

## PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIOCINA TOLWORTHCINA 524 DE *Bacillus thuringiensis*

Pacheco Cano, R.D.<sup>a</sup>, De la Fuente-Salcido, N.M.,<sup>a,b</sup> Salcedo-Hernández, R.,<sup>a</sup> Barboza Corona, J.E.<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup> Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca División Ciencias de la Vida, Dpto. de Ingeniería en Alimentos. Irapuato, Guanajuato, México, 36500.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma de Coahuila, Esc. Ciencias Biológicas. Blvd. Torreón –Matamoros Km.7.5 Cd. Universitaria Campus Torreón. Torreón, Coahuila, México. C.P. 27104 rd.pacheco.cano@gmail.com\* , Josebar@ugto.mx\*\*

### RESUMEN:

Las bacteriocinas sintetizadas por entomopatógenos *Bacillus thuringiensis* están ganando atención debido a sus efectos inhibidores contra una amplia variedad de bacterias patógenas. En el presente estudio, se purifica y se caracteriza Tolworthcina 524, una bacteriocina sintetizada por *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*, y se comparó con otras bacteriocinas sintetizadas por *B. thuringiensis*. La bacteriocina Tolworthcina 524 se separó y se purificó a partir del secretoma de *B. thuringiensis* por cromatografía líquida rápida de proteínas con una columna de filtración en gel para obtener rendimientos de 17 % y una actividad específica de ~3600 U/ mg de proteína. El producto purificado mostró dos péptidos de ~ 9 y 6 kDa con actividad antimicrobiana en un ensayo de gel de actividad. El producto purificado se analizó por electroforesis bidimensional y los péptidos de ~ 9 y 6 kDa con puntos isoeléctricos de ~ 8 fueron secuenciados. Se obtuvieron secuencias parciales ( METPVVQPR y DWTCWSCLVCAACS ) lo que sugiere que ~ 9 y 6 kDa corresponden a la prebacteriocina y al péptido maduro Tolworthcina 524, respectivamente. Las secuencias mostraron alta identidad con Thurincina H y Thuricina 17 y tenía un motivo conservado con otras bacteriocinas de *B. thuringiensis*. Con base en datos de la secuencia, Tolworthcina 524 se clasifica en la subclase II.2 (péptidos similares a Thuricina) de bacteriocinas de *Bacillus* en el esquema de clasificación. El péptido más grande no alberga una secuencia sugerente de un péptido señal tampoco que contiene el motivo conservado de doble glicina (GG) característico de un péptido señal de secreción reconocido por el sistema de transporte ABC.

### ABSTRACT:

Bacteriocins synthesized by entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* are gaining attention owing to their inhibitory effects against a wide variety of pathogenic bacteria. In the present study, we purified and characterized Tolworthcin 524, a bacteriocin synthesized by *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*, and compared it with other bacteriocins synthesized by *B. thuringiensis*. Tolworthcin 524 was separated and purified from the secretome of *B. thuringiensis* by fast protein liquid chromatography with a gel filtration column to obtain yields of 17% and a specific activity of ~3600 U/mg protein. The purified product showed two peptides of ~9 and 6 kDa with antimicrobial activity in a gel-screening assay. The purified product was analyzed by two-dimensional electrophoresis and the resolved peptides of ~9 and 6 kDa with isoelectric points of ~8 were sequenced. Partial sequences (METPVVQPR and DWTCWSCLVCAACS) were obtained suggesting that the ~9 and 6 kDa correspond to the prebacteriocin and mature Tolworthcin 524, respectively. Sequences showed high identity with Thurincin H and Thuricin 17 and had a conserved motif with other bacteriocins of *B. thuringiensis*. Based on sequence data, Tolworthcin 524 was classified in subclass II.2 (Thuricin-like peptides) of the *Bacillus* bacteriocin classification scheme. The larger peptide did not harbor a sequence suggestive of a signal peptide neither did it contain the double-glycine (GG) motif characteristic of the secretion leader recognized by the ABC transport system.

### Palabras clave:

*Bacillus thuringiensis*, bacteriocina, péptido tolworthcina 524

### Keyword:

*Bacillus thuringiensis*, Bacteriocin, peptide Tolworthcin 524

**Área:** Microbiología y biotecnología.

## INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por bacterias, las cuales son sintetizadas a nivel ribosómico y pueden o no sufrir modificaciones postraduccionales. Las bacteriocinas tienen efecto antagónico contra microorganismos con o sin relación filogenética. En los últimos diez años éste grupo de proteínas ha generado un gran interés en particular por su uso como bioconservadores en alimentos. 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 es la única aplicada a nivel comercial, se ha utilizado como bioconservador de alimentos en más de 50 países con una efectividad comprobada y además, es considerada como producto seguro con nivel GRAS (“*Generally Recognized As Safe*”) (Barboza-Corona *et al.*, 2009). El conocimiento básico y descubrimiento de nuevas bacteriocinas con potencial uso como bioconservadores naturales en alimentos es importante desde un punto de vista social debido a que la población está buscando cada día alimentos con menos aditivos químicos, más naturales. Como consecuencia, desde un punto de vista económico, se podría asegurar la existencia de una población cautiva, ansiosa de consumir productos naturales, lo que podría aumentar la venta de éste tipo de alimentos. Recientemente se ha demostrado que esta bacteria sintetiza proteínas (bacteriocinas) con efecto inhibitorio contra bacterias patógenas para el hombre (De la Fuente-Salcido y Barboza-Corona, 2006). De manera particular en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología Molecular del Departamento de Alimentos, División Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca se llevan varios años estudiando bacteriocinas (Morricina 269, Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524) producidas por cepas mexicanas de *B. thuringiensis* (Barboza-Corona *et al.*, 2007). Estas tienen actividad contra bacterias patógenas como *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. xylosum*, *Streptococcus pneumoniae*, *Str. pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp* y *Enterobacter cloacae*, entre otras (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008; Barboza-Corona *et al.*, 2009, Castañeda-Ramírez *et al.*, 2011).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Las cepa productora de bacteriocina utilizada fue *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi* (LBIT 524). Como bacteria indicadora se utilizó *B. cereus* 183. Las bacterias patógenas de importancia en alimentos o en la salud pública que se emplearon para evaluar la actividad de la bacteriocina fueron *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus xylosum* ATCC 700404, *Staphylococcus aureus ssp aureus* ATCC 25923, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Listeria innocua*, *B. cereus* 183, *Salmonella sp*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes*, *K. pneumoniae*.

### Producción y purificación de la bacteriocina

La cepa de *B. thuringiensis* se cultivó en caldo de soya tripticaseína (CST) a 28°C a 180 rpm por 15 horas. El cultivo se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C por 15 minutos, el sobrenadante se precipitó toda la noche a 4°C con sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 80% de saturación, se centrifugó en las condiciones antes mencionadas y se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Finalmente la muestra se dializó frente al mismo amortiguador toda la noche a 4°C utilizando el kit para mini diálisis con una membrana de 1 kDa (Amersham Biosciences).

Brevemente se cargo 4ml de bacteriocina a una columna de 2.5x30cm empacada con poliacrilamida Bio-Gel®P-60, previamente equilibrada con 10 mM Tris-Hcl (pH 7.5) y la bacteriocina se separo por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) ( Biologic Duo - Flow Pathfinder 20 Sistema BioRad, Hercules CA , EE.UU) . Las fracciones se recogieron a una velocidad de 1ml/min, y se controlaron a 280 nm. Las fracciones se concentraron hasta 200 µL con un concentrador Speed Vac (Thermo Scientific) y luego 10 µL de cada fracción se sometio a ensayos para confirmar actividad antibacterial por el metodo de gota sobre cesped utilizando *B. Cereus 183* como bacteria indicadora (Barboza –Corona et al. 2007).

#### **Determinación de la actividad directa en gel**

Posteriormente fue determinada la actividad inhibitoria de la bacteriocina Tolworthcina con un gel de Tris-Tricina SDS- PAGE, solo que aquí solamente se adicionó desde el principio una solución (20% isopropanol; 10% ácido acético) durante 30 minutos en agitación para fijar las proteínas y posteriormente se realizaron 6 lavados de 10 minutos cada uno con H<sub>2</sub>O destilada estéril en agitación constante. Una vez terminados los lavados se le adicionó (amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 6.8) previamente tibio por un periodo de 10 minutos, el gel se colocó en una caja petri y se adicionó una sobrecapa (15 mL Agar de pozos; 115 µL de *Bacillus cereus* 183), se dejó solidificar y se colocó en la incubadora a 28°C toda la noche posteriormente se visualizaron los halos de inhibición y se cotejaron con el gel de masa molecular de Coomassie. La prueba de actividad en gel se realizó también utilizando otras cepas como *K. pneumoniae* y *E. faecalis*.

#### **Evaluación de actividad antibacterial por el método de difusión en pozos**

La actividad de la bacteriocina fue evaluada contra cepas Gram (+) *B. cereus 183*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. xylosus*, *E. faecalis* y Gram (-) *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *E. cloacae*, *S. sonnei*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*. Se preparó agar de pozos (0.75 gr de caldo de soya; 6 gr Agar bacteriológico / 500 mL de agua) y se realizó una mezcla (15 mL de agar de pozos con 115 µL cepas indicadoras) posteriormente se realizaron pozos de 8 mm de diámetro interior, y se colocó 100 µL de bacteriocina tolworthcina 524 en cada pozo, se colocaron toda la noche a -4°C y se colocaron a incubar a 28°C / 37°C respectivamente durante toda la noche y se observó el halo de inhibición.

#### **Efecto de la bacteriocina tolworthcina 524 en el crecimiento de cultivos bacterianos.**

Los microorganismos *K. pneumoniae* y *E. faecalis* fueron seleccionados para estudiar el efecto de la bacteriocina tolworthcina 524 en cultivos bacterianos. Ambos microorganismos se cultivaron durante 12 y 16 h respectivamente, se inoculó 1x10<sup>9</sup> células/mL en 100 mL de caldo nutritivo. Los cultivos de *K. pneumoniae* y *E. faecalis* se incubaron a 37 °C, con agitación constante a 180 rpm en una incubadora de agitación orbital (Shel Lab, Cornelius, OR, USA), al llegar a la mitad de su fase-logarítmica (fase log), se añadió al matraz ~ 3000 UA de bacteriocina. Las Unidades (UA) se determinaron con el método de difusión en pozos utilizando sus respectivas cepas. La densidad óptica (OD 660 nm) se evaluó en los ensayos cada 5, 15, 45, 60,90 y 120 minutos utilizando un espectrofotómetro SmartSpec 3000(Bio-Rad). Adicionalmente, se determinó el número total de unidades formadoras de colonia (UFC mL<sup>-1</sup>) cada 5, 15, 45, 60, 90 y 120 minutos (Bizani *et al.*, 2005) usando diluciones seriadas con solución salina (0.85% p/v) y se sembraron en agar método estándar para recuento en placa durante 24 h a 37 °C. En ambos casos, los dos cultivos fueron crecidos sin la adición de

bacteriocinas y usados como controles. Los resultados se graficaron y analizaron para determinar el modo de acción de cada bacteriocina sobre la cepa sensible, mismo que puede ser bacteriolítica (la muerte celular y lisis con la concomitante disminución de la densidad óptica), bactericida (muerte celular manifestada por disminución de UFC pero sin lisis y la DO se mantiene constante) y bacteriostática (no produce muerte celular solo se detiene el crecimiento, y la DO y ufc se mantienen constantes) (Hyronimus *et al.*, 1998).

### Gel de electroforesis en segunda dimensión (2D)

Para isoelectroenfoque (IEF), se utilizaron tiras de 7 cm IPG de gradiente lineal de pH (3-10) se rehidrataron a temperatura ambiente durante 14 a 16 h con 350 µg de proteína total en una bandeja (tiras Ready tira IPG, BioRad, Hercules, CA, EE.UU.). El análisis se llevó a cabo a 20°C con i12 Protean IEF Cell(BioRad) a una constante de 50 mA por tira bajo las siguientes condiciones: (i) 250 V gradiente rapido, (ii) 4,000 gradual (iii) 4,000 V rápido 15.000 V / h y (vi) 500V sostenido. Después del IEF, las tiras IPG se almacenaron a 20°C ó inmediatamente equilibrado durante 15 min en un amortiguador equilibrado [50 mM Tris-HCl pH 8,8, 6 M urea, 30% (V / V) de glicerol, 2% (W / V) de SDS, 0,002% (W / V) de azul de bromofenol] que contiene 1% (W / V) de DTT y luego durante 15 min con el mismo amortiguador con 2,5% (W / V) de yodoacetamida. Las tiras se transfieren a un gel de poliacrilamida vertical de SDS. La segunda dimensión se analizó en un gel de poliacrilamida al 13% usando un (Mini-Protean Tetra, Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Los geles de 2-D se tiñeron con Sypro Rubí (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.)

## RESULTADOS

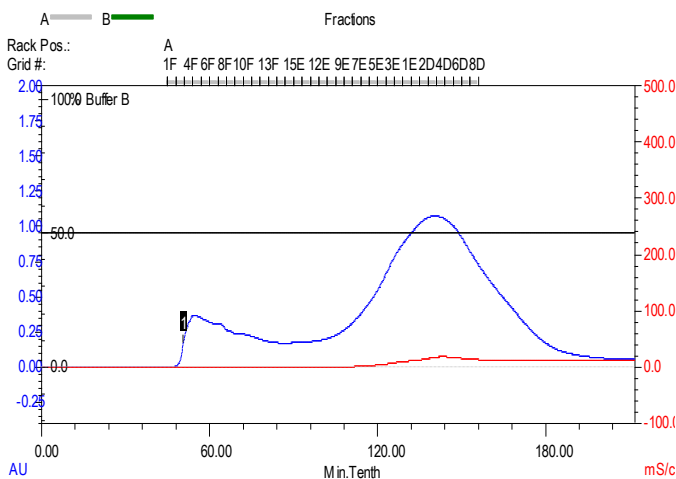


Figura 1. Cromatografía de filtración en gel de la bacteriocina tolworthcina 524

Tabla I. Pasos de purificación de la bacteriocina Tolworthcina 524

PASO	VOLUMEN (mL)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD TOTAL (UA)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (mg-1)	GRADO DE PURIFICACIÓN	RENDIMIENTO (%)
Extracto crudo <sup>a</sup>	500	5500	1650000	300	-	-
precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>b</sup>	5	40	14800	370	1	100
Dializado y concentrado <sup>c</sup>	4	24	10560	440	1.2	71
Cromatografía de Filtración en gel <sup>d</sup>	1	0.7	2550	3643	9.8	17

<sup>a</sup> Una UA se define como 1 mm<sup>2</sup> de la zona de inhibición está determinado por el método de difusión de pozos.

<sup>b</sup> La precipitación de proteínas fue llevada a cabo con Sulfato de amonio al 80% de saturación.

<sup>c</sup> Para quitar exceso de sales se realizó una diálisis con el mismo amortiguador Tris-HCl, 10mM, pH8.

<sup>d</sup> Purificación de la bacteriocina con cromatografía de líquidos rápidos proteicos.

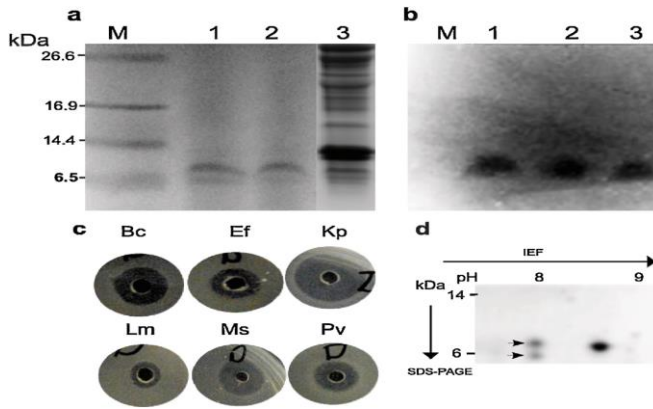


Figura 2. Análisis de tolworthina 524 separada del secretoma de *B. Thuringiensis* subsp. Tolworthi por FPLC. a) SDS-PAGE línea M, marcador de proteína ; línea 1 y 2, muestra purificada de bacteriocina; línea 3, muestra cruda de bacteriocina. (b) Actividad inhibitoria usando sobrecapa en gel. (c) actividad de la bacteriocina usando difusión en pozos contra *Bc*, *Bacillus cereus*; *Ef*, *Enterococcus faecalis*; *Kp*, *Klebsiella pneumoniae*; *Lm*, *Listeria monocytogenes*; *Ms*, *Micrococcus sp*; *Pv*, *Proteus vulgaris*. (d) Análisis en 2D de la bacteriocina purificada. Las flechas indican los puntos de proteínas que se secuenciaron y se mostraron las secuencias parciales METPVVQPR, DWTCWWSLCAACS

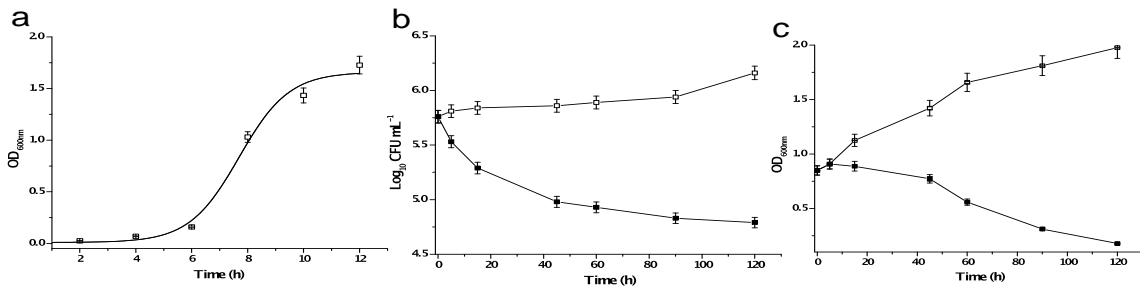


Figura 3. Modo de acción contra *Klebsiella pneumoniae*. (a) Curva de crecimiento de la bacteria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae*. La mitad de la fase logarítmica se encuentra en una DO 0.88 medido a 660nm de acuerdo al ajuste de Boltzmann. Efecto de la bacteriocina producida por *B. thuringiensis* en el crecimiento de *Klebsiella Pneumoniae*. (b)  $\text{Log}_{10} \text{cfu mL}^{-1}$ . (c) Densidad óptica medida a 660 nm. Se añadió la bacteriocina en la mitad de la fase logarítmica de la curva de crecimiento (~7h) de *Klebsiella pneumoniae* (cepa indicadora) utilizando como control *Klebsiella pneumoniae* sin añadir bacteriocina

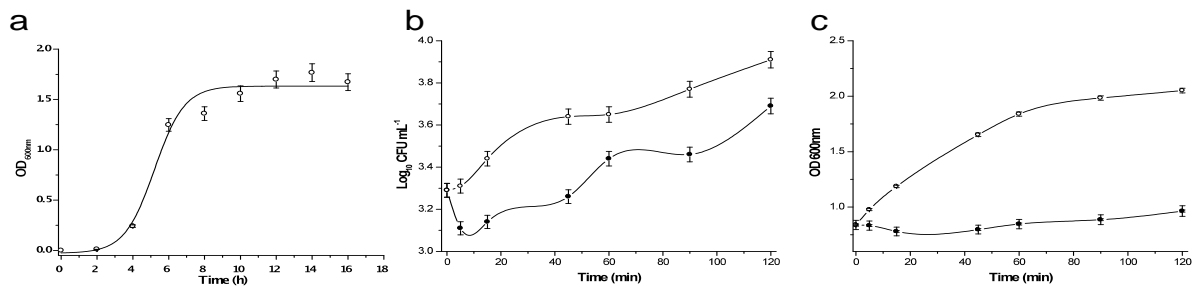


Figura 4. Modo de acción de *E. faecalis*. (a) Curva de crecimiento de *Enterococcus faecalis*. La mitad de la fase logarítmica se encuentra a una DO de 0.83. Efecto de la bacteriocina producida por *B. thuringiensis* subsp. Tolworthi en el crecimiento de *E. faecalis* (b)  $\text{Log}_{10} \text{UFC mL}^{-1}$  (c) Densidad óptica medida a 660 nm. Se añadió la bacteriocina en la mitad de la fase logarítmica de la curva de crecimiento (~5h) de *E. faecalis* (cepa indicadora) utilizando como control (sin bacteriocina) *E. faecalis*

## DISCUSIÓN

En una sociedad donde una de las principales preocupaciones es la salud, la alimentación juega un papel importante. En este sentido, la población está buscando cada día más productos naturales y evitar el uso de conservadores químicos en los alimentos (De la Fuente Salcido y Barboza-Corona 2008). Con el propósito de buscar nuevas alternativas en este trabajo llevamos

a cabo la purificación y caracterización de una bacteriocina sintetizada por una cepa mexicana de *B. thuringiensis*, la Tolworthcina 524 (Barboza-Corona *et al.*, 2007). Los primeros estudios que se realizaron con la Tolworthcina 524 fueron hechos con extractos crudos (proteínas totales concentradas), encontrándose que es un péptido antimicrobiano termorresistente y de medio a amplio espectro de actividad antimicrobiana (Barboza-Corona *et al.*, 2007; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008; De la Fuente-Salcido *et al.* 2012). Sin embargo, es lógico pensar que el efecto pudiera haberse debido no solo a la Tolworthcina 524 sino a otros tipos de moléculas presentes (proteasas, quitinasas, fosfolipasas, proteína Vip, exotoxinas, etc) en el secretoma de la cepa de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*, bacteria productora de la bacteriocina de este trabajo. Con el propósito de tener la bacteriocina separada del resto de las proteínas presentes en secretoma, se llevo a cabo la purificación del péptido antimicrobiano. Cuando la Tolworthcina 524 fue expuesta a diferentes temperaturas no perdió su actividad por lo tanto es considerada como termorresistente ya que mantiene su efecto inhibitorio a temperaturas de hasta 120°C. Asimismo, la bacteriocina fue muy estable al someterse a tratamiento con la luz UV ya que al ser expuesta de manera directa no se afecta su actividad. Resultados similares han sido observados con otras bacteriocinas que también son termoresistentes como la Bac14B de *Bacillus subtilis* (Hammami Ines *et al.* 2012), Entomocina 110, (Cherif *et al.*, 2008), Thuricina S (Chehimi *et al.*, 2007), Thuricina 17 (Gray *et al.*, 2006) y Kenyacina 404 y Entomocina 420 (Barboza-Corona *et al.*, 2007). La estabilidad que tiene la Tolworthcina 524 a altas temperaturas es una característica muy interesante ya que podría constituir una ventaja en vista de su uso potencial como un aditivo alimentario, en procesos como pasteurización, procesos de fermentación o secado.

### CONCLUSIONES

Se logro purificar y caracterizar la Tolworthcina 524, la purificación se obtuvo mediante filtración en gel, lográndose un grado de purificación de 9.8 con un rendimiento del 17%. El producto de purificación mostró una o dos proteínas con masas moleculares de entre 6 y 10 kDa. Se demostró que la Tolworthicina 524 tiene efecto inhibitorio contra bacterias patógenas de importancia en alimentos y de salud pública. La bacteriocina presentó un efecto bacteriolítico y bacteriolítico/bacteriostático contra *Klebsiella pneumoniae* (bacteria Gram negativa) y *Enterococcus faecalis* (bacteria Gram positiva), respectivamente. La actividad inhibitoria de la bacteriocina no se vio afectada por temperaturas elevadas de hasta 120°C ni por la luz UV. El N-terminal de la Tolworthcina 524 no cumple los requisitos para ser considerado un péptido señal, por lo que pudiera ser posible que la proteína se traslocara por un sistema de secreción no convencional.

### BIBLIOGRAFÍA

- Barboza-Corona JE, Vázquez-Acosta H, Bideshi D, Salcedo-Hernández R .2007. Bacteriocin Like inhibitor substances production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Arch Microbiol 187:117-126
- Barboza-Corona, J.E., De la Fuente-Salcido, N., Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez Meza, J., 2009. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. Veterinary Microbiology. 138:179-183
- De la Fuente-Salcido NM, Casados-Vázquez LE, Barboza-Corona JE. 2013. Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. Can J Microbiol. 59(8): 515 522