

EFFECTO SINÉRGICO DE SISTEMAS BINARIOS DE BACTERIOCINAS DE *Bacillus thuringiensis*-NISINA CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS

M.A. Díaz-León^a, E. Gutiérrez-Reyes^a, C.M. Valencia-Castro^a, J.E. Barboza-Corona^b, R. Salcedo-Hernández^b, N.M. De la Fuente-Salcido^{a*}.

^a Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila. ^b Departamento de Alimentos
División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca.
*normapbr322@hotmail.com

RESUMEN:

Mundialmente, la resistencia bacteriana contra antibióticos ha impulsado la búsqueda de estrategias que la reduzcan o eliminen. Los péptidos antimicrobianos tipo bacteriocina han demostrado ser una alternativa eficiente contra microorganismos por su heterogeneidad y amplio espectro. La Nisina, bacteriocina más exitosa y estudiada a nivel mundial combinada con las bacteriocinas Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina, sintetizadas por cepas mexicanas de *B. thuringiensis* (Bt), pudieran ser una opción contra la resistencia antibacteriana. Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de la Nisina y bacteriocinas de Bt contra microorganismos mediante dobles diluciones y se analizaron estadísticamente los resultados. Se usó la técnica de microdilución en placa con arreglo de tablero de ajedrez para evaluar los sistemas binarios (bacteriocinas Bt-Nisina) y su efecto a diferentes dosis/CMI y tiempos de aplicación contra patógenos, el cual se analizó con el software CompuSyn 1.0. Los datos de las CMI de las bacteriocinas de Bt mostraron resultados diversos, determinándose los mayores efectos inhibitorios con Morricina y Kurstacina, seguidos de Kenyacina y Tolworthcina. Los sistemas binarios demostraron efecto sinérgico en la mayoría de las combinaciones y tiempos con casos de antagonismo en algunas cepas.

ABSTRACT:

Worldwide, bacterial resistance against antibiotics has aimed the search for strategies that either reduce or remove it. Bacteriocin-like antimicrobial peptides have demonstrated being an efficient alternative against microorganisms due to their heterogeneity and wide spectrum. Nisin, the most successful and worldwide studied combined with the bacteriocins Morricin, Kurstacin, Kenyacin, Entomocin and Tolworthcin, synthesized by Mexican strains of *B. thuringiensis* (Bt), might be an option against bacterial resistance. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of Nisin and Bt-bacteriocins were determined against microorganisms with double dilutions and results were statistically analyzed. Microdilution plate technique with checkerboard arrangement was used to evaluate binary systems (Bt bacteriocins-Nisin) and their effect at different dose/MIC and application times against pathogens, which was analyzed with CompuSyn 1.0 software. Bt bacteriocin's MIC data shown diverse results, determining the topmost effects for Morricin and Kurstacin, followed by Kenyacin and Tolworthcin. Binary systems demonstrated synergism at most of combinations and times with antagonism cases at some strains.

Palabras clave: Bacteriocinas, sinergismo, resistencia.

Keywords: Bacteriocins, synergism, resistance.

Área: Microbiología y biotecnología.

INTRODUCCIÓN

La resistencia o multiresistencia desarrollada y adquirida por microorganismos patógenos ha generado una intensa búsqueda de estrategias que permitan combatir los procesos por los cuales los patógenos evaden la acción de los agentes antibióticos o biocidas. Muchas estrategias emplean metabolitos de extractos o agentes bioactivos de plantas, además de compuestos microbianos como ácidos orgánicos o metabolitos secretados o sustancias que inhiban los mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos o antibióticos tradicionales (Díaz-León, 2015).

Los péptidos antimicrobianos de origen bacteriano generan un enorme interés por su diversidad y espectro de aplicaciones confirmadas y potenciales. Uno de los casos más conocidos lo representa la Nisina, bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* y comercializada en más de 50 países a nivel mundial. Y uno de los casos promisorios son las bacteriocinas sintetizadas por Bt, bacteria entomopatógena por excelencia. El potencial antimicrobiano de estas bacteriocinas recién se estudia, pues solo son 18 reportadas a nivel mundial y 5 provienen de cepas mexicanas (Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina) con un espectro inhibitorio de moderado a amplio (Barboza-Corona *et al.*, 2007).

Con este antecedente, y dada la búsqueda de un efecto mayor de los agentes de control biológico, se decidió estudiar el efecto conjunto de ambas bacteriocinas, además de determinar sus dosis mínimas o Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI). Las CMI se procesaron mediante diversos análisis estadísticos, mientras que los efectos conjuntos de las mezclas binarias se estudiaron con los modelos propuestos por Chou (1981, 2006, 2007) para mezclas de n número de componentes. En las CMI's se encontraron resultados diversos respecto a los valores y los grupos de mayor efecto, mientras que en las mezclas binarias se tuvo sinergismo y antagonismo a distintas combinaciones y tiempos.

Tabla I. Microorganismos empleados para la determinación de actividad mediante difusión en pozos.			
Cepas grampositivas		Cepas gramnegativas	
	T°		T°
<i>B. cereus</i> 183	28±1°C	<i>Salmonella spp.</i>	35±1°C
<i>M. luteus</i>	30±1°C	<i>S. typhi</i>	35±1°C
<i>S. uberis</i>	35±1°C	<i>P. aeruginosass</i>	35±1°C
<i>S. aureus</i>	35±1°C	<i>K. pneumoniae</i>	35±1°C
<i>S. agalactiae</i>	35±1°C	<i>E. coli</i>	35±1°C
<i>S. xylosus</i>	35±1°C	<i>S. marcescens</i> NIMA	35±1°C
<i>E. faecalis</i>	35±1°C	<i>P. vulgaris</i>	35±1°C
<i>S. pyogenes</i>	35±1°C	<i>S. flexneri</i>	35±1°C
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	28±1°C	<i>S. sonnei</i>	35±1°C

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de bacteriocinas.

Se emplearon las cepas *B. thuringiensis* subsp. *Morrisoni*, *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *Kenyae*, *B. thuringiensis* subsp. *Entomocidus* y *B. thuringiensis* subsp. *Tolworthi* con las cuales se obtuvieron las bacteriocinas Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina, respectivamente, de acuerdo a la metodología empleada por Barboza-Corona *et al.*, (2007) para su producción y semi purificación.

Preparación de dobles diluciones y Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI).

De cada bacteriocina previamente obtenida se realizaron dobles diluciones (1:1, v/v) en buffer de fosfatos (BP) 100 mM pH 6.8 estéril con diluciones desde 1/2 hasta 1/1024. Estas diluciones se ensayaron contra microorganismos grampositivos y gramnegativos (Tabla I) mediante la técnica de difusión en pozos. Los resultados de inhibición se expresaron en Unidades Arbitrarias por mililitro (UA/mL) de acuerdo al área inhibida (Barboza-Corona *et al.*, 2007). Los datos se procesaron mediante el software Statgraphics XVI Centurion, realizando análisis de varianza (ANOVA) por cepa y bacteriocina. Adicionalmente se realizó un análisis discriminante para estudiar los efectos por bacteriocina en la totalidad de las cepas.

Actividad de Nisina y Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI).

Se preparó una solución estándar de Nisina comercial (SIGMA) de acuerdo a la metodología descrita por López-De la Cruz (2013). Una vez determinada la viabilidad de la solución se hicieron dobles diluciones (1:1, v/v) en HCl 0.02N estéril con diluciones desde 1/2 hasta 1/1024. Dichas diluciones se probaron contra microorganismos sensibles (Tabla II) mediante difusión en pozos (López-De la Cruz, 2013) y la inhibición se determinó mediante la relación $A = \pi r^2 = \pi (D/2)^2 = \pi D^2/4$ 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).

Tabla II. Microorganismos sensibles a Nisina y temperatura de incubación

		T°
S. aureus		35±1°C
L. monocytogenes Scott A		28±1°C
S. pyogenes		35±1°C
L. innocua	28±1°C	

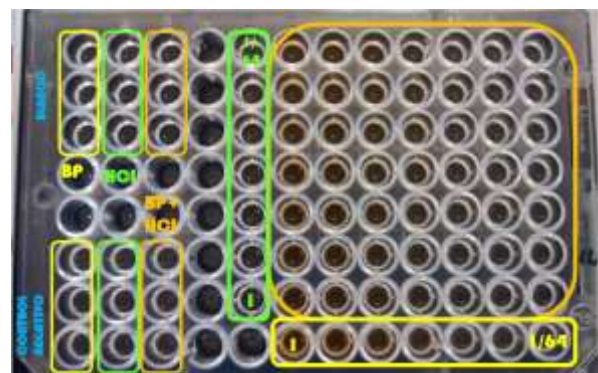


Figura 1 Distribución de microplacas de 96 pozos según diluyente: diluciones de Nisina (verde), diluciones de bacteriocinas de Bt (amarillo), mezclas de bacteriocinas (naranja).

Estudio de sistemas binarios mediante microdilución en placa.

Para conocer el efecto conjunto de los sistemas/mezclas binarias de ambos grupos de bacteriocinas, se mezcló cada serie de diluciones de cada bacteriocina (Morricina,

Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina) conjuntamente con las diluciones de Nisina. Dichas preparaciones se realizaron en microplacas de 96 pozos con cultivos frescos de distintos microorganismos grampositivos y gramnegativos (Tabla III). Para esto, se cultivó cada microorganismo a las condiciones indicadas hasta obtener una OD de 0.3 a 0.5 y posteriormente diluirse en los mismos medios a proporción 1:10 (v/v). En cada pocillo se agregaron 50 µL de cada mezcla de diluciones (25 µL+25 µL), 50 µL de bacteriocina (Bt o Nisina) además de 150 µL del cultivo fresco con sus controles (Figura 1). Se incubaron las placas a la temperatura indicada (Tabla III) y se midió su OD cada 0.5 h a 600 nm en un lector de microplacas WHY-101 (Poweam) desde las 0 a las 4 h. Cada placa se preparó por duplicado. Los datos obtenidos se ajustaron y se procesaron mediante el software CompuSyn 1.0 (Chou, 2007) para determinar el efecto de cada mezcla contra el microorganismo problema.

Tabla III. Microorganismos para pruebas de susceptibilidad, preparación de mezclas binarias de bacteriocinas Bt-Nisina, medios de cultivo y temperatura de incubación. CST, Caldo Soya Tripticasa; CMH, Caldo Müller-Hinton.						
	Gram positivas			Gram negativas		
Nisina		Medio	T°C		Medio	T°
Morricina	<i>B. cereus</i> 183	CST	28±1	<i>P. aeruginosass</i>	CMH	35±1
Kurstacina	<i>S. aureus</i>	CMH	30±1	<i>E. coli</i>	CMH	35±1
<i>Kenyacina</i>	<i>B. cereus</i> 183	CST	28±1	<i>Salmonella spp.</i>	CMH	35±1
<i>Tolworthcina</i>	<i>S. uberis</i>	CST	35±1	<i>K. pneumoniae</i>	CMH	35±1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

CMI de *B. thuringiensis*

Las CMI's de las bacteriocinas de Bt si bien mostraron coincidencias en los valores, no así en la actividad, resultando en una heterogenicidad dentro de ambos grupos de microorganismos (Tabla IV). Adicionalmente, en los ANOVA se encontró una fuerte interacción entre bacteriocina y dilución, así como diferencias significativas en bacteriocina-cepa y bacteriocina-dilución ($p < 0.01$). El análisis discriminante mostró que los mayores efectos en función del porcentaje de variación relativa se dan en la Morricina, Kurstacina, Kenyacina y Tolworthcina, con 53.83%, 20.99%, 14.97% y 10.21%, respectivamente y cuya dispersión en función de la variación se muestra en la Figura 2.

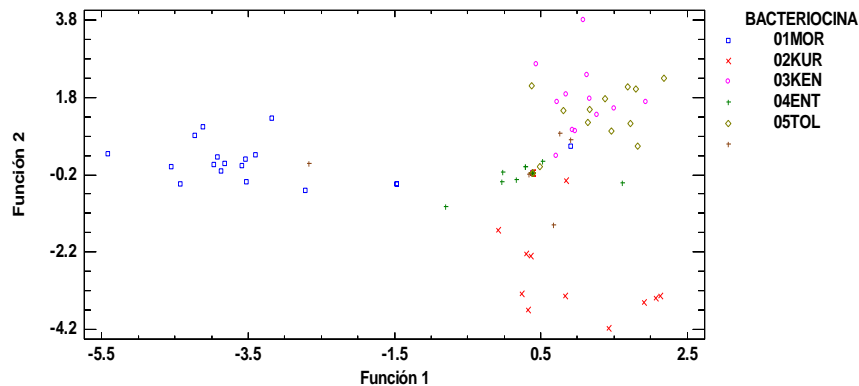
Tabla IV. Concentraciones Mínimas Inhibitorias de bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i>										
	Morricina		Kurstacina		Kenyacina		Entomocina		Tolworthcina	
Gram positivas	CMI	UA/mL	CMI	UA/mL	CMI	UA/mL	CMI	UA/mL	CMI	UA/mL
<i>B. cereus</i> 183	1/8	225	1/8	315	1/16	140	1/2	205	1/16	65
<i>M. luteus</i>	1/8	1775	1/8	1640	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	1/16	930	1/16	1040	1/32	1040	0	0	1/16	1905

Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

<i>E. faecalis</i>	0	0	1/2	280	1/8	820	1	225	1/8	630
<i>S. uberis</i>	0	0	1/2	65	1/32	140	1/8	130	1/32	520
<i>S. agalactiae</i>	0	0	1/32	65	1/32	130	1/4	130	1/32	65
<i>S. pyogenes</i>	1/8	1275	1/16	1150	1/16	540	1/4	140	1/16	835
<i>S. xyloso</i>	1/128	65	1/2	475	0	0	1/2	65	0	0
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	1/256	280	1/2	130	1/2	130	1/2	65	0	0
Gram negativas	CMI	UA/mL	CMI	UA/mL	CMI	UA/mL	CMI	UA/mL	CMI	UA/mL
<i>E. coli</i>	1/8	280	1/8	1385	1/8	820	1	1260	1/2	630
<i>K. pneumoniae</i>	1/4	65	1/8	65	1/8	225	1	130	1/16	630
<i>P. aeruginosass</i>	1/128	225	1/4	290	1/4	130	1/4	130	0	0
<i>P. vulgaris</i>	1/256	225	1/8	130	0	0	1/4	630	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	1/2	280	1/32	550	1/4	130	1/32	280
<i>S. sonnei</i>	1/16	540	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. flexneri</i>	1/128	365	1/2	450	1/2	130	1/4	130	1/2	540
<i>S. typhi</i>	1/64	365	1/4	130	1/2	130	1/2	65	0	0
<i>S. marcescens</i> NIMA	1/256	280	1/2	130	1/4	130	1/2	65	0	0

CMI's de Nisina.

La prueba de ANOVA en Nisina de igual manera demostró una fuerte interacción entre la dilución empleada respecto a la cepa ($p < 0.01$) y el análisis de medias ubicó la CMI en 1/64, a diferencia de las bacteriocinas de Bt.



Morricina; Función 2, Kurstacina. Graficados: 01MOR, Morricina; 02KUR, Kurstacina; 03KEN, Kenyacina; 05TOL, Tolworthcina.

Efecto de sistemas binarios.

De los datos de las mezclas Bt-Nisina, se tomaron los de menor valor en función de cada dilución de Bt (como referencia primaria), y se ingresaron al software. De la información obtenida con este, se obtuvieron los valores de índices de combinación (CI) que dan una medida del efecto sinérgico, indiferente o antagónico ($CI < 1$; $CI = 1$; $CI > 1$, respectivamente) de cada mezcla a los distintos tiempos (Chou, 1981). En base

Díaz-León et al. / Vol. 2 (2017) 181-187

a estos valores, se tomaron los gráficos del índice de combinación contra la fracción afectada (Fa/CI), los cuales muestran las combinaciones con efecto sinérgico por debajo de la línea (CI) y por encima las combinaciones con antagonismo (Figura 3, Figura 4 y Figura 5) y que, igual que muchos de los términos comúnmente empleados para el estudio de mezclas de fármacos, dan una medida de su efecto en pruebas de susceptibilidad (Díaz-León, 2015).

La mezcla Morricina-Nisina (MNC) muestra efecto sinérgico en varias combinaciones hasta las 4 h contra *B. cereus* 183, mientras que en presencia de *P. aeruginosas* solo se aprecia dicho efecto a las 0 h (Figura 3), coincidiendo con el efecto sinérgico que presentan mezclas con Nisina contra distintos microorganismos incluyendo gramnegativos (Naghmouchi *et al.*, 2013).

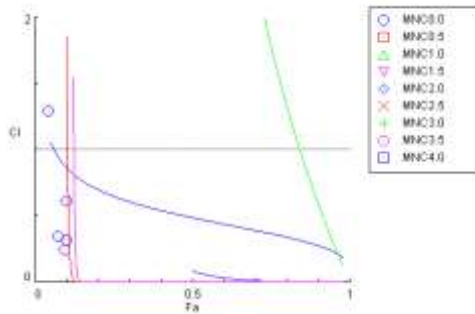


Figura 3. Gráfico Fa/CI de la mezcla Morricina-Nisina en *P. aeruginosas*.

En la mezcla Kurstacina-Nisina (KNC) la mayoría de las combinaciones tuvieron un efecto antagónico, ya que solamente una combinación a las 1.5 h y en 2 combinaciones a las 2 h mostraron efecto sinérgico en *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente.

Para la prueba de Kenyacina-Nisina (KNC) hubo resultados mixtos, ya que si bien hubo efecto sinérgico por distintas mezclas durante el período de lectura en *B. cereus* 183 (Figura 4), en *Salmonella spp.*, hubo un notable efecto antagónico.

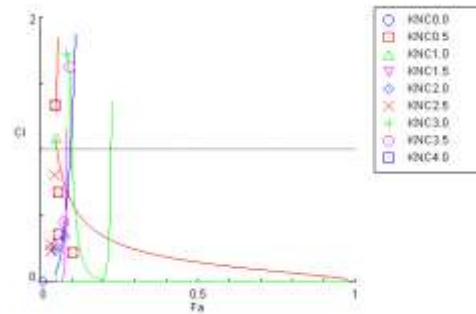


Figura 4. Gráfico Fa/CI de la mezcla Kenyacina-Nisina en *B. cereus* 183.

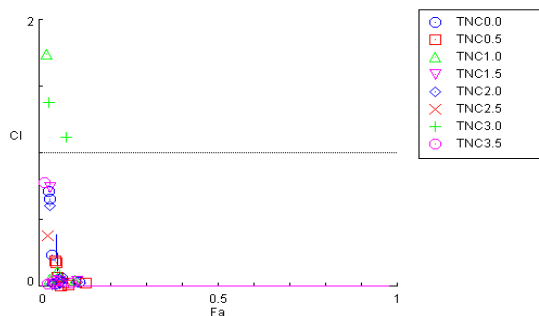


Figura 5. Gráfico Fa/CI de la mezcla Tolworthcina-Nisina en *S. uberis*.

Al procesar los datos de la mezcla Tolworthcina-Nisina (TNC) se pudieron determinar los efectos únicamente hasta las 3.5 h, mostrando un marcado efecto sinérgico contra *S. uberis* salvo 3 combinaciones a las 1 y 3 h, mientras que

en *K. pneumoniae* solamente una combinación a las 1 h mostró sinergismo.

CONCLUSIONES.

Los resultados de difusión en pozos confirman el potencial de Morricina, Kurstacina, Kenyacina, Entomocina y Tolworthcina en el control biológico, resultando las primeras 2 con mayor efecto debido a su variación relativa y por consiguiente su preferencia en estudios posteriores.

En cuanto a los sistemas de bacteriocinas de Bt-Nisina al ser el primer estudio a nivel mundial en reportar sinergismo en mezclas de dichos componentes, se continúan optimizando los tiempos y las condiciones de prueba.

BIBLIOGRAFÍA.

- Barboza-Corona, J.E., Vázquez-Acosta, H., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R. 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*, 187, 117–126.
- Chou, T.C., Talalay, P. 1981. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, 115(1), 207-216.
- Chou, T.C. 2006. Theoretical basis, experimental design and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621-681.
- Chou, T.C. and Martin, N. 2007. CompuSyn software for drug combinations and for general dose-effect analysis, and user's guide. ComboSyn, Inc. Paramus, NJ. [www.combosyn.com]
- Díaz-León, M.A. 2015. Evaluación in vitro del efecto de sistemas binarios de bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* y *Lactococcus lactis* para el control de patógenos. Tesis (MSc). Universidad Autónoma de Coahuila.
- López De la Cruz, D. 2013. Estandarización de un método fluorogénico para la determinación de actividad de bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* contra diversas bacterias de interés alimenticio. Tesis (BSc). Universidad Autónoma de Coahuila.
- Naghmouchi, K., Baah, J., Hober, D., Jouy, E., Rubrecht, C., Sané, F., Drider, D. 2013. Synergistic effect between Colistin and Bacteriocins in Controlling Gram-Negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2719-2725.