

ANÁLISIS PRELIMINAR DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS DE BACTERIOCINAS DE CEPAS MEXICANAS DE *Bacillus thuringiensis*

Díaz León, M.A.; De la Fuente Salcido, N.M.*

Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas. Carretera Torreón - Matamoros Km. 7.5, C.P. 27104.Torreón, Coahuila, México.* normapbr322@hotmail.com.

RESUMEN

La multi-resistencia a antibióticos generada por patógenos es un problema emergente que remarca la necesidad de contar con tratamientos efectivos sin comprometer la salud del consumidor. Basado en esto, se evaluó la actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis*. Ésta se determinó por el método de difusión en pozos, usando volúmenes de bacteriocinas con diluciones desde $\frac{1}{2}$ hasta $1/1024$ y su efecto se calculó en base al Área de inhibición ($1 \text{ mm}^2=1 \text{ AU}$) contra bacterias patógenas. Las actividades más altas de la Morricina contra *Micrococcus luteus* y *Streptococcus pyogenes* fueron de 178 AU y 128 AU respectivamente. La Kurstacina mostró actividades de 63 AU y 139 AU contra *Bacillus cereus* 183 y *Escherichia coli*, respectivamente. Además, la Kenyacina mostró actividades de 55 AU contra *Salmonella spp.* mientras que el efecto inhibitorio de la Entomocina fue de 13 AU para *Streptococcus agalactiae*. Finalmente, la Tolworthcina mostró actividades de 63 AU, 191 AU, 63 AU y 104 AU contra *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus uberis*, respectivamente. Estos datos preliminares se usarán para el diseño de sistemas binarios de bacteriocinas en concentraciones mínimas inhibitorias para determinar si existe un efecto sinérgico contra las bacterias patógenas.

ABSTRACT

Multi-drug resistance generated by pathogens is an emerging issue that highlights the aim for new and effective systems able to deal with such problem without compromising consumer's health. On this basis, antimicrobial activity of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* was evaluated. Activity was determined using the well-diffusion method. To this end, volumes of bacteriocins with dilutions from $\frac{1}{2}$ to $1/1024$ were tested against pathogens and their effect was calculated based on the area of inhibition, where 1 mm^2 was equivalent to 1 arbitrary unit (AU). The highest activities of the Morricin against *Micrococcus luteus* and *Streptococcus pyogenes* were of 178 AU and 128 AU, respectively. Kurstacin showed activities of 63 AU and 139 AU against *Bacillus cereus* 183 and *Escherichia coli*, respectively. In addition, Kenyacin showed an activity of 55 AU against *Salmonella spp.*, whereas Entomocin's effect was of 13 AU to *Streptococcus agalactiae*. Finally, Tolworthcin showed activities of 63 AU, 191 AU, 63 AU and 104 AU against *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus uberis*, respectively. This preliminary data will be used to design bacteriocin's binary systems on minimum inhibitory concentration to if there is a synergistic effect against pathogens.

PALABRAS CLAVE: cmi, bacteriocinas, resistencia.

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la prevalencia de infecciones o Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) muestra cada vez una tendencia a la alza, lo que pone de relieve la necesidad de buscar nuevas alternativas que mantengan la calidad

microbiológica de los alimentos (Newell, 2010) debido a la resistencia o multi-resistencia que han adquirido los agentes causales de ETA's y la virulencia con que se presentan, y que el uso de los antibióticos en el tratamiento de infecciones se ha visto seriamente comprometido por su uso masivo por poner en riesgo la salud pública (Kennedy, 2013).

Las tendencias en los hábitos de los consumidores van hacia alternativas más saludables y que les representen algún beneficio a su salud, lo cual debe considerarse al diseñar estrategias efectivas para controlar, reducir o eliminar patógenos que pongan en riesgo la salud humana y animal (Guinane *et al.*, 2005), así como los cambios en la susceptibilidad de la población humana debido a la disminución de la inmunidad adquirida. Esto aunado a que, para verdaderamente atender el problema de resistencia se deberán reconfigurar muchos esquemas de empleo de agentes antimicrobianos de formas más innovativas (Tarpley, 2014).

Una alternativa a esta problemática la representan las bacteriocinas de fuentes como el *Bacillus thuringiensis* las cuales han demostrado su potencial en la bioconservación de alimentos (Barboza-Corona *et al.*, 2007; De la Fuente Salcido, 2009) y que por su naturaleza protéica son fácilmente inactivadas por las proteasas intestinales, lo que las hace idóneas para el consumidor y de esta forma, cubren el requisito fundamental de un producto natural (Ananou *et al.*, 2007; Cotter *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007). El objetivo de este trabajo fue determinar preliminarmente las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* para su uso posterior en experimentos con mezclas binarias de bacteriocinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción y purificación parcial de bacteriocinas

Para producir las bacteriocinas se utilizó el *Bacillus thuringiensis* subsp. Morrisoni 269, Kurstaki 287, Kenyae 404, Entomocidus 420 y Tolworthi 524 para obtener la Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina, respectivamente. Las cepas se inocularon en caldo soya tripticasa (CST) a pH 6.8 por 12 hr a 28°C y una agitación constante de 180 rpm hasta obtener una OD₆₀₀ de 1.5~2 o una concentración celular de ~10⁸-10⁹ cel/mL. Posteriormente se inoculó CST a una concentración de 0.1% (v/v) y se incubó a las condiciones antes descritas de agitación y temperatura por 24 hr.

El cultivo se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 15 min. El sobrenadante se concentró con (NH₄)₂SO₄ al 80% de saturación y se refrigeró a 4°C con agitación constante por 12 hr. Después se centrifugó bajo las mismas condiciones y las proteínas resultantes se resuspendieron en buffer de fosfatos (BP) 100 mM (pH 6.8) y se dializó en un kit de mini diálisis con una membrana de corte de 1 KDa (Amersham Biosciences) bajo las mismas condiciones de refrigeración contra el mismo buffer. Finalmente las bacteriocinas se almacenaron a -20°C.

Prueba de actividad

La actividad antimicrobiana se midió utilizando un cultivo fresco de la cepa indicadora *B. cereus* 183 (1×10^9 cel/mL CST, 28°C, 180 rpm) a una concentración del 0.7 % (v/v) con agar de pozos fundido y templado (0.012% agar bacteriológico, 0.15% CST). Una vez solidificadas se les realizaron 6 orificios de 8 mm de diámetro, a las cuales se añadió un volumen de 100 μ L de cada bacteriocina y el control. Las cajas se incubaron a 37°C por ~ 2 horas y posteriormente a 4°C por 12 hr. Finalmente se incubaron a 28 °C por 24 hr. La prueba se realizó por duplicado.

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó de acuerdo a la fórmula $A = \pi r^2 = \pi (D/2)^2 = \pi D^2/4$ de acuerdo al diámetro del halo de inhibición. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA), 1 UA= 1 mm² del halo de inhibición (Barboza-Corona et al., 2007).

Determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias

Cada bacteriocina se diluyó a doble concentración con volúmenes iguales de BP 100 mM pH 6.8 estéril para alcanzar diluciones desde $\frac{1}{2}$ (1:1, v/v) hasta 1/1024. Las diluciones se probaron contra cultivos frescos de distintos patógenos (Tabla 1) los cuales se prepararon de la misma forma que la cepa indicadora y a cuyas placas se realizaron 11 orificios con un diámetro de 8 mm para cada una de las diluciones y su respectivo control (Figura 1).



Figura 1. a) Representación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la cepa *B. cereus* 183 por Entomocina en la dilución $\frac{1}{2}$ a 1/32. b) Representación de la CMI de la cepa *Str. pyogenes* por Morricina en la dilución $\frac{1}{2}$ a 1/8.

Tabla I. Patógenos utilizados en la determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias.

Gram positivas		Gram negativas
<i>Bacillus cereus</i> 183	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Salmonella spp.</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>		

Prueba de tablero

Se procesaron las bacteriocinas con *B. cereus* 183 a las condiciones antes descritas. Se utilizó una distribución de 5x5 pocillos, con Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina como sustancias 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. En ambos casos, sustancias A y B se utilizaron las mismas bacteriocinas. Se colocaron volúmenes A/B de 25 μ L de A + 75 μ L de B para la

primer prueba (1/3); 50 μ L B + 50 μ L B para la segunda (2/2) y 75 μ L A + 25 μ L B para la tercera (3/1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Prueba de actividad.

Las bacteriocinas parcialmente purificadas que se produjeron mostraron actividades de 308 ± 38.08 UA para la bacteriocina control; 378 ± 41.71 UA para la Morricina; 428 ± 45.34 UA para la Kurstacina; $204 \pm 3.48 \times 10^{-14}$ UA para la Kenyacina; 51 ± 19.95 UA para la Entomocina y 168 ± 30.83 UA para la Tolworthcina.

Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias

La mayor dilución a la cual se detectó inhibición fue de 1/32, ya que por debajo de este valor no se detectaron actividades antimicrobianas en las cepas probadas (Tabla 2).

Tabla II. Concentraciones Mínimas Inhibitorias de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* contra diversos patógenos.

	Morricina		Kurstacina		Kenyacina		Entomocina		Tolworthcina	
	D	UA	D	UA	D	UA	D	UA	D	UA
Gram positivas										
<i>B. cereus</i> 183	1/8	45	1/8	63	1/16	28	1/2	21	1/16	13
<i>M. luteus</i>	1/8	178	1/8	164	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	1/16	93	1/16	104	1/32	104	0	0	1/16	191
<i>E. faecalis</i>	0	0	1/2	28	1/8	82	0	0	1/8	63
<i>Str. uberis</i>	0	0	1/2	13	1/32	28	1/8	13	1/32	104
<i>Str. agalactiae</i>	0	0	1/32	13	1/32	13	1/4	13	1/32	13
<i>Str. pyogenes</i>	1/8	128	1/16	115	1/16	54	1/4	28	1/16	84
Gram negativas										
<i>E. coli</i>	1/8	28	1/8	139	1/8	82	0	0	1/2	63
<i>K. pneumoniae</i>	1/4	13	1/8	13	1/8	45	0	0	1/16	63
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	1/2	28	1/32	55	1/4	13	1/32	28

D= Dilución; UA= Unidades Arbitrarias

Pruebas de tablero

Los resultados de estas pruebas sugieren que las mayores inhibiciones se encontrarían en mezclas con Morricina y Kurstacina (Tabla 3), ya que en las 3

pruebas, independientemente de la concentración, las mezclas que incluyeron estas bacteriocinas presentaron las mayores inhibiciones (Figura 2).

Tabla III. Inhibición de las pruebas de tablero en Unidades Arbitrarias

1/3	A					2/2	A					3/1	A											
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5							
1	4	4	3	2	2	1	4	3	2	2	2	1	4	4	3	3	3							
	0	0	3	3	0		0	3	6	6	6		0	0	0	3	3	3						
	2	2	0	3	4			2	0	4	4			4	2	2	2	0	0	0				
	2	4	4	2	2				2	2	3			4		2	2	2	2	4	4	3	2	3
	0	0	0	0	0				3		0			6		6	6	0		0	0	3	6	3
2	2	4	4	4	0	2					4	4		4		2	2			2	0	4	0	
3	4	3	2	2		1	3				2	2	2	2			1			3	1	1	1	2
0	3	0	3	7		6		6			6	0	0	7	7		7				7	7	0	7
2	0	4	3	7				4		4	4	4	4	7			7		7		7	7	4	7
4	4	3	2	2					1	4	2	2	2	2				1	4		1	1	2	2
0	3	3	0	7	6				0		0	0	0	7		7		7			7	0	0	7
2	0	3	4	7			4		4		4	4	4	7				7		7	7	4	4	7
5	4	3	2	2		1			5		2	2	1	1	1					5	1	1	1	1
0	3	0	3	7		6		6			6	7	7	2	7		7				5	2	5	2
2	0	4	3	7				4		4	4	7	7	6			7		7		1	6	1	6

Prueba 1/3: 25 µL A + 75 µL B; Prueba 2/2: 50 µL B + 50 µL B; Prueba 3/1: 75 µL A + 25 µL B.

1) Morricina; 2) Kurstacina; 3) Kenyacina; 4) Entomocina; 5) Tolworthcina.



Figura 2. Pruebas de tablero con *B. cereus* 183 a volúmenes A/B de: a) 25 µL A + 75 µL B; b) 50 µL B + 50 µL B; c) 75 µL A + 25 µL B. Distribución por caja, columnas (izq. a dcha., sustancia A): Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina. Filas de arriba a abajo (sustancia B): Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina, respectivamente.

Por otra parte, es necesario continuar evaluando tanto la actividad de las bacteriocinas con una batería más amplia de microorganismos, a fin de contar con un número más representativo de microorganismos al momento de realizar pruebas de CMI's.

BIBLIOGRAFÍA

Ananou S, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Valdivia E. 2007. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.) Formatex.

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.

Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews, Microbiology*. 3 (10):777-788.

De la Fuente Salcido NM. 2009. Biosíntesis y actividad de bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* con potencial aplicación como bioconservadores en alimentos. (Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Nuevo León). Recuperado de <http://eprints.uanl.mx/2502/>

Gálvez A, Abriouel H, López RL, Ben Omar N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 120(1-2): 51-70. Epub 2007 Jun 12.

Guinane CM, Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1316-1325.

Kennedy D. 2013. Time to Deal with Antibiotics. *Science*. 342 (6160): 777.

DOI: 10.1126/science.1248056

Newell DG, Koopmans M, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F, Van der Glessen J, Kruse H. 2010. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*. 139 S3-S5.

Tarpley, RJ. 2014. Antibiotics: Discontinue Low-Dose Use. *Science*. 343(6167): p136.

DOI: 10.1126/science.343.6167.136-b