

Precipitación salina, purificación y espectro de actividad de bacteriocinas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas del cañón de Fernández Durango, México.

D. López-de-la-Cruz¹, J.E. Barboza-Corona², N.M. De la Fuente-Salcido¹

¹ Universidad Autónoma de Coahuila, Departamento de Bioprocesos y Bioprospección, Programa de posgrado en Ingeniería Bioquímica. Torreón, Coah., México, 27440; ² Universidad de Guanajuato, Departamento de Alimentos, Posgrado en Biociencias. Irapuato, Gto., México normapbr322@hotmail.com

RESUMEN:

Las bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) han demostrado tener un amplio espectro de actividad inhibitoria contra bacterias patógenas de interés alimenticio. El propósito de este trabajo fue la caracterización de bacteriocinas provenientes de dos cepas de *B. thuringiensis* (nombradas 13 y 42) aisladas del parque estatal y reserva ecológica cañón de Fernández en Durango, México. Los péptidos antimicrobianos producidos por ambas bacterias mostraron una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 42.99 µg/µL (bacteriocina 13) y 70 µg/µL (bacteriocina 42), efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de *Bacillus cereus* 183 a los 40 y 50 minutos respectivamente, efecto bacteriolítico sobre esta misma bacteria y un espectro de inhibición contra *Bacillus cereus* 183, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *listeria innocua*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* sp y *Salmonella typhimurium*. Ambas cepas de *Bt* mostraron producir cada una dos péptidos antimicrobianos de ~15 kDa y menos de 10 kDa. En nuestro conocimiento no existen reportes de bacterias de *B. thuringiensis* aisladas de esta región en el norte de México.

Palabras clave: Antimicrobiano, *Bacillus thuringiensis*, bacteriocinas.

ABSTRACT:

Bacteriocins from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) have been shown to have a broad spectrum of inhibitory activity against pathogenic bacteria in food. The purpose of this work was the characterization of bacteriocins from two strains of *B. thuringiensis* (named 13 and 42) isolated from the natural reserve Fernandez Canyon State Park in Durango, Mexico. The antimicrobial peptides produced by both bacteria showed a minimal inhibitory concentration (MIC) of 42.99 µg/µL (bacteriocin 13) and 70 µg / µL (bacteriocin 42), an antimicrobial effect on the growth of *Bacillus cereus* 183 at 40 and 50 minutes respectively, a bacteriolytic effect over *B. cereus* 183 and a spectrum of antimicrobial activity against *Bacillus cereus* 183, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *listeria innocua*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* sp and *Salmonella typhimurium*. Each *Bt* strain showed to produce two antimicrobial peptides of ~ 15 kDa and less than 10 kDa. In our knowledge there are no reports of *B. thuringiensis* bacteria isolated from this region in northern Mexico.

Keywords: Antimicrobial, *Bacillus thuringiensis*, bacteriocins.

INTRODUCCIÓN

Una de las mayores preocupaciones dentro de la industria de los alimentos es el de proporcionar alimentos en buen estado, nutritivos e inocuos (libre de patógenos). Normalmente se suelen o solían utilizar conservadores químicos que lograban prolongar la vida de anaquel de los productos, sin embargo muchos de estos compuestos como los nitritos y nitratos poseen efectos nocivos contra la salud del consumidor. Por esa razón se ha volteado la vista a una alternativa más natural como los conservadores biológicos en particular las bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos producidos por bacterias con actividad antimicrobiana.

Hoy en día solo la nisina bacteriocina producida por la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* posee el estatus de generalmente reconocido como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) concedido por la administración de alimentos y medicamentos (Food and drug administration, FDA por sus siglas en inglés) por lo que es utilizada como conservador en diversos alimentos.

Aunque existe un gran número de bacterias capaces de producir péptidos antimicrobianos, las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas han sido las más estudiadas debido al estatus de seguridad que se les confiere. Con respecto a las bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), sus características y espectro antimicrobiano han despertado interés debido a que poseen un amplio rango de actividad antibacteriana contra cepas consideradas como patógenas que ponen en riesgo la salud humana y de animales. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria ubicua fácilmente de aislar del suelo, agua, plantas e insectos muertos reconocida por la capacidad insecticida de sus cristales y poco estudiada por la actividad antimicrobiana de sus bacteriocinas. En la actualidad existen reportadas al menos 19 bacteriocinas sintetizadas por alguna de las 87 variedades serológicas de *B. thuringiensis* identificadas hasta hoy.

El objetivo principal de este proyecto fue caracterizar las bacteriocinas producidas por dos cepas identificadas bioquímicamente y microscópicamente (por la producción de un cristal proteico insecticida) como *B. thuringiensis* (cepas 13 y 42), aisladas del suelo del parque estatal Cañón de Fernández en Durango, México, considerado como una reserva natural protegida desde 2004.

Las características estudiadas incluyeron la determinación del espectro de actividad por difusión en pozos, el efecto sobre el crecimiento de la cepa indicadora y la concentración mínima inhibitoria (CMI), además de establecer la masa molecular y la actividad antimicrobiana directa en gel (De la Fuente-Salcido y col., 2013; Huang y col., 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de bacteriocinas. A partir de un pre-inoculo (1%) a una concentración de 1×10^6 - 1×10^8 células/mL se llevó a cabo una fermentación durante 24 horas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 200 rpm en caldo soya tripticaseína (CST). Una vez finalizada la fermentación el cultivo fue centrifugado ($12'000$ rpm/15min a 4°C) separando el sobrenadante líquido del paquete celular. El sobrenadante libre de células fue saturado con sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) al 80% y puesto en agitación constante por 1 hora a 4°C . Después de centrifugar ($12'000$ rpm/30min a 4°C) el precipitado proteico fue re-suspendido en buffer de fosfatos 100mM pH 6.8 y dializado contra el mismo buffer a 4°C toda la noche. Finalmente el concentrado proteico dializado se almaceno a -20°C hasta su uso.

Espectro de actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana se determinó por medio del método de difusión en pozos como reporta Barboza-Corona y col. en 2011 contra *Bacillus cereus* 183, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *listeria innocua*, *Enterobacter cloacae*, *Brucella* sp., *Salmonella* sp and *Salmonella typhimurium*.

Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI). La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada mediante la técnica de doble dilución en agar de soya tripticaseína utilizando *B. cereus* 183 como bacteria indicadora. Partiendo del concentrado proteico dializado se realizaron diluciones (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) a un volumen final de 100 μL , las cuales se colocaron dentro de los pozos de 8 mm de diámetro en agar inoculado con *B. cereus* 183 dentro de una caja Petri. Las cajas Petri fueron incubadas a 4°C toda la noche y posteriormente a 28°C durante 24 horas.

Efecto en crecimiento bacteriano. Un pre-inoculo de la bacteria indicadora *B. cereus* 183 se creció toda la noche, se ajustó la concentración a $\sim 1 \times 10^9$ células/mL y se inoculó en CST a 28°C/180 rpm. En la fase logarítmica (3hr) ~ 3000 U de bacteriocina fueron agregadas al cultivo. Las unidades fueron determinadas mediante el método de difusión en pozos contra la misma bacteria. A los 0, 10, 20, 30, 40, 50, y 60 minutos se midió la densidad óptica (DO_{600nm}) en un lector de placas Synergy HTX (Biotek). Aunado a lo anterior se observó mediante microscopia de contraste de fases a 100x el efecto de ambas bacteriocinas sobre las células de *B. cereus* 183 en un microscopio Axio imager A1 Carl Zeiss (De la Fuente-Salcido y col., 2012).

Detección de peso molecular y actividad antimicrobiana en electroforesis SDS-PAGE. La actividad antimicrobiana en electroforesis en gel SDS-PAGE fue determinada como describe Barboza-Corona y col. en 2007.

Purificación en FPLC. A través de cromatografía de exclusión molecular en FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) las bacteriocinas 13 y 42 fueron purificadas. El concentrado proteico después de ser filtrado por un filtro con tamaño de poro de 20 μm fue cargado en una columna Bio-Gel P-10 (Bio-rad) con un tamaño de exclusión de 10 kDa a un flujo de 1 mL/min utilizando como fase móvil una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 20 mM. Las fracciones eluidas con actividad antimicrobiana fueron mezcladas, concentradas y fraccionadas por electroforesis SDS-PAGE.

Resultados.

Espectro de actividad antimicrobiana. Las bacteriocinas producidas por las bacterias *Bt* 13 y *Bt* 42 mostraron actividad antimicrobiana contra la mayoría de las bacterias probadas. *P. aeruginosa* y *B. cereus* 183 mostraron mayor sensibilidad a la actividad de las bacteriocinas dentro del grupo de bacterias probadas, mientras que solo *Brucella* sp. mostró resistencia al efecto antimicrobiano de los péptidos (Figura 1).

Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI). Los resultados de la concentración mínima inhibitoria de ambas bacteriocinas contra *B. cereus* 183 se muestran en la figura 1. La bacteriocina de *Bt* 13 mostró actividad hasta una dilución 1/32 con una concentración de 42.99 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que la bacteriocina de *Bt* 42 de igual manera mostro actividad hasta una dilución de 1/32 pero con una concentración de 70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A una dilución de 1/64 no hubo actividad detectable.

Efecto de las bacteriocinas sobre crecimiento bacteriano. El efecto antimicrobiano de ambas bacteriocinas contra *B. cereus* 183 fue probado. El cultivo de *B. cereus* 183 tratado con bacteriocina 13 mostro un decremento en su crecimiento a los 50 minutos de cultivo, mientras que el cultivo tratado con bacteriocina 42 mostro lo mismo a los 40 minutos comparados con el cultivo sin tratamiento (Figura 2). La imagen de microscopia de contraste de fases a 100x del efecto de bacteriocina sobre células de *B. cereus* indican un efecto bacteriolítico al lisar casi por completo la célula y exponer el material interno (Figura 2).

Detección de peso molecular y actividad antimicrobiana en electroforesis SDS-PAGE. Las cepas identificadas como *B. thuringiensis* 13 y 42 mostraron la capacidad de producir (cada una) dos agentes antimicrobianos los cuales fueron detectados por medio de electroforesis SDS-PAGE. En los carriles 1a y 2a se muestra el patrón proteico de los concentrado proteicos de *Bt* 13 y *Bt* 42 1b y 2b se pueden observar cuatro bandas de actividad inhibitoria contra *B. cereus* 183. Las dos primeras bandas se encuentran cerca de los 15 kDa mientras que las segundas bandas de menor peso se ubican por debajo de los 10 kDa (Figura 3).

Purificación por medio de FPLC. En la figura 3 se puede observar el patrón proteico de las fracciones de bacteriocina 13 (carril 1) y bacteriocina 42 (carril 2). En los carriles 1 y 2 se pueden observar dos bandas una muy tenue (carril 1) y otra muy marcada (carril 2) cercanas a los 15 kDa y otro par de bandas muy tenues en ambos carriles por debajo de los 10 kDa.

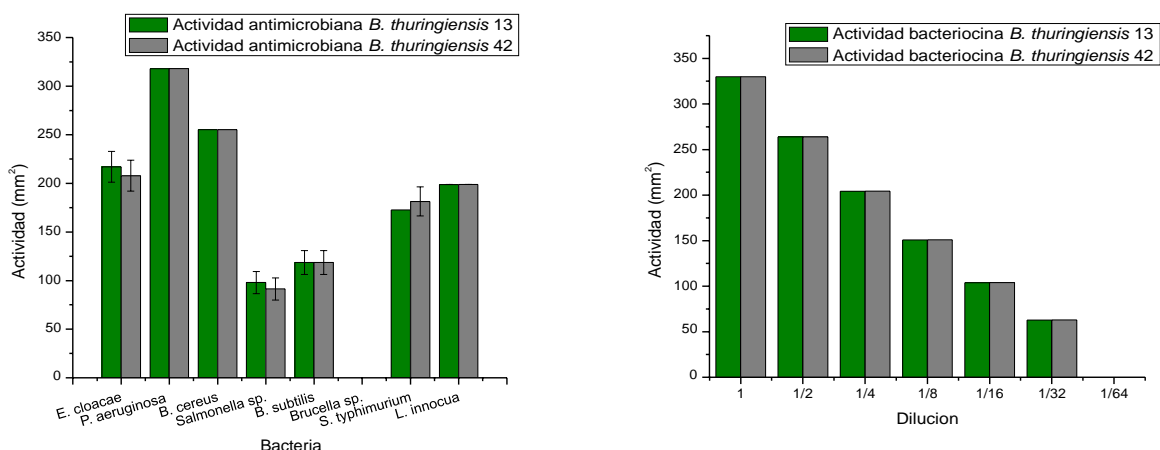


Figura 1. Espectro de actividad de las bacteriocinas de *Bt* 13 y *Bt* 42 contra bacterias patógenas. *P. aeruginosa* y *B. cereus* 183 mostraron mayor sensibilidad, mientras que solo *Brucella* sp. presentó resistencia al efecto (Izquierda). Concentración mínima inhibitoria de las bacteriocinas de *Bt* 13 y *Bt* 42 contra *B. cereus* 183. Ambas bacteriocinas mostraron actividad hasta una dilución de 1/32 con concentraciones de 42.99 µg/µL para bacteriocina 13 y 70 µg/µL para bacteriocina 42 (Derecha).

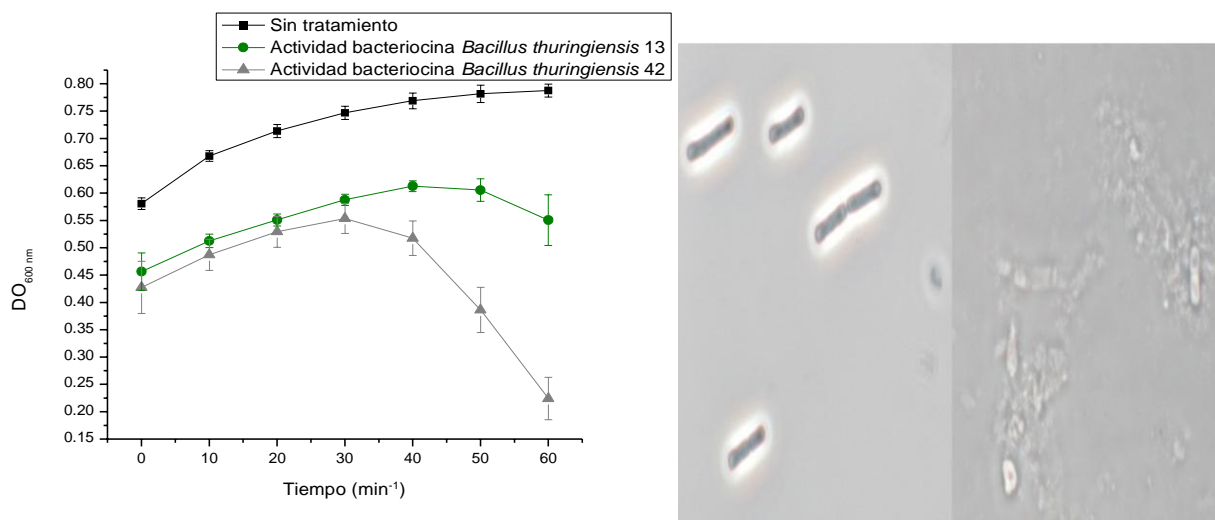


Figura 2. Efecto de bacteriocina sobre crecimiento de *B. cereus* 183 en medio líquido. Se observa que la bacteriocina 13 inhibe el crecimiento de *B. cereus* 183 a los 50 minutos de cultivo mientras que la bacteriocina 42 lo hace a los 40 minutos (Izquierda). Efecto de las bacteriocina sobre células de *B. cereus* 183 a 100x. Se observa un efecto bacteriolítico al destruir casi por completo la estructura celular mediante lisis (Derecha).

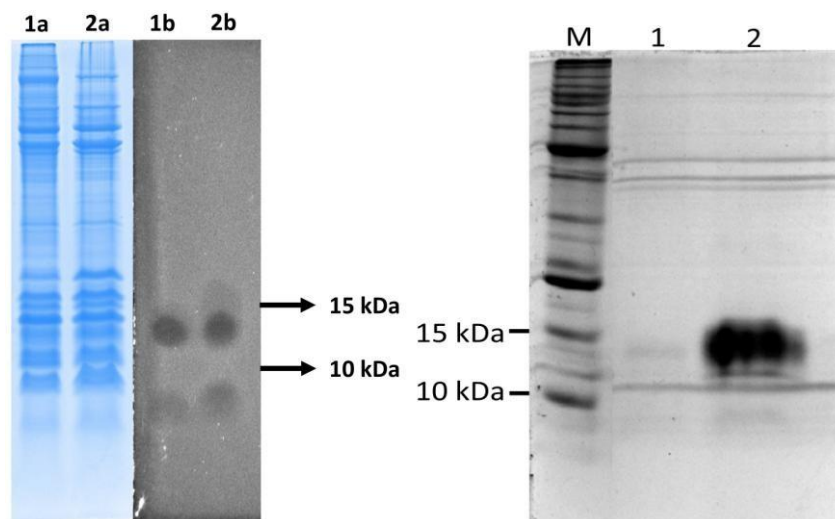


Figura 3. Detección de peso molecular y actividad antimicrobiana en electroforesis SDS-PAGE. Ambas cepas de *B. thuringiensis* (13 y 42) demostraron producir dos agentes antimicrobianos de distinto peso molecular. En los carriles 1a y 2a se observa el patrón de proteínas de los precipitados proteicos de cada cepa. Las dos primeras bandas de inhibición en los carriles 1b y 2b se ubican cercano a los 15 kDa mientras que las bandas de menor peso en los mismos carriles se ubican por debajo de los 10 kDa. *B. thuringiensis* 13 (carriles 1a y 1b) *B. thuringiensis* 42 (carriles 2a y 2b) (Izquierda). Gel de electroforesis SDS-PAGE de bacteriocina 13 y 42 purificadas por cromatografía de exclusión molecular. En los carriles 1 y 2 se observan dos bandas cercanas a los 15 kDa y otras dos bandas por debajo de los 10 kDa. Carril 1 correspondiente a bacteriocina 13 y carril 2 correspondiente a bacteriocina 42 (Derecha).

DISCUSIÓN

En este trabajo se confirmó que Las bacteriocinas producidas por las cepas de *Bt* 13 y *Bt* 42 poseen un peso molecular pequeño menor a 15 kDa. La entomocina 9 producida por *B. thuringiensis entomocidus* HD9 es la bacteriocina de *Bt* más grande reportada al momento con 12.4 kDa. El espectro de inhibición de ambas bacteriocinas coincide con el reportado de por otras bacteriocinas como la entomocina 420, morricina 269, keniacina 404, kurstacina 287 y tolworthcina 524, inclusive la resistencia de *Brucella sp.* concuerda con lo reportado ya que no existe algún registro de alguna bacteriocina de *Bt* capaz de inhibir el crecimiento de esta bacteria patógena gram negativa, no obstante que otras bacterias gram negativas son susceptibles al efecto inhibitorio. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas sobre el crecimiento de *B. cereus* 183 en medio líquido y en las células mediante microscopia de contraste de fases indica un efecto bacteriolítico debido a la elevada destrucción de la estructura celular. Lo anterior concuerda con lo reportado por De la Fuente-Salcido y col., (2012) respecto al efecto de las bacteriocinas entomocina 420, morricina 269, keniacina 404, kurstacina 287 y tolworthcina sobre *B. cereus* 183, el cual también fue identificado como bacteriolítico.

Las fracciones proteicas purificadas por FPLC de ambas bacteriocinas corroboraron los pesos moleculares que se obtuvieron mediante el fraccionamiento por electroforesis SDS-PAGE al ser prácticamente del mismo tamaño.

Actualmente son 19 las bacteriocinas producidas por diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* reportadas en la literatura mundial, y en nuestro conocimiento no hay reportes de cepas de *Bt* aisladas del parque estatal y reserva natural, cañón de Fernández en Durango, México (De la Fuente-Salcido y col., 2012; Barboza-Corona y col., 2007; Cherif y col., 2003). Por lo que la caracterización de estos dos nuevos péptidos antimicrobianos representa un aumento en el número de bacteriocinas de *Bt* reportadas al momento, además del incremento en el conocimiento sobre este tipo de agentes antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

- Barboza-Corona J., De la Fuente-Salcido N., Alva-Murillo N., Ochoa-Zarzosa A., Lopez-Meza J. 2011. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 138,179-183.
- Barboza-Corona J., Vazquez-Acosta H., Bideshi D.K., Salcedo-Hernández R. 2007 Bacteriocin-like inhibitor substance produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol*, 187, 117-126.
- Cherif A., Chehimi S., Limem F., Hansen B.M., Hendriksen N.B., Daffonchio D. 2003. Detection and characterization of a novel bacteriocin entomocin 9 and safety evaluation of its producer *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. *Journal of applied microbiology*. 95, 9990-10000.
- De la Fuente-Salcido N., Barboza-Corona J., Espino-Monzón A., Pacheco-Cano R., Balagurusamy N., Bideshi D. and Salcedo-Hernandez R. 2012. Expanding the use of fluorogenic method to determine activity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* bacteriocins against gram-positive and gram-negative bacteria. *The scientific world journal*. 2012, 1-9.
- De la Fuente-Salcido N., Casados-Vázquez L., Barboza-Corona J. 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, 515-522.
- Hunag T., Zhang X., Pan J., Su X., Jin X., Guan X. 2016. Characterization of a novel cold shock protein-like bacteriocin synthesized by *Bacillus thuringiensis*. *Scientific Reports*. 6, 1-14.