurificada parcialmente por precipitación salina y diálisis. La actividad antibacteriana se determinó por la técnica de difusión en pozos utilizando *B. cereus* 183 como cepa indicadora y 18 diferentes *B. thuringiensis*. Todas las cepas analizadas mostraron inhibición en un rango de 402 a 912 UA y la concentración mínima inhibitoria contra *B. cereus* fue de 13 UA. La bacteriocina pierde 100 % de su actividad con la proteinasa K, que confirma la naturaleza proteica y resultó diferente sensible a otras enzimas (proteasa, tripsina, quimiotripsina, peptidasa, RNAsa y lipasa). Mostró una máxima actividad en pH de 5.0 a 7.5. La bacteriocina se analizó por uen SDS-PAGE, obteniendo un peso molecular ~6.5 kDa. Se detectó la actividad directa por sobrecapa con *B. cereus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Micrococcus luteus*.

ABSTRACT

Bacteriocins are antimicrobial peptides produced by bacteria and the most studied are those synthesized by lactic acid bacteria. At present there are 18 bacteriocins produced by different *Bacillus thuringiensis* subspecies and their antimicrobial spectra reported is broad against both Grampositive and Gramnegative bacteria and fungi. Here, we report the production of antimicrobial peptide TEN, a bacteriocin synthesized by *B. thuringiensis* subsp *tenebrionis*. This bacteriocin was partially purified by salting and dialysis. The antibacterial activity was determined by the well-diffusion method using *B. cereus* 183 as reporter bacterium and 18 diverse *B. thuringiensis*. All the strains assayed show inhibition from 402 to 912 AU and the minimum inhibitory concentration against *B. cereus* was of 13 AU. The protein is inactivated 100% with Proteinase K confirming its proteinaceous nature and was sensible to other enzymes. Bacteriocin was active in pH 5.0 to 7.5. Bacteriocin was analyzed by SDS-PAGE, the molecular weight was ~ 6.5 kDa and direct detection of activity in gel-overlay assay was confirmed with *B. cereus*, *K. pneumoniae* and *M. luteus*. Currently focused efforts to obtain the purified protein.

Palabras clave: Bacteriocina, *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis*, UA

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son biomoléculas de origen proteico producidas y secretadas por bacterias, las cuales presentan la capacidad de inhibir el desarrollo de otras especies bacterianas que pueden estar o no relacionadas filogenéticamente y representen amenazas de competencia por nutrientes dentro del ambiente donde se encuentren (Matthewes, 2004). Se trata de proteínas con diversas características dadas a partir de la cepa productora, las cuales pueden ser radicar en variación de pesos moleculares (>30 kDa a <10 kDa) y composición química (proteína, polipéptido, simple o complejo, es decir con o sin azúcares, lípidos, con aminoácidos poco comunes como lantionina, o por la estabilidad que poseen en amplios rangos de pH y temperatura, incluso algunas pueden ser termorresistentes. Los péptidos antimicrobianos al ser purificados pueden utilizarse como antzibióticos o agentes de conservación de alimentos ya que estudios recientes han demostrado un rango de acción amplio contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos que resultan patógenos como: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter cloacae* (de la Fuente *et al.*, 2008, Martínez *et al.*, 2011 y Balciunas *et al.*, 2013).

Entre los microorganismos productores de bacteriocinas, las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido las más ampliamente estudiadas. De las bacteriocinas sintetizadas por estas bacterias, la Nisina producida por *Lactococcus lactis* es la única aplicada a nivel comercial con fines de conservación de alimentos (Cotter *et al.*, 2010). El mecanismo de acción de las bacteriocinas mejor conocido es a partir de la formación de poros sobre la membrana y que genera una desestabilización del sistema celular generando la muerte del microorganismo (Sablon *et al.*, 2000). La principal diferencia entre bacteriocinas y antibióticos está dada precisamente por su origen proteico ya que las bacteriocinas por su naturaleza pueden ser inactivadas a través de enzimas presentes en el tracto digestivo como las tripsina y la pepsina, por lo que la flora intestinal no se ve afectada (Cleveland *et al.*, 2001).

En años recientes se han reportado nuevas bacteriocinas producidas POR *Bacillus thuringiensis* activas contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas (Barboza *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y propiedades de alguna bacteriocina sintetizada por la cepa comercial de *B. thuringiensis* subsp *tenebrionis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo utilizado

Se utilizó una cepa comercial de *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis*, *B. cereus* 183 como cepa indicadora y *K. pneumoniae*, *M. Luteus* para sobrecapa de agar.

Producción de bacteriocina y purificación parcial.

Para obtener la bacteriocina a partir un cultivo de *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis*, se realizó un pre-inóculo en 5 mL en Caldo de Soya Tripticaseina (BIOXON) que se incubó a 28°C y 180 rpm durante toda la noche hasta obtener una OD (600nm) de 1E08 del cual se inoculó en CST (BIOXON) a concentración 0.1% (v/v) bajo las mismas condiciones iniciales durante 24 h. Se muestreo cada 2 h para medir el crecimiento mediante la OD (600nm), conservando los sobrenadantes para

pruebas de actividad antimicrobiana por difusión en pozos y césped utilizando el *Bacillus cereus* como cepa indicadora. El cultivo fue centrifugado a 5000 rpm durante 15 minutos y 4°C para lograr la eliminación del paquete celular; el sobrenadante fue precipitado por saturación de sales al 80% con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) a 4°C durante toda la noche, el precipitado volvió a ser centrifugado bajo las mismas condiciones previamente mencionadas, después de la segunda centrifugación el sobrenadante se descartó y las proteínas adherida a las paredes del recipiente se resuspendieron en Buffer de fosfatos (BP) 100mM a pH de 6.8 por cada 100 mL de cultivo inicial. La proteína resuspendida en el BP se dializó frente a 1L del mismo buffer en un kit de mini-diálisis utilizando una membrana con tamaño de poro de 1 KDa (Amersham Biosciences).

Determinación de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó utilizando el *B. cereus* 183 como cepa indicadora en un cultivo fresco (en caldo soya Trypticaseina) a una concentración de 1E09 cel/ml que se diluyeron en agar pozos (0.012% agar bacteriológico, 0.15% CST) a punto de gelificación a razón de 0.7% (v/v). Las placas recién vertidas se incubaron durante 1 h aproximadamente a 28°C. Para observar la inhibición sobre césped se colocaron gotas de 7 µL de muestra (cada sobrenadante muestreado, el dializado de la proteína y un control positivo) mientras que para la prueba de difusión en pozos se realizaron orificios de 8mm de diámetro dentro de los cuales se colocaron 100 µL correspondientes a las muestras de sobrenadantes recolectadas. En el caso de la difusión en pozos, una vez colocadas las muestras en los orificios se refrigeraron las placas a 4°C hasta lograr una correcta absorción de la bacteriocina en el agar y posteriormente se incubaron durante 24 h a 28°C. Se cuantificó la inhibición mediante el cálculo de Unidades Arbitrarias, medición que está dada por la formula $A = \pi r^2 = \pi (D/2)^2 = \pi D^2/4$ según el diámetro del halo de inhibición. Una unidad arbitraria se define como 1mm² del halo de inhibición de crecimiento bacteriano (Barboza-Corona *et al.*, 2007).

Determinación de peso molecular y actividad directa en gel

La bacteriocina semi purificada por diálisis, se separó en dos geles de Tris-Tricina SDS PAGE al 16% (Schagger and von Jagow, 1987) para diferenciar la masa molecular de la proteína que produce actividad antimicrobiana. Después de correr los geles durante aproximadamente 2 h a 100 v se cubrió el primero con una solución fijadora de polipéptidos (metanol y ácido acético) en agitación durante 30 minutos y posteriormente se agregó el azul de coomassie y finalmente se destiñó con solución de ácido acético al 10%. La comparación de los pesos se logró usando marcador de peso molecular de polipéptidos (1.4-26.6 kDa Bio-Rad). Para determinar la actividad directa de la proteína se utilizó el otro gel, se fijó 30 minutos con una solución de 25% isopropanol y 10 % ácido acético (vol/vol) y realizaron 6 lavados on agua destilada estéril para después agregar la sobrecapa de 15 mL agar de pozos con 105 µL de *Bacillus cereus* 183, *Klebsiella pneumoniae* o *Micrococcus luteus*. Se dejaron incubar los geles toda la noche (28° o 37°C) y se determinó la presencia de inhibición en el gel.

Caracterización de la bacteriocina

Para determinar el efecto de diferentes componentes sobre la molécula, la bacteriocina fue sometida a tratamiento con diferentes enzimas (Proteínasa K (NEB), Proteasa (Sigma), Tripsina (Sigma) y Quimiotripsina(Sigma), peptidasa(Sigma), RNAsa (USB) y lipasa(Sigma) preparadas a una concentración de 1mg/mL, incubándolas por 2 horas a 37°C, a excepción de la Proteínasa K que se trató a 42°C por 2h) y solventes organicos (10% v/v de Acetona, Etanol, Propanol, Metanol y Butanol) para luego ser resuspendidas en Tris-HCL 10mM pH 7.5. La identificación del efecto de temperatura se realizó colocando 100µL de bacteriocina en tubos eppendorf y fue incubada a diferentes temperaturas (40-110°C) durante 30 minutos. De igual manera, diferentes alícuotas de bacteriocina fueron ajustadas a diferentes valores de pH (4.0 - 10), finalmente después de estos tratamientos la actividad fue determinada por el método de difusión en pozos.

RESULTADOS

Determinación de actividad antimicrobiana.

La determinación preliminar de actividad antimicrobiana mediante técnica de difusión en pozos únicamente mostró resultados con la proteína ya dializada dando una actividad inhibitoria de 177 UA contra *B. cereus* 183 (Figura 1) y una mínima inhibitoria de 13 UA a una dilución (1/2 v/v) de la bacteriocina igualmente contra *B. cereus* 183.



Figura 1. Actividad de la bacteriocina de Btt contra *B. cereus* 183 (1), control de Morricina 269 (2).

Determinación preliminar de peso molecular y actividad directa en gel

La separación en gel de Acrilamida-Bisacrilamida Tris-Tricina tuvo un patrón de bandedo con un peso aproximado de 3.5 a 6.5 kDa que coinciden a la región del gel que posteriormente muestra actividad inhibitoria contra *B. cereus* 183, *K. pneumoniae* y *M. luteus* (Figura 2).

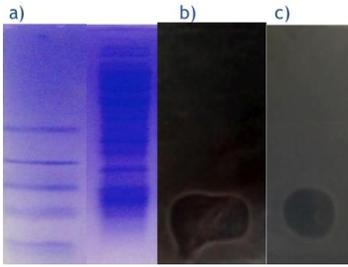


Figura 2. a) Gel de separación, teñido con azul de coomassie; b) Inhibición de *B. cereus* 183 por sobrecapa en gel; c) Inhibición de *K. pneumoniae* por sobrecapa en gel.

Caracterización de la bacteriocina

La caracterización de las proteínas confirmó que la inhibición estaba dada por una proteína, ya que posterior a los tratamientos dados con diferentes enzimas y solventes, particularmente a la Proteínasa-K no hubo actividad inhibitoria sobre el *B. cereus*. Los rangos óptimos de pH y temperatura fueron: 5.5-7.5 pH y 40-60°C con 441 UA y 522 UA en cada rango respectivamente (Figura 3.).

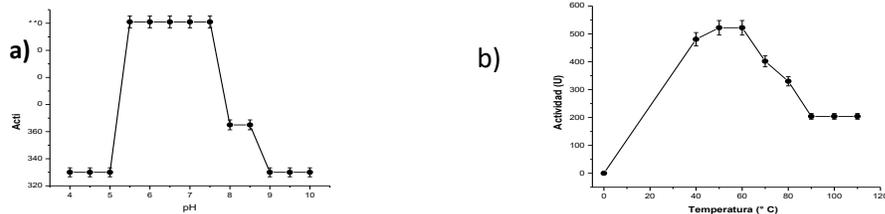


Figura 3.a) Gráfica de actividad a diferentes valores de pH; b) Gráfica de actividad de bacteriocina a diferentes temperaturas.

DISCUSIÓN

La caracterización de un nuevo producto de origen proteico que tenga la capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos causantes de enfermedades y/o deterioro de alimentos, representa la posibilidad de contar con una nueva alternativa de utilidad en el sector biotecnológico de la industria de los alimentos o la salud (Matthewes, 2004). Por lo anterior, el trabajo realizado resulta importante para determinar correctamente el rango de actividad y las condiciones óptimas para el desempeño de su función, de tal manera que los resultados preliminares obtenidos sugieren que se identificó una bacteriocina de *B. thuringiensis* subsp *tenebrionis* con

posibilidad de ser estudiada para conocer su modo de acción y posteriormente determinar su utilidad en el control de microorganismos patógenos indeseables.

BIBLIOGRAFÍA

- Barboza-Corona JE, Vázquez-Acosta H, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R. 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*. 187: 117–126.
- Balciunas EM. Castillo FA. Todorov SD. Gombossy de Melo BD. Converti A. Souza RP. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*. 32:134-142.
- De la Fuente N., Alanís MG. Bideshi DK. Salcedo RS. Bautista M. Barboza JE. 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*. 190:633-640.
- Cleveland J. Montville TJ. Nes IF. Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 1-20.
- Cotter PD. Hill C. Ross R P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3(10): 777-788.
- Matthewes KR. 2004. Here, there, everywhere: antibiotic-resistant foodborne pathogens. *Food Technology*. 58:104.
- Martinez JA. de la Fuente NM. Salcedo R. Bideshi D. Barboza JE. 2011. Effects of physical culture parameters on bacteriocin production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* after cellular induction. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35:ISSN1367-5435.
- Sablon E. Contreras B. Vandamme E. 2000. Antimicrobial Peptides of Lactic Acid Bacteria: Mode of Action, Genetics and Biosynthesis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 68: 21-60.
- Schagger H., von Jagow G. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166:368-379.