

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS  
PRODUCIDAS POR CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* Y SU  
POTENCIAL COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS**

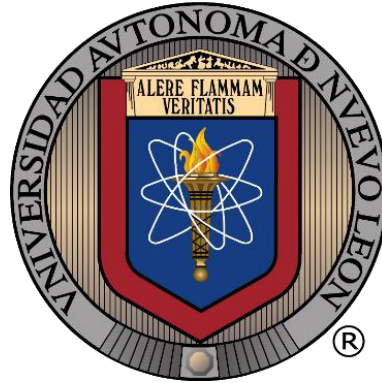
**POR**

**ELMA LAURA SALAZAR MARROQUÍN**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

**MAYO 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**



**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR  
CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* Y SU POTENCIAL COMO AGENTES  
ANTIBACTERIANOS**

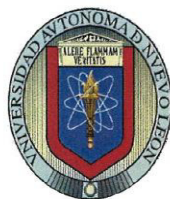
**Por**

**MC. ELMA LAURA SALAZAR MARROQUÍN**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
MICROBIOLOGÍA**

**Cd. Universitaria**

**Mayo 2016**



Detección y caracterización de bacteriocinas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis* y su potencial como agentes antibacterianos

Comité de Tesis

A blue ink signature of Dr. Luis Jesús Galán Wong, consisting of a stylized 'L' and 'W'.

---

Dr. Luis Jesús Galán Wong  
Presidente

A blue ink signature of Dr. Hugo Alberto Luna Olvera, featuring a stylized 'H' and 'L'.

---

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera  
Secretario

A blue ink signature of Dr. Benito Pereyra Alférez, with a large, looped 'B'.

---

Dr. Benito Pereyra Alférez  
Vocal

A blue ink signature of Dra. Katuska Arévalo Niño, with a stylized 'K' and 'A'.

---

Dra. Katuska Arévalo Niño  
Vocal

A blue ink signature of Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco, with a stylized 'M' and 'B'.

---

Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco  
Vocal



Detección y caracterización de bacteriocinas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis* y su potencial como agentes antibacterianos

Dirección de Tesis

A blue ink signature of Dr. Luis Jesús Galán Wong, consisting of a stylized, cursive script.

---

Dr. Luis Jesús Galán Wong  
Director

A blue ink signature of Dr. Miguel Ángel Reyes López, consisting of a stylized, cursive script.

---

Dr. Miguel Ángel Reyes López  
Director Externo

## **AGRADECIMIENTOS**

Por sobre todo agradezco a Dios por permitirme experimentar las mejores cosas de la vida. Cada suspiro, cada paso que he deado y cada meta alcanzada es gracias a Él.

Muy en especial a Benito Pereyra Alferez, el mejor asesor, guía y amigo; de corazón gracias.

Miguel Ángel Reyes López por su apoyo incondicional durante este tiempo.

Al Dr. Luis J. Galan Wong, por la confianza que depositó en mí durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, quienes crearon el mejor ambiente de trabajo, lo cual permitió que la carga fuera más ligera.

A mí Tía Adriana, por estar a mi lado cuando más la necesité, además gracias por el entusiasmo y fortaleza que me contagia.

Agradezco a toda mi familia y amigos quienes comparten conmigo la alegría de este logro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México.

Secretaria de Investigación y Posgrado, Instituto Politécnico Nacional apoyo economico a través del Proyecto 20151437.

## **DEDICATORIA**

Con todo mi amor dedico este trabajo a mi esposo Alberto Segura Treviño,  
por su gran amor y por ser el pilar de mi vida.

A mis hijos Alberto, Mauricio y Arturo, ellos son mi motor, mi combustible  
y mi todo, gracias a ellos he llegado más lejos de lo que imaginaba.

A mis padres Elma y Alejandro por ese amor que me da vida.

## ÍNDICE

Sección	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIAS.....	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xii
1. RESUMEN Y ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1 Bacteriocinas.....	5
3.1.1 Clasificación de Bacteriocinas de Gram positivas.....	7
3.1.2 Espectro de actividad.....	10
3.1.3 Modo de acción.....	11
3.1.4 Secreción de las bacteriocinas y mecanismos de autoprotección.....	13
3.1.5 Desarrollo de resistencia a las bacteriocinas.....	15
3.1.6 Métodos para demostrar antagonismo.....	15
3.1.7 Producción de bacteriocinas.....	17
3.1.8 Caracterización de bacteriocinas.....	19
3.1.9 Purificación de bacteriocinas.....	22
3.2 Bacterias productoras de bacteriocinas.....	23
3.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	26
3.3.1 Factores de patogenicidad y virulencia producidos por <i>B.</i> <i>thuringiensis</i> .....	27
3.3.2 Otras proteínas de importancia en el biocontrol.....	27
3.4 Bacteriocinas sintetizadas por <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	28
3.4.1 Nomenclatura de las bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> .....	29
3.4.2 Clasificación de las bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> .....	29
3.4.3 Características de las bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> .....	30
3.4.4 Aplicaciones potenciales de bacteriocinas de <i>B.</i> <i>thuringiensis</i> .....	35
4. JUSTIFICACIÓN.....	40
5. HIPÓTESIS.....	42
6. OBJETIVOS.....	43
6.1 Objetivo general.....	43
6.2 Objetivos específicos.....	43
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	44
7.1 Material biológico.....	44
7.2 Activación de las cepas de la colección.....	44
7.3 Detección de actividad antimicrobiana.....	45

7.3.1	Cultivo (producción de masa celular).....	45
7.3.2	Detección de actividad microbiana.....	45
7.3.3	Precipitación de proteínas.....	46
7.3.4	Confirmación de la prueba de actividad de la bacteriocina precipitada .....	46
7.4	Separación de proteínas en Geles de Acrilamida.....	46
7.5	Selección de la cepa productora para caracterizar y purificar una bacteriocina.....	47
7.6	Síntesis y caracterización de bacteriocina .....	47
7.6.1	Obtención de bacteriocina L4-2 parcialmente purificada (PP).....	47
7.6.2	Estabilidad a cambios de pH y temperatura.....	47
7.6.3	Sensibilidad a Proteinasa K.....	48
7.6.4	Determinación del modo de acción.....	48
7.6.5	Síntesis de la bacteriocina durante el ciclo de crecimiento.....	48
7.6.6	Caracterización parcial de la bacteriocina.....	49
7.7	Purificación de la bacteriocina.....	49
7.8	Determinación de la masa molecular.....	50
8.	RESULTADOS.....	51
8.1	Detección de actividad microbiana.....	51
8.2	Comprobación de la prueba de actividad de la bacteriocina precipitada.....	53
8.3	Separación de proteínas en Gel de Acrilamida.....	54
8.4	Selección de la cepa productora para caracterizar y purificación una bacteriocina.....	55
8.5	Producción y caracterización de la bacteriocina L4-2... ..	57
8.5.1	Obtención de bacteriocina L4-2 parcialmente purificada (PP).....	57
8.5.2	Sensibilidad a la proteinasa K y estabilidad a temperatura y pH. ....	57
8.5.3	Actividad contra <i>Listeria monocytogenes</i> .....	58
8.5.4	Modo de acción.....	59
8.5.5	Síntesis de la bacteriocina L4-2 durante el ciclo de crecimiento.....	60
8.5.6	Caracterización parcial la bacteriocina L4-2.....	61
8.6	Purificación de la bacteriocina L4-2.....	63
8.7	Determinación de la masa molecular .....	66
9.	DISCUSIÓN.....	69
10.	CONCLUSIONES.....	75
11.	PERSPECTIVAS.....	76
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	77
12.	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	89
13.	APENDICE.....	96



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Clasificación de bacteriocinas propuesta por Abriouel <i>et al.</i> , 2011 y su comparación con la clasificación de la LAB.	9
2	Sensibilidad a cambios de temperatura y valores de pH de las bacteriocinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
3	Géneros de microorganismos productores de bacteriocinas.	25
4	Bacteriocinas sintetizadas por <i>Bacillus thuringiensis</i> y su cepa productora.	31
5	Características fisicoquímicas de bacteriocinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	35
6	Bacteriocinas con actividad biológica contra Gram-positivas.	37
7	Bacteriocinas con actividad biológica contra Gram-negativas.	38
8	Bacteriocinas con actividad biológica contra Hongos.	38
9	Actividad biológica de las 48 cepas de la colección IBGM contra las cepas de Bt HD1, HD73 e IBGM10.	51
10	Gram positivas inhibidas por Bt de la colección IBGM.	52
11	Análisis de la colección IBGM para seleccionar una cepa para purificar y caracterizar.	58
12	Condiciones para Gel acrilamida (Camara C.B.C. Scientific modelo DASG-250)	99
13	Resultados de proteínas y conductividad. Proteína precipitada colectadas por SEFADEX.	102

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
1	Secuencia aminoacídica de la nisina.	6
2	Dendrograma que muestra la relación de bacteriocinas de <i>Bacillus</i> según la homología de las secuencias de aminoácidos primarios.	10
3	Modelo de reconocimiento del sitio blanco, el modo de acción, y la inmunidad de bacteriocinas clase IIa.	13
4	Regulación de la síntesis de la enterocina A de <i>Enterococcus faecium</i> (no lantibiótico).	14
5	Aproximadamente el 88% de las bacteriocinas son producidas por bacterias Gram-positivas.	26
6	Alineamiento de Secuencia aminoacídica de algunas bacteriocinas de Bt.	26
7	Cultivo de <i>S. aureus</i> inhibido por cepas de la colección GM. Los números corresponden al número con el que se identifica la cepa en la colección.	52
8	Proteínas precipitadas de la cepa L4-2.	53
9	Proteínas de la cepa L4-2 precipitadas con sulfato de amonio, sulfato de amonio, agua y cloruro de sodio.	53
10	Gel nativo (PAGE) con Proteínas precipitadas.	54
11	Dendrograma de colección GM agrupada en base a su espectro de inhibición.	56
12	Cultivo GM10 inhibido por las bacteriocinas L4-2, tohicina, entomocina 9 y thuricina.	57
13	Cultivo de GM10. Bacteriocina tratada con proteínasa K.	57

<b>14</b>	Cultivo de GM10. (SN) bacteriocina sin tratamiento. Los números corresponden al valor de pH al que se ajustó la bacteriocina.	58
<b>15</b>	Cultivo de <i>Listeria monocitogenes</i> inhibida por bacteriocina L4-2.	58
<b>16 A</b>	Efecto de bacteriocina L4-2 sobre <i>Bacillus thuringiensis</i> IBGM10, medida en UFC.	59
<b>16B</b>	Efecto de bacteriocina L4-2 sobre <i>Bacillus thuringiensis</i> IBGM10, medida por densidad óptica.	59
<b>17</b>	Cinética de producción de bacteriocina L4-2 durante el crecimiento de la cepa L4-2.	60
<b>18</b>	Prueba de actividad de la bacteriocina contra IBGM10 durante la cinética de crecimiento de la cepa L4-2.	61
<b>19</b>	Muestra de L4-2 eluida en el FPLC. Proteínas fraccionadas y medidas por DO a 280nm.	61
<b>20</b>	Cultivos para probar actividad de las fracciones obtenidas al eluir L4-2 por FPLC.	62
<b>21</b>	Proteínas separadas por filtros Centricon.	62
<b>22</b>	Cultivo de Bt IBGM10 inhibido por proteínas sintetizadas por L4-2 separadas por tamaños utilizando filtros Centricon.	63
<b>23 A y B</b>	Cromatogramas del HPLC. Comparación del perfil del de proteínas del sobrenadante de la cepa L4-2 cultivada 12 h y 24 h.	64
<b>24</b>	Cromatograma obtenido por HPLC correspondiente a las proteínas producidas por la cepa L4-2.	65
<b>25</b>	Prueba de actividad de las proteínas colectadas en el HPLC contra cultivo de IBGM10.	66
<b>26</b>	Cromatograma de la bacteriocina L4-2 por espectrómetro de masas.	67
<b>27</b>	Espectro de fragmentación	68

<b>28</b>	Tubos con agar suave	95
<b>29</b>	Diálisis de proteínas precipitadas	97
<b>30</b>	Prueba de actividad de la cepa L4-2, HD2, HD9 y HD868	98
<b>31</b>	Proteína precipitada con sulfato de amonio pasada por Columna de SEFADEX para eliminar sales.	101
<b>32</b>	Muestras colectadas de la columna de SEFADEX	102
<b>33</b>	Proteínas liofilizadas	103
<b>34</b>	Prueba de actividad biológica de proteína liofilizada, usando GM10 como cepa indicadora	103
<b>35</b>	Prueba con ninhidrina revela presencia de aminoácidos	104

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacterias Acido Lácticas
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BLIS	Bacteriocin-like Inhibitor Substances
Bt-BLIS	Bacteriocin-like Inhibitor Substances de <i>B. thuringiensis</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
CST	Caldo de soya tripticasa
CN	Caldo Nutritivo
Cry	Proteínas insecticidas
Cyt	Proteínas insecticidas
Da	Daltones
DEAE	Dietilaminoetil
FTA	Ácido trifluoroacetico
FPLC	Cromatografía líquida rápida para proteínas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IBGM	Instituto de Biotecnología Galán Maldonado
kDa	Kilo Daltones
GRAS	Generally Recognized As Safe
FDA	Food and Drug Administration
μl	Microlitros

mM	Milimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetros
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
N-terminal	Grupo amino terminal
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PS	Parasporinas
SDS	Dodecil (lauril) sulfato de sodio
UA/ml	Unidades arbitrarias/mililitro
UFC	Unidades formadoras de colonia

## 1. RESUMEN

La cepa *Bacillus thuringiensis* L4-2 fue estudiada como posible productora de bacteriocinas con actividad biológica contra *S. aureus* por ser un microorganismo de interés humano que ha desarrollado resistencia a antibióticos tradicionales. Esta bacteriocina presentó estabilidad ante diferentes niveles de pH y hasta una temperatura de 90°C, así mismo la actividad de la bacteriocina L4-2 contra cepas sensibles desapareció al ser tratada con proteinasa K, lo que indica su naturaleza protéica. Durante la cinética de crecimiento se pudo identificar que la producción de la bacteriocina comienza a mitad de la fase logarítmica, alcanzando su máxima producción al inicio de la fase estacionaria y desapareciendo después de las 24hr. Para la purificación de las proteínas se llevó a cabo una precipitación fraccionada con Sulfato de Amonio, seguida de una diálisis con membranas con poro de 1000 Da. La proteínas fueron fraccionadas por tamaño utilizando FPLC, complementando la separación con filtros concentradores YM-3 (Centricon) y finalmente con cromatografía líquida (HPLC) fase reversa. Su peso molecular fue determinado en 3.138 kDa utilizando espectrometría de masas. De acuerdo a la masa molecular de la bacteriocina L4-2, podemos sugerir que se trata de una nueva bacteriocina producida por *Bacillus thuringiensis* que inhibe el crecimiento de *S. aureus* y *Listeria monocitogenes*. Las características de esta bacteriocina son ideales para ser utilizada en el control de bacterias drogo resistentes.

## ABSTRACT

Bacteriocins are proteins with antimicrobial activity and arose as an alternative for the treatment of foodborne bacteria and fastidious human pathogens. In this work we inspected the antibacterial activity of forty eight Mexican *Bacillus thuringiensis* strains against several bacteria used as indicators; such as *B. thuringiensis*, *Listeria monocytogenes* (Lm) and a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Supernatants from twenty six strains yielded positive action against some indicator, but nine of them showed inhibitory activity not only for all *B. thuringiensis*, but also against Lm and MRSA. The strain L4-2, isolated from soil, was selected for microbiological and biochemical studies. The bacteriocin called L4-2 was found in the supernatant since logarithmic growth (4 h) until stationary phase and it decreased after 8 h. The bacteriocin had antibacterial action to pH 3.0-7.0 and remains stable after 30 min at 80°C, but its biological activity was lost after treatment with proteinase K. Results from mass spectrometer showed that the bacteriocin L4-2 possesses a molecular mass of 3,138 Da. The biological activity of bacteriocin L4-2 indicates that it has interesting activity and specificity to be considered for biotechnological purposes.



## 2. INTRODUCCIÓN

Existe una creciente demanda de nuevos tratamientos para el control de bacterias patógenas que han desarrollado resistencia a los antibióticos (Fischback 2009). Aproximadamente 25.000 personas mueren cada año en Europa debido a infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos que están dejando de funcionar debido a su uso indiscriminado (Homedes y Ugalde, 2013). Estos patógenos encuentran múltiples vías de transmisión al hombre como por medio de alimentos, de persona a persona, utensilios de cocina, instrumentos quirúrgicos, medio ambiente de hospitales, etc. La solución podría estar en el uso de bacteriocinas.

Las bacteriocinas son toxinas proteicas producidas por bacterias, capaces de lisar o inhibir el crecimiento de otras cepas con las que comparten una estrecha relación filogenética. Las primeras bacteriocinas encontradas fueron las colicinas producidas por *Escherichia coli*, descubiertas por Andre Gratia en 1925 (Walters y Crosa, 1991). Desde esa fecha hasta nuestros días se han reportado una gran cantidad de moléculas bioactivas producidas por cepas Gram-positivas y Gram-negativas.

Generalmente las bacteriocinas son consideradas como metabolitos secundarios que inhiben a otras bacterias, pero es importante diferenciarlas de otros subproductos metabólicos como el amoníaco, ácidos orgánicos, y peróxido de hidrógeno, que también pueden causar inhibición. Desde el punto de vista de la variedad de microorganismos productores, es posible que la mayoría, si no todas las bacterias producen, moléculas capaces de inhibir no solo a miembros de otros géneros, sino también a los de su misma especie (Tagg *et al.*, 1976).

Es importante precisar que el término “bacteriocina” se emplee solo cuando cumplen con dos características principales: 1) ser de naturaleza proteica y 2) presentar actividad bactericida; además se recomienda seguir la práctica de algunos investigadores como Barboza-Corona (2007) en la designación de sustancias antagonistas caracterizadas de forma incompleta como Sustancias Inhibidoras Parecidas a Bacteriocinas (BLIS por sus siglas en inglés), pues de no tratarse de una bacteriocina podríamos estar trabajando

con otros productos bacterianos como: antibióticos de bajo peso molecular, productos metabólicos, agentes líticos, enzimas y bacteriófagos (Tagg *et al.*, 1976; Cherif *et al.*, 2008).

Entre los microorganismos productores de bacteriocinas, las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido las más ampliamente estudiadas. Además de éstas, diferentes especies de *Bacillus sp.* han despertado interés por su potencial para producir bacteriocinas, tal es el caso de *Bacillus thuringiensis* (Bt), cuya importancia económica reside en la proteínas Cry, Cyt y Vip. Es bien conocido que esta proteínas desarrolla actividad son entomopatógena hacia plaga de interés agrícola. Pero, también posee capacidad de sintetizar una amplia gama de bacteriocinas. A la fecha se han reportado 18 bacteriocinas derivadas del metabolismo de Bt, de las cuales se conoce muy poco de su naturaleza y modo de acción.

En este trabajo realizamos la búsqueda de bacteriocinas en la colección de Bt del Instituto de Biotecnología de la UANL. Las bacteriocinas aisladas fueron parcialmente purificadas, posteriormente se probó su actividad inhibitoria contra cepas Gram-positivas y Gram-negativas. Adicionalmente, caracterizamos una bacteriocina producida por la cepa L4-2. La aportación mas importante de este trabajo es la identificación de una nueva bacteriocina producida por Bt con actividad contra dos microorganismos de alto impacto en salud humana: i) *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y ii) *Listeria monocytogenes*, de gran importancia en la industria alimentaria.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Bacteriocinas.

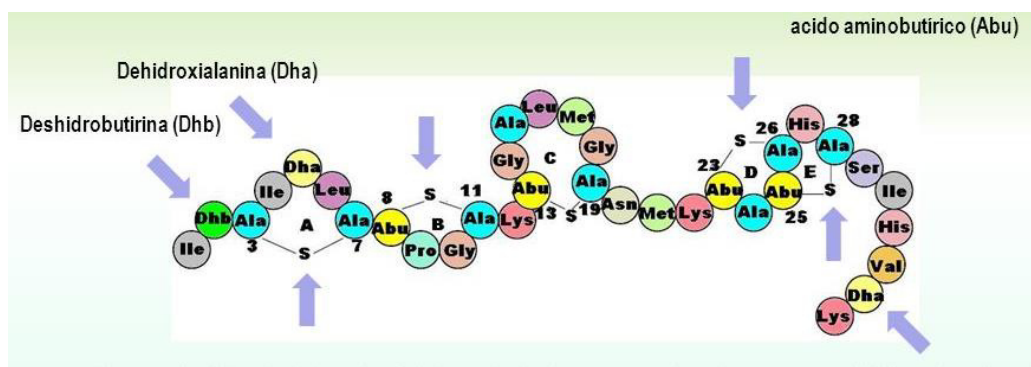
Las bacteriocinas consideradas como péptidos antimicrobianos son compuestos de bajo peso molecular y de amplio espectro de actividad antagónica contra bacterias, virus y hongos; son sintetizados ribosomalmente por bacterias, que al ser excretadas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de especies que están o no relacionadas filogenéticamente, por lo tanto, eliminan o reducen significativamente la competencia por los nutrientes disponibles. (Jack *et al.*, 1995; Paik *et al.*, 1997; Cherif *et al.*, 2003). La función de las bacteriocinas dentro de la célula productora no es el de mantenerla viva, sino que actúan como defensa para sobrevivir en un nicho ecológico, controlando el crecimiento de microorganismos y confiriéndole protección lo que le da una ventaja durante la colonización. (Riley y Wertz, 2002). Estos péptidos han surgido durante la evolución de las bacterias como mecanismo de adaptación que les permiten competir por nutrientes y espacio en su hábitat, de tal manera que inhiben el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos (López *et al.*, 2008).

Se ha propuesto que el 99% de las bacterias sintetizan al menos una bacteriocina, ya que éstas se han encontrado en la mayoría de las especies estudiadas incluyendo bacterias Gram positivas, Gram negativas y también en las Arqueas (Klaenhammer, 1988). Estas moléculas han sido utilizadas como una importante herramienta en estudios evolutivos y ecológicos. Desde la comercialización exitosa de la nisina, bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, el desarrollo de la ingeniería genética y las técnicas moleculares, ha resurgido un interés importante en el estudio de las bacteriocinas, particularmente en sus aplicaciones biomédicas potenciales y en la bioconservación de los alimentos (López *et al.*, 2008).

Se dice que las bacterias producen bacteriocinas con actividad bactericida contra cepas del mismo nicho ecológico, sin embargo esto no siempre es así. La interpretación de los espectros de actividad inhibidora en términos de actividad específica de la bacteriocina a

veces puede verse afectada por la producción de más de una bacteriocina producida por la misma cepa (Van Belkum *et al.*, 1992) o por la actividad inhibidora de otros productos metabólicos tales como ácidos y peróxido de hidrógeno (Malke *et al.*, 1974). Aunque por definición todas las bacteriocinas tienen una proteína o péptido como componente esencial para su función bactericida, algunos investigadores reportaron que algunas de ellas se componen por combinaciones de diferentes proteínas o son proteínas unidas a lípidos o carbohidratos (Rea *et al.*, 2011; Ahern *et al.*, 2003). En estudios donde se ha realizado la purificación de la proteína, han demostrado que ciertas bacteriocinas que antes se consideraban de alto peso molecular son más bien pequeños péptidos que, debido a su naturaleza altamente hidrofóbica, se unen a algunos otros componentes celulares para ser activos, (Tagg *et al.*, 1976).

La bacteriocina mejor caracterizada es la nisina la cual fue la primer bacteriocina identificada en 1928 (Fig. 1), es utilizada como conservador de alimentos, es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe) (Delves-Broughton 1996). Se produce de forma natural por bacterias de algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos como un aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*. (González-Martínez *et al.*, 2003)



**Figura 1.** Secuencia aminoacídica de la nisina.

### 3.1.1 Clasificación de Bacteriocinas de Gram positivas.

Muy pocas bacteriocinas se han caracterizado completamente, lo que ha provocado que en ocasiones éstas sean llamadas erróneamente "bacteriocinas" y que no exista hasta ahora un criterio generalizado para clasificar todas las bacteriocinas reportadas.

Los primeros criterios para clasificar bacteriocinas se basaron en las características de colicinas, estos fueron: (a) un estrecho espectro de inhibición de actividad centrada sobre especie homólogas; (b) la presencia de un péptido biológicamente activo; (c) modo de acción bactericida; (d) célula receptoras específicas; (e) genes producidos en plásmidos responsables de producción de bacteriocinas y de la inmunidad de la célula productora; (f) producción por biosíntesis letal es decir, la bacteria produce una bacteriocina que en última instancia conducirá a la muerte celular (Tagg *et al.*, 1976).

Estudios recientes reportan que algunas de las bacteriocinas no cumplen con estas características, por ejemplo, se demostró que el gen que induce la producción de la thuricina Bn1 se encuentra en el cromosoma no en el plásmido de la cepa *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Ugras *et al.*, 2012). Otras bacteriocinas como la entomocina 9 presentan un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y algunas especies de hongos (Cherif *et al.*, 2003), no solo en especies homólogas.

Klaenhammer (1993), propuso la clasificación de las bacteriocinas producidas por las BAL agrupandolas en 4 clases principales, de acuerdo a su estructura, propiedades fisicoquímicas y moleculares. Posteriormente, otros investigadores hicieron reclasificaciones (Van Belkum y Stiles 2000), (Nes *et al.*, 2007) y para las bacteriocinas de enterococos (Franz *et al.*, 2007), entre otros.

Abriouel y colaboradores propusieron en el 2011 una clasificación que considera las clases I, II y III.

**Clase I:** incluye péptidos antimicrobianos que se someten a diferentes tipos de modificaciones postraduccionales. Esta clase se puede subdividir en cuatro subclases. Las subclases de I.1 a I.3 incluyen péptidos con modificaciones típicas de lantibióticos (por ejemplo, formación de lantionina y residuos  $\beta$ -metil lantionina), mientras la subclase I.4 incluye otras modificaciones únicas. Subclase I.1 incluye lantibióticos de tipo A con una estructura lineal, tal como la subtilina, ericina S y ericina A (Tabla 1).

Subclase I.2 incluye el tipo B lantibiotico globular mersacidina y otros lantibióticos como sublancina 168 y paenibacillina. Subclase I.3 incluye los lantibióticos de dos componentes, tales como haloduracina y lichenicidina. Subclase I.4 incluye el único péptido cíclico subtilosina A que contiene un enlace de cabeza a cola, así como puentes de sulfuro formados entre los grupos de cisteína y los residuos de aminoácidos deshidratados. Esta clasificación es coherente con la agrupación obtenida a partir del análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos publicadas (Fig. 2). El subtilina y ericina S forman un grupo coherente, que se caracteriza por regiones altamente conservadas en el péptido maduro, así como en las secuencias de péptidos líder (Fig. 2). Curiosamente, las subunidades A1 y A2 de haloduracina y lichenicidina también forman grupos coherentes, lo que sugiere que ambos lantibióticos de dos péptidos comparten un origen común. Mersacidina también muestra homología con la subunidad A1 de los lantibióticos de dos péptidos, y especialmente con la subunidad lichenicidina A1, con 25 residuos conservados en las posiciones idénticas, lo que indica su relación a los lantibióticos de dos péptidos (Fig. 2).

**Clase II:** comprende pequeños péptidos lineales no modificados (0,77 a 10 kDa), ribosomalmente sintetizados que son estables al calor y pH (Tabla 1). Esta clase se puede subdividir en cuatro subclases: i) Subclase II.1, abarca péptidos -pediocina con un motivo YGNGVXC conservado en su terminación N-terminal (Tabla 1), y la coagulina producida por *B. coagulans* I<sub>4</sub>, así como las bacteriocinas producidas por *Bacillus circulans* y cepas *Paenibacillus polymyxa* (SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580) pertenecen a esta subclase. ii) Subclase II.2, incluye las parecidas a thuricina como los péptidos con un motivo DWTXWSXL conservado en el N-terminal, tal como la bacthuricina F4, thurincina H y thuricina S y thuricina 17 producida por cepas de *B. thuringiensis*, y MRX1 cereína producidas por cepas de *B. cereus*. El análisis comparativo de la secuencia aminoacidica de péptidos-thuricina como muestra un grupo coherente (Fig. 2). iii) Subclase II.3 la cual esta confoermada por otros péptidos lineales, tales como la lichenina producida por *B. licheniformis*, o cereinas 7A y 7B.

**Clase III:** constituida proteínas de gran tamaño (> 30 kDa) con actividad de la fosfolipasa tales como las megacinas A-216 y A-19213 producidas por cepas de *Bacillus megaterium* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de bacteriocinas propuesta por Abriouel *et al.*, 2011 y su comparación con la clasificación de la LAB

<b>Bacteriocins of Bacillus species</b>		
<b>Proposed classification</b>	<b>Examples</b>	<b>LAB bacteriocins (Nes <i>et al.</i>, 2007)</b>
<b>Class I. Post-translationally modified peptides</b>		Class I. Lantibiotics
<i>Subclass I.1. Single-peptide, elongated lantibiotics</i>	Sutilin, ericin S, ericin A	
<i>Subclass I.2. Other singles-peptide lantibiotics</i>	Sublacin 168, mersacidin, paenibacilin	
<i>Subclass I.3. Two-peptide lantibiotics</i>	Haloduracin, lichenicidin	
<i>Subclass I.4. Other post-translationally modified peptides</i>	Subtilocin A	
<b>Class II. Nonmodified peptides</b>		Class II. Small linear peptides
<i>Subclass II.1. Pediocin-like peptides</i>	Coagulín, SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580	Class IIa
<i>Subclass II.2. Thuricin-like peptides</i>	Thurincin H, thuricin S, thuricin 17, bacthuricin F4, cerein MRX1	
<i>Subclass II.3. Other linear peptides</i>	Cerein 7A, cerein 7B, lichenin, thuricin 439	
<b>Class III. Large proteins</b>	Megacin A-216, megacin A-19213	Class III. Large heat-labile bacteriocins

Muchos otros polipéptidos antimicrobianos de tamaño intermedio (10-30 kDa) y otras grandes proteínas antimicrobianas producidas por bacilos no están incluidos en este esquema de clasificación, debido a la falta de datos sobre sus secuencias de la proteína; (Abriouel *et al.*, 2011), las considera dentro de la categoría de BLIS.

El término BLIS fue propuesto para aquellas sustancias inhibitorias de origen bacteriano descritas que no han sido suficientemente caracterizadas para cumplir con cualquier clasificación. Lo anterior debido además a que existen dos problemas en el uso del término “bacteriocina”: primero no hay una definición universalmente aceptada para este grupo de sustancias; y segundo, muchas de las sustancias inhibitorias descritas no han sido suficientemente caracterizadas para cumplir con cualquier clasificación. Por lo tanto, la practica más utilizadas por los investigadores (Barboza-Corona, *et al.*, 2007) para la nombrar las sustancias antagónicas incompletas, es el término: Sustancias Parecidas a Bacteriocinas (Bacteriocin Like Sustances) y reservar el término bacteriocina para ser aplicado a esas sustancias bacterianas que cumplen al menos con dos criterios: ser de naturaleza proteica y presentar actividad bactericida.



**Figura 2.** Dendrograma que muestra la relación de bacteriocinas de *Bacillus* según la homología de las secuencias de aminoácidos primarios. Se incluyen las secuencias peptídicas de bacteriocinas (cuando esté disponible). Los caracteres sombreados indican residuos de aminoácidos idénticos (Abriuel *et al.*, 2011).

### 3.1.2 Espectro de actividad.

El contenido de cistina en la molécula de la bacteriocina está relacionado con el espectro de inhibición y en base a esto se han propuesto tres grupos: i) bacteriocinas con un estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie; ii) bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram-positivas; y iii) bacteriocinas con amplio rango de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram-positivas y algunas Gram-negativas (Cintas *et al.*, 2001).

Considerando que la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas actúan sobre especies relativamente cercanas, algunas de las bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis* además de presentar actividad contra bacterias Gram-positivas actúan contra algunas Gram-negativas. Tal es el caso de entomocina 9, que inhibe *Pseudomonas aeruginosa* (Cherif *et al.*, 2003); la thuricina 17, que inhibe *E. coli* (Gray *et al.*, 2006) o bacthuristicina F4 que inhibe *Klebsiella* (Kamoun *et al.*, 2005).

El espectro de actividad de una bacteriocina, parece estar determinada en parte por la presencia de receptores de los organismos susceptibles. Reportes de estudios sobre los espectros de actividad de diferentes bacteriocinas contra cepas de la misma y de especies heterólogas, han ayudado a diferenciar bacteriocinas y han llevado al establecimiento de



los procedimientos de tipificación de bacteriocina para su uso en estudios epidemiológicos (Tagg *et al.*, 1976).

Para determinar el espectro de inhibición es necesario tomar en cuenta los factores que pueden influir tanto en la actividad de la bacteriocina a estudiar, así como la sensibilidad del grupo de bacterias con las que se pretende retar. La sensibilidad de las bacterias puede verse aumentado por la presencia de algunas sustancias químicas que debilitan la pared celular o por cambios en los valores de pH a los que normalmente crecen (Jack *et al.*, 1995). Por otro lado, el determinar si es de amplio espectro o no, depende de la cantidad de cepas con las que se rete la actividad bactericida, para que resulte en un número considerable para concluir si es de amplio espectro.

### **3.1.3 Modo de acción.**

Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas poseen características esenciales para llevar a cabo su actividad antimicrobiana, independientemente del blanco celular. Estas incluyen una carga positiva neta, que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas. La hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, y la flexibilidad que le permite a la bacteriocina realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de interacción con la membrana. Estas características varían de molécula a molécula; no obstante, todas son importantes para la actividad antimicrobiana (Jenssen *et al.*, 2006).

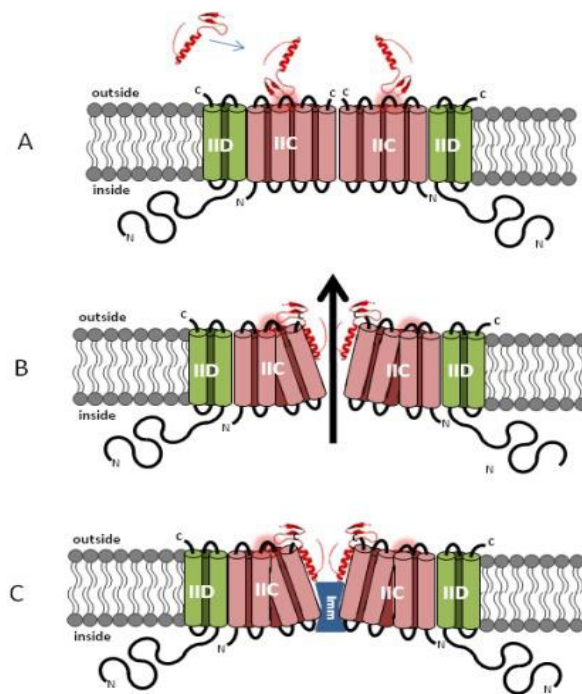
Las bacteriocinas actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos (Sablon *et al.*, 2000). Las cepas productoras de bacteriocinas están autoprotegidas contra la acción de estos péptidos por proteínas de inmunidad específicas para sus propias bacteriocinas (Quadri *et al.*, 1995).

Los mecanismos de acción incluyen de 3 formas: i) La formación de poros en la membrana celular, lo que causa la pérdida del contenido celular, éste es el mecanismo

descrito para las bacteriocinas como la nisina (Enserink M. 1999; Marki *et al.*, 1991) y lactocoquina A de *L. lactis*; ii).

La inhibición de la síntesis de la pared celular, mecanismo de acción descrito para la mersacidina, que involucra la unión al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano (UDPMur-Nac-pentapéptido-GlcNAc) (Wiedemann *et al.*, 2001) y; iii) la inhibición de la actividad de enzimas como la fosfolipasa A2, que participa en la reparación de membranas; mecanismo reportado para la cinamicina de *Streptomyces cinnamoneus* (Marki *et al.*, 1991).

La bacteriocina más estudiada es la nisina que pertenece a la Clase I de la clasificación de las bacterias Acido Lácticas (BAL). Cada bacteriocina presenta un mecanismo específico de acción dependiendo de la clase a la que pertenece. La unión de la bacteriocina a la membrana bacteriana se realiza inicialmente por atracción electrostática entre los lípidos cargado negativamente y la bacteriocina cargada positivamente. Esta carga positiva varía dependiendo de la bacteriocina, algunas como la nisina poseen esta carga en su extremo C terminal, a diferencia de la pediocina cuya carga neta se encuentra en el extremo N-terminal. Como segundo paso se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica, en el caso de la nisina esta inserción se realiza por su extremo N-terminal y en el caso de la Pediocina, a través de su  $\alpha$ -hélice transmembranal del extremo C-terminal (Moll *et al.*, 1999), formando poros en la membrana bacteriana por donde la célula empieza a perder iones y metabolitos que eventualmente le produce la muerte (Fig. 3).



**Figura 3.** Modelo de reconocimiento del sitio blanco, el modo de acción, y la inmunidad de bacteriocinas clase IIa. A) una bacteriocina clase IIa se dirige específicamente a un loop extracelular de IIC, uno de los dos componentes embebido en la membrana (IIC y IID, también llamados ManCD) de man-PTS; y B) la interacción inicial conduce a nuevas interacciones con algunas hélices de membrana de man-PTS, causando de alguna manera el canal de la azúcar permeasa permanezca abierta, lo que lleva a una fuga de solutos, la destrucción de la integridad de membrana, y finalmente la muerte celular y C) En células productoras, la proteína de inmunidad se une a la IICD bloqueándola e impidiendo de este modo que la bacteriocina se pegue y abra el poro.

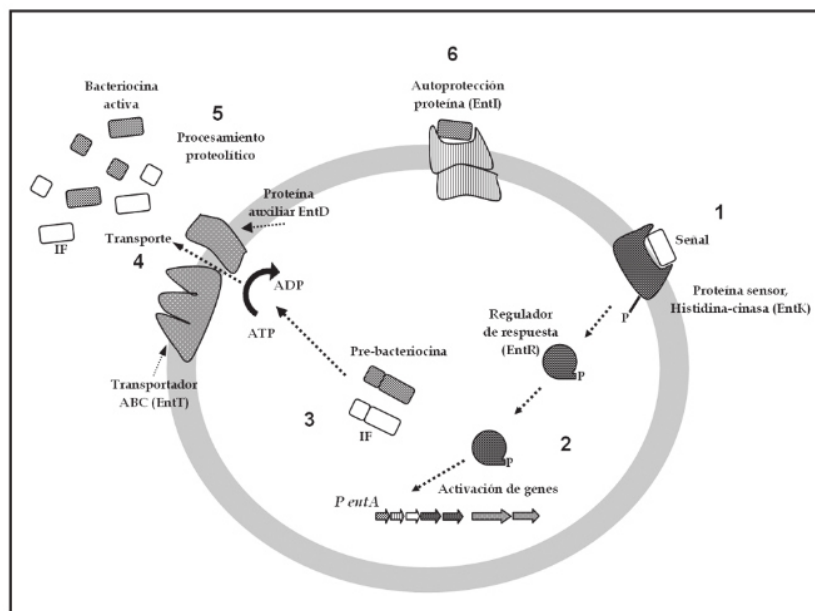
### 3.1.4 Secreción de las bacteriocinas y mecanismos de autoprotección.

Las bacterias productoras de bacteriocinas poseen proteínas que las protegen de la acción de sus propios péptidos. Se desconocen los mecanismos moleculares exactos por los que estas proteínas les confieren protección a las bacterias productoras; sin embargo, se han propuesto dos sistemas de protección, los cuales, en algunos casos actúan en la misma bacteria. La protección puede ser proporcionada por una proteína específica que secuestra e inactiva a la bacteriocina, o bien se une al receptor de la bacteriocina cambiando su estructura conformacional haciéndolo inaccesible a esta última (López *et al.*, 2008).

Dentro de la célula las bacteriocinas se sintetizan como pre-péptidos con un péptido señal en su región N-terminal que lo mantiene inactivo y facilita su interacción con el transportador (Fig 4 etapa 3). Estas proteínas transportadoras remueven el péptido señal

por medio de proteólisis durante el transporte del péptido hacia el espacio periplásmico. El péptido señal puede ser removido proteolíticamente durante el transporte del pre-péptido hacia el espacio periplásmico por las mismas proteínas transportadoras (Figura 4, etapa 4), o por proteínas Serina-proteasa presentes en la parte externa de la membrana celular. De esta manera el extremo carboxilo terminal es separado del péptido señal y es liberado al espacio extracelular representando al péptido biológicamente activo (Figura 4, Etapa 5) (Cotter *et al.*, 2005).

Las primeras investigaciones sobre bacteriocinas como la colicina mencionaban que, una vez producida, la célula productora debería morir durante el proceso de liberación (Lewus, 1991). Sin embargo, muchas bacteriocinas son producidas durante la fase de crecimiento sin la lisis del organismo productor por lo que este criterio no aplica.



**Figura 4.** Regulación de la síntesis de la enterocina A de *Enterococcus faecium* (no lantibiótico). Etapa 1, la proteína EntK detecta la presencia del factor de inducción (IF) y se autofosforila. Etapas 2 y 3, el grupo fosfato es transferido al regulador de respuesta EntR, el cual activa los genes involucrados en la síntesis del pre-péptido (pre-enterocina A) y del IF. Etapas 4 y 5, la pre-enterocina A y el IF son transportada al exterior por las proteínas EntT y EntD, y procesados por este mismo sistema, liberando a la enterocina A activa y al IF. Etapa 6, la proteína EntI protege a la bacteria productora de la acción de la enterocina A.

### **3.1.5 Desarrollo de resistencia a las bacteriocinas.**

El desarrollo de resistencia en las bacterias patógenas, que normalmente son sensibles a las bacteriocinas, es de sumo interés debido a su posible utilización en terapias biomédicas o a su uso extensivo en estrategias de bioconservación de alimentos, ya que la resistencia bacteriana podría limitar su uso. (López *et al.*, 2008).

Las bacterias pueden desarrollar resistencia de manera natural a la que se le llama intrínseca o debido a la exposición continua a bacteriocinas, a la que se conoce como adquirida (Ennahar *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2005).

Con el uso de la nisina, se han detectado cepas mutantes de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. bovis* que han desarrollado resistencia, originada por cambios en la pared y en la membrana celular. De manera específica, se ha observado la síntesis e incorporación de diversos componentes estructurales a la membrana y la pared celular por parte de las mutantes, lo que ha favorecido un incremento de las cargas positivas en dichas estructuras celulares y una reducción de la actividad antibacteriana de la nisina, que posee una carga positiva neta (López *et al.*, 2008).

Las bacteriocinas de Clase II, que inhiben *L. monocytogenes*, han sido estudiadas en sus mecanismos de inhibición debido a la resistencia desarrollada por esta cepa, observando que está relacionada con diversos factores como la expresión reducida de una permeasa que actúa como posible receptor, así como cambios en la fluidez de la membrana y en las cargas de la superficie celular (Vady Valoo 2004).

La importancia de estudiar la resistencia radica no solo en la posible ineficacia de las bacteriocinas a largo plazo, sino también en la generación de conocimientos que podrían servir de base para establecer estrategias que mejoren el potencial terapéutico de estos compuestos antimicrobianos (López *et al.*, 2008).

### **3.1.6 Métodos para demostrar antagonismo.**

La detección de inhibición en el laboratorio depende de la creación o simulación de las condiciones del medio ambiente como son pH, temperatura, nutrientes, etc. para facilitar una efectiva interacción con un organismo susceptible, además de la aplicación de un método sensitivo para detectar las células que responden a un agente inhibitorio.

La prueba general para la detección de antagonismo es llevada a cabo en medio sólido e involucra la detección del crecimiento de una cepa indicadora (pasivo) causada por el cultivo de prueba (activo) (Tagg *et al.*, 1946). La prueba directa más simple y más ampliamente usada para la selección preliminar de un gran número de cepas es el antagonismo "punción por palillo sobre el agar", basado en el método inventado por (Gratia, 1946). Aquí, la cepa indicadora como el organismo de prueba (o productora de bacteriocina), son cultivados simultáneamente y la demostración de antagonismo depende de la liberación de un inhibidor de pronta difusión en el crecimiento del cultivo de prueba.

Otro método es el de difusión en pozo, pudiendo hacer variaciones en cuanto al medio de cultivo, su consistencia y sobrecapa. La densidad del medio de la cepa indicadora es un determinante importante de la sensibilidad del método, por eso es que en múltiples investigaciones reportan la utilización de agar al 7% fundido conteniendo la cepa indicadora (pasiva) vaciado sobre una capa de agar sólido el cual es horadado con el fin de depositar el cultivo líquido de la cepa de prueba (activa), tal como lo reporta (Paik *et al.*, 1997, Cherif *et al.*, 2001 y Kamoun *et al.*, 2005). Desventajas de estos métodos: el uso de estos procedimientos de selección da la información útil preliminar para la identificación de posibles organismos bacteriocinogénicos. Estos métodos sufren de la limitación expresamente de no demostrar la actividad bactericida. Es importante excluir o identificar otras causas potenciales de los efectos inhibitorios que no son diferenciados por estos procedimientos.

Otro punto importante a considerar cuando se está investigando bacteriocinas es obligatorio eliminar fenómenos no relacionados que puede imitar la actividad bacteriocina, como los que a continuación se mencionan:

**1) Bacteriófagos:** Una característica diferencial importante es que las bacteriocinas, a diferencia de bacteriófagos, no llevan los determinantes genéticos necesarios para su autoreplicación dentro de organismos susceptibles (Tagg *et al.*, 1976). Así, sólo los bacteriófagos pueden ser propagados sobre los cultivos de las cepas de indicadoras. Una diferencia también puede ser demostrada por el aspecto de placas individuales sobre el cultivo indicador cuando se aumentan las diluciones del sobrenadante conteniendo el bacteriófago. La dilución de las preparaciones de bacteriocinas producen zonas que se

disminuyen, pero ninguna formación de placa. Un problema potencial es presentado por cepas que actúan tanto como bacteriocinas así como bacteriófagos (Tagg *et al.*, 1976).

**2) Propiedades fisicoquímicas:** Las diferencias fisicoquímicas entre bacteriófago y bacteriocina pueden ser útiles en algunos casos. La sensibilidad a la tripsina es un método utilizado ya que, a diferencia de las bacteriocinas, los bacteriófagos son altamente resistentes a esta enzima. Hamon y Peron (1963) han probado otros métodos para distinguir bacteriófago virulento de bacteriocinas.

**3) Radiación UV:** Las bacteriocinas no son afectadas por las dosis grandes de irradiación con luz ultravioleta a diferencia de los bacteriófagos (Tagg *et al.*, 1976).

**4) Resistencia a altas temperaturas:** La mayoría de las bacteriocinas son sumamente resistentes al calor.

Estas propiedades proporcionan el medio adicional para diferenciar bacteriocinas de fagos; sin embargo, puede haber excepciones (Tagg *et al.*, 1976). Las bacterias producen una amplia variedad de enzimas bacteriolíticas de bajo peso molecular, pueden ser difíciles de clasificar debido a que pueden presentar algunas propiedades parecidas a las bacteriocinas. La presencia extendida de tales sustancias hace imperativo evitar el empleo prematuro o indistinto del término bacteriocina. Tal es el caso de las cepas de *Bacillus thuringiensis* que producen morricina 269, kurstacina 287, kenyacina 404, entomocina 420 y tolworthicina 524, (Barboza-Corona, *et al.*, 2007). Lo que un investigador identifica como bacteriocina, muy bien puede ser un fago defectuoso, una enzima bacteriolítica o el antibiótico clásico identificado como tal por otro investigador. Mientras no se establezca una guía para definir sin lugar a dudas lo que es una bacteriocina, el empleo del término puede ser injustificado (Tagg, 1976).

### **3.1.7 Producción de bacteriocinas.**

La producción de bacteriocinas es muy heterogénea y puede requerir o no la presencia de una cepa sensible que actúa como inductor. Otros tratamientos como luz ultravioleta o mitomicin C son también métodos usados para la inducción de bacteriocinas. Esto se debe a que las bacteriocinas se sintetizan en condiciones de agotamiento de algún nutriente, ya sea por la biosíntesis o adición de algún inductor y/o por el descenso de la velocidad de crecimiento (Maldonado *et al.*, 2002). Estudios de laboratorio han

demostrado que la composición del medio de cultivo, las condiciones físicas como temperatura y pH pueden afectar la producción de la bacteriocina (De la Fuente, 2008). Dependiendo de la cepa productora es la selección del medio de crecimiento óptimo para producir una eficiente cantidad bacteriocina; por ejemplo, para *B. thuringensis* los mejores resultados se obtuvieron usando TBS, una medio formulado con digestión de la caseína y harina de soja y otras fuentes de carbono-nitrógeno (Martínez-Cardenas, 2012).

Para iniciar la producción, caracterización y purificación de una nueva bacteriocina es recomendable estandarizar las condiciones determinando la cantidad de bacteriocina capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo llevando a cabo diluciones para determinar una Unidad Arbitraria (UA) como unidad de medida, esto se calcula multiplicando por el recíproco de la dilución más alta a la que una bacteriocina presenta una actividad detectable por mililitro (Cherif *et al.*, 2003). Una vez determinado la Unidad Arbitraria es posible continuar con el paso siguiente que consiste en la caracterización de la bacteriocina.

Las condiciones para que una bacteria produzca de manera eficiente una bacteriocina, deben ser optimizadas de forma independiente, ya que factores de crecimiento mal definidos pueden afectar la producción de la bacteriocina activa. Estos factores son la selección de los medios de cultivo, condiciones de incubación, inductores e inhibidores de la producción de bacteriocinas.

**i) Medio de cultivo:** Para *Bacillus thuringiensis*, diferentes medios de cultivos han sido probados para realizar pruebas antagónicas de sus bacteriocinas. Siendo el Agar Soya Trypticasa el medio que proporciona las mejores condiciones de nutrición, obteniendo los mejores resultados de inhibición según Martínez-Cardenas *et al.*, 2012.

**ii) Condiciones de crecimiento:** Las condiciones de crecimiento a considerar son la temperatura, la aireación y el pH. En el caso de un cultivo incubado a una temperatura mayor que la temperatura óptima de la cepa productora, puede afectar la cantidad y el grado de actividad de la bacteriocina. La aireación de cultivos aumenta enormemente la producción de morricina 269 y kenyacina 404 producidas por *Bacillus thuringiensis* (Martínez-Cardenas *et al.*, 2012).



**iii) Definición del punto máximo de producción:** Dependiendo de la cepa productora, la síntesis máxima de la bacteriocina puede ocurrir en diferentes fases de crecimiento. La tochinina (Paik *et al.*, 1997) y la bacthuricina F4, producida por *B. thuringiensis* BUPM4 (Kamoun *et al.*, 2005), muestran una disminución en su actividad antibacteriana después de la inducción de la esporulación; por el contrario, es diferente a entomocina 9, cuya actividad bactericida ha demostrado ser constante durante más de 50 h de incubación. El descenso de la actividad de la bacteriocina puede estar asociado a la producción de proteasas producidas durante la esporulación (Paik *et al.*, 1997). Otros estudios también han reportado pérdidas significativas de la actividad de la bacteriocina sobre la incubación prolongada de los cultivos (Cherif *et al.*, 2003). Este efecto puede ser relacionado con el aspecto específico de los activadores de bacteriocina o a la digestión enzimática; alternatively podría ser atribuida a la nueva adsorción de la bacteriocina en las células productoras (Tagg *et al.*, 1976). La desnaturalización de las bacteriocinas puede ser reducido al mínimo adicionando agentes antiespumantes (Jetten *et al.*, 1972).

**iv) Inducción de la producción de bacteriocina:** De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008) demostraron que *B. thuringiensis* requiere o no estar en contacto con una bacteria indicadora para incrementar la síntesis de bacteriocinas. Sin embargo, el estar en contacto con la bacteria indicadora permite que se origine un aumento en la producción y una disminución en el tiempo de producción máxima. También demostraron que la inducción en la síntesis de las bacteriocinas es ocasionada por proteínas termoresistentes que pueden ser secretadas o bien estar asociadas a la membrana de *B. cereus*.

Los métodos más utilizados para inducir la producción de bacteriocinas es exponer el caldo de cultivo de la cepa productora a la irradiación ultravioleta o con mitomycina C, sin embargo, también se puede aplicar choque térmico o usar peróxido de hidrogeno. La bacteriocina bajo investigación puede responder a uno o a otro método (Tagg *et al.*, 1976).

### **3.1.8 Caracterización de bacteriocinas.**

**1) Determinación de su naturaleza proteica:** Las propiedades fisicoquímicas generalmente son examinadas para proporcionar la información sobre la composición y la estructura de bacteriocinas (Moreyra Dos Santos, 1993). Aunque químicamente

diversas, la propiedad primordial es determinar que la inhibición esté siendo producida por una proteína. Todo método para identificar bacteriocina debe iniciar con la determinación de su sensibilidad a diferentes enzimas como proteinasa K, tripsina, pepsina, etc. El determinar que es de naturaleza proteica nos da la pauta para definir la estrategia de caracterización para el aislamiento e identificación de una bacteriocina. Las bacteriocinas de bajo peso molecular son generalmente más susceptibles a la digestión trypsina; esto puede también servir para diferenciar si la actividad inhibitoria observada es responsabilidad de un bacteriófago o una bacteriocina ya que los bacteriófagos son altamente resistentes a la tripsina (Tagg, 1976).

**2) Estabilidad a diferentes valores de pH y de temperatura:** La estabilidad a diferentes valores de pH y rangos de temperatura son las características fisicoquímicas mayormente utilizadas para realizar comparaciones directas entre bacteriocinas en las que se han apoyado las investigaciones para diferenciar las bacteriocinas reportadas.

La bacteriocina con el mayor rango de estabilidad a los diferentes valores reportada a la fecha es thuricina 17 (Gray *et al.*, 2006), la cual mantiene su estabilidad a un pH de 1.0 a 9.25; le sigue la thuricina 439 (Ahern *et al.*, 2003), con valores de 2.0 a 9.0. En cuanto a la resistencia a los cambios de temperatura, la entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003) se mantiene estable a 121°C, así como también la kurstacina 287, kenyacina 404, entomocina 420 y tolworthicina 524 (Barboza-Corona *et al.*, 2007) (Tabla 2).

**3) Actividad contra *Listeria* sp:** La bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* reportadas a la fecha como anti-*Listeria* son: thurincina H (Lee *et al.*, 2009a); entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003); entomocina 110 (Cherif *et al.*, 2008); thuricina S (Chehimi *et al.*, 2007); thuricina 7 (Cherif *et al.*, 2001).

**4) Actividad Bactericida o bacteriolítica:** el modo de actividad de las bacteriocinas de Bt reportadas a la fecha varían entre sí. Algunas presentan doble actividad tanto bactericida como bacteriolítica dependiendo de la concentración de la bacteriocina probada por ejemplo: entomocina 110 (Cherif *et al.*, 2008) y thuricina 7 (Cherif *et al.*, 2001).

**5) SDS PAGE.** La electroforesis en gel de acrilamida es un método muy utilizado para medir el tamaño de una proteína, por lo general se utiliza buffer Tris-glicina y en algunos casos Tris-tricina, ya que este último es más recomendable para proteínas de

bajo peso molecular como son las bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*.

Además, en la mayoría de los estudios de bacteriocinas, la electroforesis en gel de acrilamida ha sido adaptada para determinar actividad directa, vertiendo un cultivo con la cepa indicadora sobre las proteínas separadas en el gel para identificar cuál de ellas es responsable de la inhibición. Cuando la proteína es muy pequeña y no requiere su estructura cuaternaria para ser activa se puede utilizar un gel desnaturalizante como por ejemplo la thuricina Bn1 (Ugras *et al.*, 2013), identificada en un gel desnaturalizante en buffer Tris-glicina con un tamaño que posteriormente fue confirmado por ESI-TOF-MS en 3.139 kDa. En otros casos como el de entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003), se lleva a cabo una electroforesis con gel nativo para que la proteína no pierda su función y pueda actuar al contacto con la cepa indicadora.

**Tabla 2.** Sensibilidad a cambios de temperatura y valores de pH de las bacteriocinas de

*Bacillus thuringiensis*

BACTERIOCINA	VALORES DE PH	VALORES DE TEMPERATURA	REFERENCIA
Thuricina Bn1	5.0-9.0	70°C	Ugras <i>et al.</i> , 2013
Bacthuricina F103	3.0-10.0	70°C	Kamoun <i>et al.</i> , 2011
Thuricina CD	2.0-9.0	85°C	Rea <i>et al.</i> , 2010
Thurincina H	ND	ND	Lee <i>et al.</i> , 2009a
Entomocina 110	3.0-9.0	121°C	Cherif <i>et al.</i> , 2008
Thuricina S	3.0-10.5	Termoestable	Chehimi <i>et al.</i> , 2007
Morricina 269	5.0-9.0	80°C	Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
Kurstacina 287			
Kenyacina 404	5.0-11.0	121°C	
Entomocina 420			
Tolworthcina 524			
Thuricina 17	1.0 - 9.25	100°C	Gray <i>et al.</i> , 2006
Bacthuricina F4	3.0-7.0	70°C	Kamoun <i>et al.</i> , 2005
Entomocina 9	3.0-9.0	121°C	Cherif <i>et al.</i> , 2003
Thuricina 439	2.0-9.0	80°C	Ahern <i>et al.</i> , 2003
Thuricina 7	3.0-9.0	90-98°C	Cherif <i>et al.</i> , 2001
Tochicina	3.0-9.0	90°C	Paik <i>et al.</i> , 1997
Thuricina	ND	ND	Favret y Younsten 1989

### 3.1.9 Purificación de bacteriocinas.

La temperatura, el pH y los componentes nutritivos del medio juegan un papel crucial en la producción de la bacteriocina, mientras que una cantidad elevada de cloruro de sodio en el medio de cultivo influye significativamente en la disminución de la bacteriocina producida. Esto se explica porque la producción depende del crecimiento y sus características fisiológicas, por consiguiente, depende también de la cinética de los metabolitos primarios (De Vuyst, 1996). Además, su óptima producción se ve influenciada por varios estímulos como son la presencia de las células blanco (inductor susceptible), agotamiento de nutrientes, composición del medio de cultivo, reducción de la velocidad de crecimiento, o también a cambios en las condiciones físicas que pueden afectar el crecimiento como la temperatura, el pH, el estrés óxico o anóxico (Barboza-Corona *et al.*, 2007).

La estabilidad de las muestras con bacteriocinas a menudo presenta una disminución dramática a medida que aumenta la purificación (Tagg *et al.*, 1975). Se ha demostrado que la adición de suero de albumina bovina protege a las bacteriocinas de la inactivación que se presenta durante la purificación (Jetten *et al.*, 1972). La purificación de una bacteriocina inicia a partir de un volumen grande de cultivo de la cepa productora. Los trabajos realizados en bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis*, parten de volúmenes de cultivo de entre 400 ml como mínimo para purificar la bacthuricina F4 (Kamoun *et al.*, 2005) hasta 5 L para la entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003).

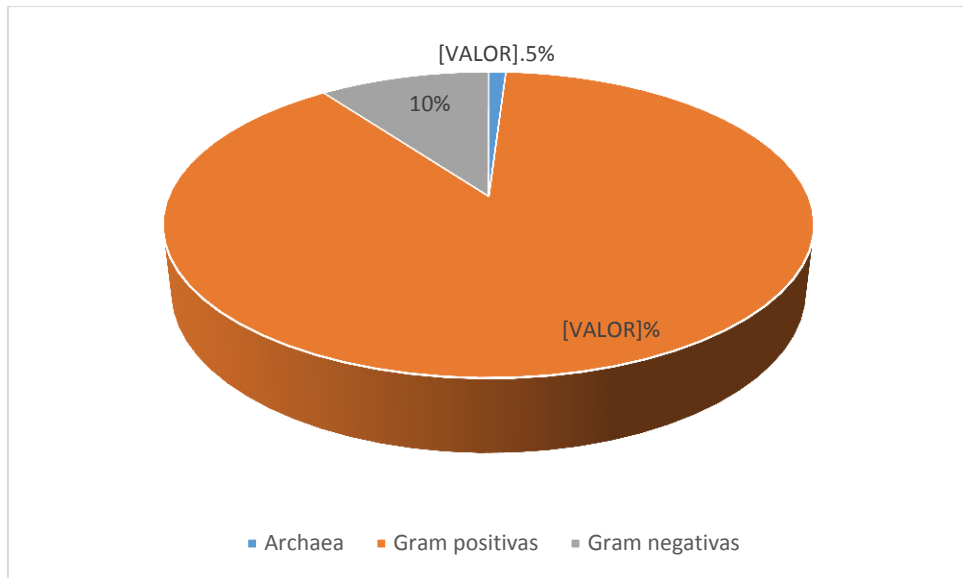
De Vuyst y Leroy en el 2007, reportaron tres métodos principales para la purificación de bacteriocinas. El primero que es el más convencional se basa en una serie de pasos que comprenden una precipitación con sulfato de amonio, intercambio iónico, interacción hidrofóbica, filtración en gel y la cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (Mørtvedt *et al.*, 1991; Parente y Riccardi, 1999). El segundo es un sencillo método que consta de tres pasos (Callewaert *et al.*, 1999), incluyendo precipitación con sulfato de amonio, extracción-precipitación cloroformo/metanol y cromatografía de líquidos de alta presión fase inversa, el único paso cromatográfico involucrado. En el tercer protocolo, las bacteriocinas pueden aislarse mediante una operación única, es decir, adsorción en cama expandida, utilizando un gel de

interacción hidrofóbica, después de maximizar el título de bacteriocina biodisponible a través del ajuste del pH del medio de fermentación crudo (Callewaert y De Vuyst, 1999).

En el caso de las bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis* reportadas, la mayoría de las técnicas aplicadas para purificar utilizan precipitación con Sulfato de Amonio como la tohicina (Paik *et al.*, 1997), thuricina 7 (Cherif *et al.*, 2001), thurincina H (Lee *et al.*, 2009a), thuricina B439 (Ahern *et al.*, 2003), entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003), entomocina 110 (Cherif *et al.*, 2008). Algunos de ellos reportan que después de la precipitación con Sulfato de Amonio la aplicación de filtración en gel con SEFADEX para eliminar el exceso de sal, como en la thuricina B439 (Ahern *et al.*, 2003) y la entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003). Otros utilizan diálisis para eliminar la sal como bacthuricina F4 (Kamoun *et al.*, 2005), thuricina 7 (Cherif *et al.*, 2001), tohicina (Paik *et al.*, 1997), entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003), entomocina 110 (Cherif *et al.*, 2008) y thuricina Bn1 (Urgas *et al.*, 2013). Y finalmente, en su mayoría han sido purificadas aplicando Cromatografía líquida (HPLC) bacthuricina F4 (Kamoun *et al.*, 2005), thurincina H (Lee *et al.*, 2009a), thuricina B439 (Ahern *et al.*, 2003), thuricina 17 (Gray *et al.*, 2006), thuricina Bn1 (Urgas *et al.*, 2013).

### **3.2 Bacterias productoras de bacteriocinas.**

Bacterias productoras de bacteriocinas se encuentran en todos los ambientes. Se cree que > 90% de las bacterias pueden producir, cuando menos, una bacteriocina. Existen casos donde una misma cepa puede producir varias bacteriocinas y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (Gordon y O'Brien, 2006). La mayoría de las bacteriocinas identificadas a la fecha son en su mayoría producidas por bacterias Gram-positivas 88%, seguida de las bacterias Gram-negativas con un 18% y solo 1.5% de las bacteriocinas reportadas son producidas por organismo del dominio Archaea (Fig. 5).



**Figura 5.** Aproximadamente el 88% de las bacteriocinas son producidas por bacterias Gram-positivas.

Estos porcentajes están representados por 31 géneros, de los cuales 22 corresponden a bacterias Gram-positivas dominando las Ácido Lácticas (BAL) como productoras de bacteriocinas (Tabla 3). Bactibase <http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>

**Tabla 3.** Géneros de microorganismos productores de

Bacteriocinas		
Gram-positivas	Gram-negativas	Archaea
<i>Actinoplanes</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Halobacterium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Haloferax</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Klebsiella</i>	
<i>Brochothrix</i>	<i>Myxococcus</i>	
<i>Butyrivibrio</i>	<i>Pseudomonas</i>	
<i>Carnobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>	
<i>Clavibacter</i>	<i>Serratia</i>	
<i>Clostridium</i>		
<i>Enterococcus</i>		
<i>Geobacillus</i>		
<i>Kocuria</i>		
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lactococcus</i>		
<i>Leuconostoc</i>		
<i>Listeria</i>		
<i>Paenibacillus</i>		
<i>Pediococcus</i>		
<i>Propionibacterium</i>		
<i>Ruminococcus</i>		
<i>Staphylococcus</i>		
<i>Streptococcus</i>		
<i>Streptomyces</i>		
<i>Weissella</i>		

La razón por la cual las BAL son las más estudiadas es porque por lo general son consideradas no peligrosas, debido a que están presentes en alimentos y por su contribución como flora saprófita de las superficies mucosas digestivas humanas. Dentro de las BAL, las bacteriocinas más abundantes son las producidas por el género *Lactobacillus*, seguida por *Enterococcus*, aunque la única bacteriocina comercializada y aprobada por la FDA para productos de consumo humano es la nisina producida por *Lactococcus lactis* (Delves-Broughton, 1990). Las bacteriocinas de *Bacillus* son cada vez más importantes debido a su amplio espectro de inhibición; en comparación con la mayoría de las bacteriocinas de las BAL, que pueden incluir bacterias Gram-negativas, hongos y levaduras, además de especies Gram-positivas, algunas de las cuales se sabe que son patógenas para los seres humanos y/o animales.

Por otro lado, del género *Bacillus* en particular *Bacillus thuringiensis* ha despertado gran interés para la búsqueda de bactericidas gracias a la gran diversidad que presentan en sus propiedades fisiológicas, lo cual les permite colonizar una amplia variedad de hábitats ecológicos. Esta capacidad de colonización es debida a la producción de la espora que les confiere resistencia a altas temperaturas, deshidratación, desinfectantes y otros medios de esterilización, característica por la que son consideradas de gran importancia económica en la industria alimenticia (Abriouel *et al.*, 2011).

### **3.3 *Bacillus thuringiensis*.**

A la fecha, existen reportes de algunas caracterizaciones de colecciones con cepas provenientes de Europa, Asia, Nueva Zelanda y los Estados Unidos (Chaufaux *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1989), y solo algunas de Latinoamérica (Bernhard *et al.*, 1997, Bravo *et al.*, 1998), pero la mayoría de ellas solo mencionan parcialmente algún tipo de proteína Cry y su actividad biológica contra un número reducido de insectos, lepidópteros, coleópteros y mosquitos.

La caracterización de colecciones en nuestro continente y específicamente en México es aún limitada. Algunos esfuerzos han sido realizados en la UNAM (Bravo *et al.*, 1998; Cerón *et al.*, 1995) y parcialmente en el CINVESTAV. Sin embargo, estos esfuerzos han sido dirigidos a la caracterización solo de genes *cry* con actividad contra mosquitos con cepas de México, Colombia y Brasil (Ibarra *et al.*, 2003) y algunos otros como los codificantes para bacteriocinas (Barboza-Corona *et al.*, 2007; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008).

El Instituto de Biotecnología de la UANL cuenta con dos colecciones, la internacional con la clave HD (> 1000 cepas), donada por el Dr. H. Dulmage y una más compuesta por cepas nativas (> 300) denominadas IBGM, provenientes de suelos agrícolas, insectos, silos y graneros de los estados de Baja California Sur, Sonora, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas, Veracruz, Michoacán y Quintana Roo, y ha sido parcialmente caracterizada en base al serotipo y toxicidad hacia ciertas plagas de lepidópteros, especialmente contra *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda* y *Spodoptera exigua* (Tamez-Guerra *et al.*, 2004); contra los coleópteros *Tribolium castaneum* y *Orizaephilus surinamensis* (Pereyra-Alfárez *et al.*,



1999) y contra los mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Culex pipiens* (Maldonado-Blanco *et al.*, 2002). Las cepas de esta colección son conservadas por liofilización y como esporas en papel seco.

### **3.3.1 Factores de patogenicidad y virulencia producidos por *B. thuringiensis*.**

Un criterio de agrupación o clasificación de estas cepas, se ha basado en la producción de ciertos tipos de proteínas. Entre estos factores de virulencia se encuentran: fosfolipasas, proteasas, quitinasas,  $\alpha$ -exotoxinas o exotoxinas termolábiles, las  $\beta$ -exotoxinas, las cuales son toxinas que funcionan como análogos de ATP y las proteínas VIP (Vegetative Insecticidal Proteins), que son proteínas insecticidas que se producen en la fase vegetativa del crecimiento y presentan actividad contra lepidópteros, proteínas Cyt con actividad citolítica y contra dípteros y antibióticos con actividad antifúngica (Estruch *et al.*, 1996; Raddadi *et al.*, 2007; Schnepf *et al.*, 1998).

### **3.3.2 Otras proteínas de importancia en el biocontrol.**

Además de las proteínas Cry, *B. thuringiensis* puede sintetizar una gran cantidad de compuestos tóxicos a diversos organismos, entre este tipo de metabolitos sobresalen: Bacteriocinas (Abriouel *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009), lipoproteínas, quitinasas, endo-1,4-beta-glucanasas, proteasas neutras (Liu *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2007), quitinasas, lactonasas, antibióticos, etc. (Zhou *et al.*, 2008; Raddadi *et al.*, 2007).

*Bacillus thuringiensis* se considera el agente de biocontrol más exitoso del mundo. Pertenece a la familia Bacillaceae, presenta células vegetativas en forma de bastón, flageladas, de 1-1.2  $\mu\text{m}$  de ancho y 3-5  $\mu\text{m}$  de largo, agrupadas en cadenas de 2 a 3 células, es Gram-positiva, aerobia estricta y esporógena. Bt produce cuerpos parasporales también denominados  $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry y Cyt, que pueden contener una o varias diferentes proteínas cristal insecticidas tóxicas para insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y a otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios (Feitelson, 1993). Los cristales tienen diferentes formas (bipiramidal, cuboidal, romboide plano, esférica o compuesto de dos tipos de cristal) dependiendo de la composición de las proteínas insecticidas del cristal y la bioactividad contra los insectos blanco.

La clasificación de las sub-especies de Bt se basa en el análisis serológico de los antígenos flagelares —H1. Hasta 1998 se habían descrito 67 sub-especies y 58 serovariedades diferentes (Schnepf *et al.*, 1998).

Además de la producción de cristales insecticidas, *Bacillus thuringiensis* tiene la capacidad de producir una gran cantidad de sustancias antimicrobianas como péptidos y lipopéptidos, entre las que se encuentran alrededor de 18 bacteriocinas, dentro de las cuales se han identificado las de tipo BLIS o sustancias parecidas a bacteriocinas, que muestran actividad contra otras cepas de *Bacillus*, cepas patógenas y hongos fitopatógenos.

### 3.4 Bacteriocinas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis*.

La mayoría de las bacteriocinas de Bt reportadas a la fecha son péptidos catiónicos pequeños, termoestables, muy diferentes a la primera bacteriocina reportada, la colicina. Las colicinas son proteínas generalmente de alto peso molecular (29 a 90kDa) que contienen dominios característicos específicos de unión, translocación, o actividad letal (Van Belkum *et al.*, 1992). Por el contrario, las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas, incluyendo las de Bt, parecen estar formadas inicialmente como pre-péptidos, que se separan posteriormente de un péptido líder para formar la molécula biológicamente activa y son mucho más pequeños, alrededor de 10kDa y menores (Fig. 6). En algunos casos como los lantibióticos (Hamon y Peron, 1963), modificaciones postraduccionales se introducen en la región del pro-péptido de la molécula precursora antes de la escisión del componente líder.

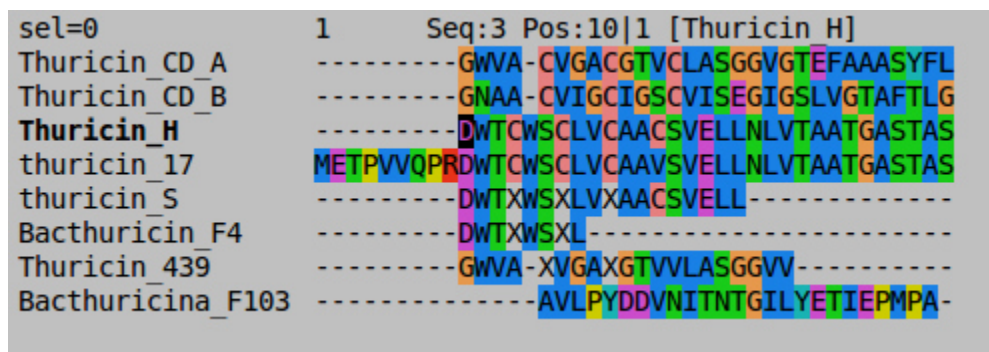


Figura 6. Alineamiento de Secuencia aminoacidica de algunas bacteriocinas de Bt.

En 1989 Favert y Younsten reportaron la detección de un polipéptido sintetizado por una cepa de Bt fue la primera bacteriocina de Bt reportada y la nombraron thuricina. Desde entonces a la fecha, se han reportado 18 bacteriocinas sintetizadas por diferentes cepas de Bt entre ellas se incluyen cinco sustancias inhibitorias semejantes a bacteriocinas conocidas como BLIS (Bacteriocin Like Inhibitory Substance) (Barboza-Corona *et al.*, 2007) (Tabla 2).

#### **3.4.1 Nomenclatura de las bacteriocinas de *B. thuringiensis*.**

Las bacteriocinas de esta especie son conocidas como thuricinas, tochicinas, bacthuricinas o entomocinas, nombradas así en base a la especie o a la subespecie que las produce, tal es el caso de thuricina de *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD2 (Favret y Younsten, 1989), thuricin 439, *B. thuringiensis* B439 (Ahern *et al.*, 2003), thuricin S de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD198 (Chehimi *et al.*, 2007), 17 de thuricin *B. thuringiensis* NEB17 (Gray *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009), thurincin H de *B. thuringiensis* SF361 (Lee *et al.*, 2009a), thuricin CD producida por *B. thuringiensis* (Rea *et al.*, 2010), nombradas así por la especie que las produce. En el caso de las llamadas BLIS reportadas por Barboza-Corona *et al.*, (2007), estas fueron nombradas en base a la subespecie: morricina 269 de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269), krustacina 287 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287), kenyacina 404 de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404), entomocina 420 de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (LBIT 420), tolworthicina 524 *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (LBIT 524). Tochicin de *B. thuringiensis* subsp. *tochigiensis* HD868 (Paik *et al.*, 1997); bacthuricin F4 producido por *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* BUPM4 (Kamoun *et al.*, 2005), thuricin 7 producido por *B. thuringiensis* BMG1.7 (Cherif *et al.*, 2001), entomocina 9 de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9 (Cherif *et al.*, 2003) o entomocina 110 producida por *B. thuringiensis* HD110 (Cherif *et al.*, 2008).

#### **3.4.2 Clasificación de las bacteriocinas de *B. thuringiensis*.**

A la fecha no se ha definido una clasificación para bacteriocinas de Bt. La clasificación más utilizada es la basada en las Bacterias Acido Lácticas propuesta por (Klaenhammer 1993) y (Jack *et al.*, 1995), que ha sido modificada por otros investigadores como (Chen

y Hoover 2003). Otra propuesta es la de las bacteriocinas entomocinas presentada por (Franz *et al.*, 2007). Estas clasificaciones consideran 4 grupos.

Clase I: (Lantibióticos) Este grupo contienen aminoácidos inusuales como lantionina y b-methylantionina, son termoresistentes y < de 5 kDa. Clase II: (Nolantibióticos) Peptidos pequeños, de > 5 kDa, termoestables, incluyen péptidos con actividad contra *Listeria* (cystibioticos), péptidos thiol-activados (thiolbioticos) y complejos de dos péptidos. Clase III: Péptidos grandes termolábiles, de < 30 kDa. Clase IV: Complejos de bacteriocinas asociados a otras moléculas químicas.

### **3.4.3 Características de las bacteriocinas de *B. thuringiensis*.**

De estas clasificaciones mencionadas en el párrafo anterior resultan poco adaptables a las bacteriocinas de Bt, es por eso que en términos de peso molecular, organizamos las bacteriocinas de Bt, en los grupos A y B. El grupo A se compone de bacteriocinas que pesan menos de 5 kDa y el grupo B, de las que pesan más de 5 kDa. Sin embargo, desde un punto de vista funcional, en el grupo A, podemos encontrar dos tipos: I) de un péptido y II) que se componen de dos péptidos. Casi todos ellos pertenecen al tipo I y sólo thuricin CD y thuricin 439 pertenecen al tipo II (Tabla 1). Otro aspecto importante de las bacteriocinas de Bt es que la subsp. serológica. *entomocidus* producen 3 péptidos diferentes, thuricin S, entomocin 110 y entomocin 9 (Tabla 1). Por otro lado, el mismo péptido puede ser producido por diferentes subespecies tal es el caso de thuricin S, que es producida por la subsp serológica. *entomocidus* y subsp. *tolworthi* (Tabla 4).

**Tabla 4.** Bacteriocinas sintetizadas por *Bacillus thuringiensis* y su cepa productora.

Tipo	Bacteriocina	Masa Molecular (kDa)	Cepa Productora (Subsp)	Referencia
AI	Thuricina	0.950	HD2 ( <i>thuringiensis</i> )	Favret y Younsten, 1989
	Thuricina S	3.137	HD198 ( <i>entomocidus</i> )	Chehimi <i>et al.</i> , 2007
			HD9 ( <i>entomocidus</i> )	Chehimi <i>et al.</i> , 2012
			HD110 ( <i>entomocidus</i> )	
			HD125 ( <i>tolworthi</i> )	
	Thuricina Bn1	3.139	Bn1 ( <i>kurstaki</i> )	Ugras <i>et al.</i> , 2013
	Thurincina H	3.140	SF361	Lee <i>et al.</i> , 2009a
Bacthuricina F4	3.160	BUPM4 ( <i>kurstaki</i> )	Kamoun <i>et al.</i> , 2005	
Thuricina 17	3.172	Bt non- <i>Bradyrhizobium</i>	Gray <i>et al.</i> , 2006	
Entomocina 110	4.800	HD110 ( <i>entomocidus</i> )	Cherif <i>et al.</i> , 2008	
AII	Thuricina CD	Trn- $\alpha$ 2.760	DPC 6431	Rea <i>et al.</i> , 2010
		Trn- $\beta$ 2.860		
	Thuricina 439	(A) 2.919	B439	Ahern <i>et al.</i> , 2003
		(B) 2.803		
BI	Morricina 269	~10.000	LBIT 269 ( <i>morrisoni</i> )	Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Kurstacina 287	~10.000	LBIT 287 ( <i>kurstaki</i> )	Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Kenyacina 404	~10.000	LBIT 404 ( <i>kenyae</i> )	Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Entomocina 420	~10.000	LBIT 420 ( <i>entomocidus</i> )	Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Tolworthcina 524	~10.000	LBIT 524 ( <i>tolworthi</i> )	Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Tochicina	10.500	HD868 ( <i>tochigiensis</i> )	Paik <i>et al.</i> , 1997
	Bacthuricina F103	~11.000	BUMP103	Kamoun <i>et al.</i> , 2011
	Thuricina 7	11.600	BMG1.7	Cherif <i>et al.</i> , 2001
	Entomocina 9	12.400	HD9 ( <i>entomocidus</i> )	Cherif <i>et al.</i> , 2003

**Grupo AI:** La thuricina HD-2 es producida por *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD2. La producción de esta bacteriocina es codificada en el plásmido (Favret y Younsten, 1989). En su estado nativo la thuricina HD2 muestra un peso molecular 950 000 Da. Esta thuricina es susceptible a las enzimas proteolíticas (quimotripsina, pronasa y tripsina) y presenta actividad antimicrobiana contra cepas de *B. thuringiensis* y algunas otras especies Gram-positivas (*B. cereus*, *B. megaterium*, *P. polymyxa*, *B. sphaericus*, *C. xerosis*, *S. aureus* y *S. epidermidis*).

*Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD198, fue reportado como productor de thuricina S (Chehimi *et al.*, 2007). En 2012 Chemini y colaboradores, encontraron que

*Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110 y *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD125, también producen la thuricina S. Esta thuricina tiene actividad contra *Listeria monocytogenes* y otras bacterias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Pediococcus acidolactic*, *Streptococcus thermophilus*. Además inhibe el crecimiento de la bacteria Gram-negativa *Enterococcus cloacae* (Chehimi *et al.*, 2012).

La thuricina Bn1 es producida por *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bn1, tiene actividad contra otras cepas de *B. thuringiensis* además de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como también bacterias patógenas de plantas; esto le confiere una actividad bifuncional en agricultura a través del cristal tóxico contra insectos y la actividad de la bacteriocina contra bacterias patógenas (Ugras *et al.*, 2013).

La thurincina H producida por *B. thuringiensis* SF361 es una de las pocas bacteriocinas producidas por esta especie que ha sido caracterizada genéticamente. Es codificada en el cromosoma a diferencia de la thuricina producida por la cepa HD2 que es codificada en el plásmido. La thurincina H está conformada por tres genes estructurales encontrados en repeticiones en tándem *thnA1*, *thnA2* y *thnA3*. Esta bacteriocina tiene actividad contra Gram-positivas (Lee *et al.*, 2009a).

La bacthuricina F4 fue aislada de la cepa BUPM4 *B. thuringiensis* subsp *kurstaki*, tiene actividad contra Gram-positivas y una leve actividad contra algunas Gram-negativas. Es estable a pH bajos (Kamoun *et al.*, 2005).

La thuricina 17 producida por la bacteria endofítica *Bacillus thuringiensis* non-*Bradyrhizobium* inductora de crecimiento de plantas inhibe el crecimiento de Gram-positivas y *E. coli* MM274 de las Gram-negativas (Gray *et al.*, 2006).

La cepa *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110 produce la entomocina 110, tiene actividad contra bacterias Gram-positivas incluyendo *L. monocytogenes*, *Paenibacillus larvae* y otras especies de *Bacillus*. Esta bacteriocina presenta estabilidad a temperaturas de esterilización de hasta 121°C y es resistente a cambios de pH y solventes orgánicos (Cherif *et al.*, 2008).

**Grupo AII:** Turicina CD es producida por *B. thuringiensis* DPC 6431, cepa aislada de una muestra de heces humanas, fue patentada específicamente contra *C. difficile* (Rea *et*

*al.*, 2010). Es un dímero de dos péptidos Trn- $\alpha$  y Trn- $\beta$ , con masas moleculares de 2763 y 2861 Da, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos de thuricin  $\alpha$  y  $\beta$  fueron publicados (Rea *et al.*, 2010), e indican que esta es una nueva bacteriocina, no lantibiótica, de dos péptidos modificada transduccionalmente. Además, la subunidad Trn- $\beta$  es similar a la thuricin 439 que consta de 2 péptidos (Ahern *et al.*, 2003; Rea *et al.*, 2010). Esta thuricina es sensible a enzimas proteolíticas, es estable al calor y conserva su actividad inhibitoria sobre un amplio rango de pH. Thuricin CD exhibe un estrecho espectro de actividad, específicamente inhibe *C. difficile* y algunos *Bacillus spp.* (Rea *et al.*, 2010). Thuricin CD ha sido autorizada por el Centro Pharmabiotic Alimentaria (APC) a una compañía de biotecnología de Irlanda, es decir Alimentaria Salud Ltd., en septiembre de 2009 para su uso contra *C. difficile* asociada a diarrea. (<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2009068656>).

La cepa *B. thuringiensis* B439 produce una BLIS, exhibe un aparente estrecho espectro de inhibición específicamente inhibe a cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus*, así como también *L. innocua* 4202. Esta bacteriocina está compuesta por 2 subunidades que tienen idénticas secuencias N-terminal, pero diferente masa molecular (Ahern *et al.*, 2003).

**Grupo BI:** La tochicina producida por *B. thuringiensis* subsp *tochigiensis* HD868 (Paik *et al.*, 1997) muestra un espectro de actividad antibacteriano estrecho contra la mayoría de las cepas de *B. thuringiensis* y en contra de una cepa de *B. cereus*. Esta bacteriocina es susceptible a la proteinasa K, es muy estable pH (pH 3,0 a 9,0) y es relativamente estable al calor en 90°C, pierde completamente la actividad a 100 °C durante 30 min. (Paik *et al.*, 1997) (Tabla 5).

Bacthuricina F103 es producida por *B. thuringiensis* BUMP103 exhibe una potente actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Agrobacterium tumefaciens* una plaga del tomate (Kamoun *et al.*, 2011).

Thuricin 7 producida *B. thuringiensis* BMG1.7 aislada de suelo (Cherif *et al.*, 2001) es activa contra varias especies del género *Bacillus*, incluyendo tres conocidas como productoras de bacteriocinas (*B. thuringiensis* HD2 y HD868, y *B. cereus* Ac7), así como frente a *S. pyogenes* y *L. monocytogenes*. El espectro antimicrobiano es similar a la cereína 7, pero exhibe una gama más amplia de la actividad que otras thuricinas y

toxicinas. Thuricin 7 es susceptible sólo para proteinasa K, estable en un intervalo de pH de 3-9, y relativamente resistente al calor, reteniendo su actividad en un 55% de la actividad después de incubar a 98°C durante 30 min. Sin embargo, es completamente inactivado por calentamiento a 121°C durante 20 min (Cherif *et al.*, 2001), (Tabla 5).

La cepa *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9 produce la entomocina 9 la cual presenta actividad contra cepas Gram-positivas entre ellas *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y varios hongos. La entomocina 9 retiene más del 72% de actividad después de 20 min a 121°C, pierde su actividad al ser tratada con proteinasa K y se mantiene estable a cambios de pH de 3.0-9.0 y a la liofilización (Tabla 5). La ausencia de toxicidad frente a células Vero sugiere la idoneidad de la cepa HD9 para ser aplicada de forma segura en tratamientos antimicrobianos (Cherif *et al.*, 2003).

En este Grupo BI se reportan BLIS, éstas son: Morricin 269 producida por *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (LBIT 269), kurstacin 287 producida por *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (LBIT 287), kenyacin 404 producida por *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (LBIT 404), entomocin 420 producido por *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (LBIT 420) y tolworthcin 524 producida por *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (LBIT 524) son producidas por los aislamientos mexicanos de *B. thuringiensis* (Barboza-Corona *et al.*, 2007; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008). Los experimentos llevados a cabo con la proteína parcialmente purificada indican que estas BLIS forman dos grupos homogéneos de acuerdo a la estabilidad de calor y al espectro antimicrobiano. Morricin 269 y kurstacin 287 son termotolerantes (siendo estable hasta 80°C), mientras que el resto fueron termoresistente (siendo estable hasta 120°C) (Tabla 5). Las cepas del mismo grupo mostraron inmunidad cruzada, mientras que cepas de diferentes grupos presentaron sensibilidad cruzada. Un espectro más amplio de inhibición fue identificado incluyendo la inhibición de *B. subtilis*, *L. innocua* y *E. faecalis*, para krustacina 287 kenyacina 404 entomocina 420, tolworcina 524. Todos estas BLIS fueron activas contra cepas de *B. cereus* y *Vibrio cholerae* (Barboza-Corona *et al.*, 2007). Posteriormente, se reportó que las preparaciones BLIS en crudo tenían espectros inhibitorios más amplios, incluyendo especies de *Bacillus*, *L. innocua*, *E. faecium*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *S. pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. flexneri*,



*Salmonella* y *E. coli*, así como la actividad antifúngica contra *Trichoderma sp.* (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008).

**Tabla 5.** Características fisicoquímicas de bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*.

TIPO	BACTERIOCINA	pH	TEMPERATURA	CON ACTIVIDAD CONTRA <i>Listeria monocytogenes</i>	REFERENCIA
AI	Thuricina	ND	ND	*	Favret y Younsten, 1989
	Thuricina S	3.0-10.5	Termoestable	*	Chehimi <i>et al.</i> , 2007
	Thuricina Bn1	5.0-9.0	70°C		Ugras <i>et al.</i> , 2013
	Thurincina H	ND	ND	*	Lee <i>et al.</i> , 2009a
	Bacthuricina F4	3.0-7.0	70°C		Kamoun <i>et al.</i> , 2005
	Thuricina 17	1.0 - 9.25	100°C		Gray <i>et al.</i> , 2006
	Entomocina 110	3.0-9.0	121°C	*	Cherif <i>et al.</i> , 2008
A II	Thuricina CD	2.0-9.0	85°C	*	Rea <i>et al.</i> , 2010
	Thuricina 439	2.0-9.0	80°C		Ahern <i>et al.</i> , 2003
BI	Morricina 269	5.0-9.0	80°C		Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Kurstacina 287	5.0-11.0	121°C		Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Kenyacina 404				Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Entomocina 420				Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Tolworthcina 524				Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
	Tochicina			3.0-9.0	90°C
	Bacthuricina F103	3.0-10.0	70°C	*	Kamoun <i>et al.</i> , 2011
	Thuricina 7	3.0-9.0	90-98°C	*	Cherif <i>et al.</i> , 2001
	Entomocina 9	3.0-9.0	121°C	*	Cherif <i>et al.</i> , 2003

#### 3.4.4 Aplicaciones potenciales de bacteriocinas de *B. thuringiensis*.

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos producidos por algunas bacterias que poseen actividad antimicrobiana, letal o inhibidora frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con los que las producen. Su naturaleza química permite que puedan ser consideradas como conservadores naturales (Ahern *et al.*, 2003). En cuanto a su aplicación, en el área de salud se ha despertado un interés creciente para considerar a las bacteriocinas como una alternativa antimicrobiana para el tratamiento de infecciones

humanas y posiblemente animal que, por desarrollar resistencia a los antibióticos tradicionales, se han convertido en un problema grave de salud (Vasily *et al.*, 2007).

En los últimos años ha surgido interés por el descubrimiento de nuevos tratamientos que incluyen el uso de microorganismos como productos naturales. *Bacillus thuringiensis* es considerado un modelo de investigación por su capacidad para sintetizar bacteriocinas, además de sus antecedentes de aplicación segura en control biológico de plagas de cultivos para consumo humano y animal. En 1989, Favert y Younsten reportaron la detección de un polipéptido sintetizado por una cepa de *B. thuringiensis* y la nombraron thuricina. Desde esa fecha hasta nuestros días se han reportado 18 bacteriocinas sintetizadas por diferentes subespecies de Bt (Tabla 4), y que presentan actividad inhibitoria contra diversas bacterias Gram-positivas (Tabla 6), Gram-negativas (Tabla 7) y algunos hongos (Tabla 8).

**Tabla 6.** Bacteriocinas con actividad biológica contra Gram-positivas.

Bacteriocina	Cepa sensible	Referencia
Thuricina	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. epidermidis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Favret and Younsten, 1989
Thuricina S	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Bt</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Pediococcus acidolacticis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ,	Chehimi <i>et al.</i> , 2007
Thuricina Bn1	<i>B. cereus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. monocytogenes</i> ,	Ugras <i>et al.</i> , 2013
Thuricina H	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Carnobacterium psicola</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Lee <i>et al.</i> , 2009a
Bacthuricina F4	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Brevibacterium flavum</i> ,	Kamoun <i>et al.</i> , 2005
Thuricina 17	<i>B. cereus</i>	Gray <i>et al.</i> , 2006
Entomocina 110	<i>B. cereus</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus pseudomycooides</i> , <i>Lactococcus lactics</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Paenibacillus larvae</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i> .	Cherif <i>et al.</i> , 2008
Tochicina	<i>B. cereus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	Paik <i>et al.</i> , 1997
Bacthuricina F103	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>L. monocytogenes</i> ,	Kamoun <i>et al.</i> , 2011
Thuricina 7	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus pseudomycooides</i> <i>B. mycoides</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>L.monocytogenes</i> , <i>B. weihenstephanensis</i> .	Cherif <i>et al.</i> , 2001
Entomocina 9	<i>B. cereus</i> , <i>B. pseudomycooides</i> , <i>B. mycooides</i> , <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Lactococcus lactics</i> , <i>L. monocytogenes</i> ,	Cherif <i>et al.</i> , 2003
Morricina 269 Kurstacina 287 Kenyacina 404 Entomocina 420 Tolworthcina 524	<i>B. cereus</i> , <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>Str. pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007
Thuricina CD	<i>B. cereus</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. mycooides</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>C. tyrubutiricum</i> , <i>C. lithusebureense</i> , <i>C. indolis</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> <i>L. fermentum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Rea <i>et al.</i> , 2010
Thuricina 439	<i>B. cereus</i> , <i>L. innocua</i> 4202	Ahern <i>et al.</i> , 2003

**Tabla 7.** Bacteriocinas con actividad biológica contra Gram-negativas

Bacteriocina	Cepa sensible	Referencia
Thuricina S	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomona srynigae</i> , <i>Salmonella enterica</i> ser. <i>Cholerae</i> .	Chehimi <i>et al.</i> , 2007
Thuricina Bn1	<i>Paucimonas lemoignei</i> , <i>Pseudomonas savastanoi</i> .	Ugras <i>et al.</i> , 2013
Bacthuricina F4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kamoun <i>et al.</i> , 2005
Thuricina 17	<i>E. coli</i> MM294.	Gray <i>et al.</i> , 2006
Entomocina 110	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cherif <i>et al.</i> , 2008
Bacthuricina F103	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Kamoun <i>et al.</i> , 2011
Entomocina 9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cherif <i>et al.</i> , 2003
Morricina 269 Kurstacina 287 Kenyacina 404 Entomocina 420 Tolworthcina 524	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> .	Barboza-Corona <i>et al.</i> , 2007

**Tabla 8.** Bacteriocinas con actividad biológica contra Hongos.

Bacteriocina	Cepa sensible	Referencia
Entomocina 9	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Fusarium gramineis</i>	Cherif <i>et al.</i> , 2003
Morricina 269 Kurstacina 287 Kenyacina 404 Entomocina 420 Tolworthcina 524	<i>Rizophus sp.</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Mucor rouxii</i> IM80, <i>Trichoderma sp.</i> SH1, <i>Trichoderma sp.</i> SD3.	De la Fuente-Salcido <i>et al.</i> , 2008

En el contexto de bacteriocinas como una alternativa adecuada a los antibióticos contra agentes patógenos resistentes a múltiples fármacos, junto con una continua necesidad urgente para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, bacteriocinas representan una fuente inagotable prometedora de nuevos antibióticos (Al-Mahrous *et al.*, 2010; Gauri *et al.*, 2011). Por otra parte, *B. thuringiensis* podría ser utilizado como una fuente de bacteriocinas activas contra la especie psicrotolerantes estrechamente relacionadas de *B. cereus* (Bc) y *B. weihenstephanensis*, que son perjudiciales para los productos alimenticios (Cherif *et al.*, 2001) y patógenos de plantas. Gray *et al.*, (2004) reporta la thuticnina 17 como inductor de crecimiento de planta de frijol de soya. Esta bacteriocina fue aislada de *B. thuringiensis* NEB17 que es una rizobacteria que promueven crecimiento vegetal (PGPR) incluyen bacterias en el suelo cerca de las raíces de las plantas, sobre la superficie de los sistemas de raíces

de las plantas, en los espacios entre células de la raíz o dentro de las células especializadas de nódulos de las raíces.

Con el aumento en la resistencia a los antibióticos entre patógenos y el aumento de las infecciones adquiridas en el hospital como *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) y *Clostridium difficile*, existe una necesidad apremiante de encontrar nuevos compuestos antimicrobianos para combatir estas enfermedades (Rea *et al.*, 2010). *C. difficile* fue reconocido como causante agente de diarrea nosocomial en la década de 1970 (George *et al.*, 1978), ahora es recurrente, y los casos de enfermedad asociada a *Clostridium difficile* (CDAD) están aumentando tanto en número como en gravedad en muchas partes del mundo. Ramírez-Rosales y Cantú-Llanos (2012), reportaron que el 9.1% de pacientes internados en un hospital de México fallecieron por diarrea provocada por *Clostridium difficile*. La thuricina CD es producida por *Bacillus thuringiensis* DPC 6431, fue aislada de una muestra fecal humana y se compone de dos péptidos distintos, Trn- $\alpha$  y  $\beta$ -Trn, que actúan de forma sinérgica para matar una amplia gama de aislados clínicos de *C. difficile*, incluyendo ribotipos comúnmente asociado con CDAD por ejemplo, ribotipo 027 (Ramírez-Rosales y Cantú-Llanos, 2012). De la Fuente-Salcido *et al.*, (2008) encontraron que las bacteriocinas (morricina 269, kurstacina 287, kenyacina 404, entomocina 420 y tolworthcina 524) producidas por cepas mexicanas de *B. thuringiensis* tienen actividad contra diversas bacterias de importancia en alimentos tales como *B. cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Enterobacter cloacae* y *Vibrio cholerae*, entre otras. Estas mismas bacteriocinas fueron probadas en el control de mastitis (Barboza-Corona *et al.*, 2009); thurincina H (Lee *et al.*, 2009a), turicina S (Chehimi *et al.*, 2007), entomocina 110 (Cherif *et al.*, 2008), entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003) y turicina 7 (Cherif *et al.*, 2001) pueden ser usadas para el control de *Listeria monocytogenes* en la contaminación de alimentos. *Bacillus thuringiensis* es una bacteria que ha sido muy utilizada en agricultura para el control de plagas agrícolas demostrando un excelente biocontrol gracias a la producción de su cristal tóxico. Los años de aplicación han hecho que Bt sea considerada una tecnología segura. La producción de bacteriocinas representa una tecnología prometedora ya que un mismo producto a base de *Bacillus thuringiensis* puede poseer las dos funciones: control de plagas y control de bacterias.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El problema de la creciente contaminación por hongos y bacterias con altos niveles de resistencia múltiple a antibióticos tanto en hospitales como en la industria alimentaria representa un grave problema y enorme reto para la biotecnología.

En el área de quirófanos y unidades de cuidados intensivos, la diseminación de las bacterias multiresistentes como son: *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *P. aeruginosa*, *Enterococcus sp.*, por mencionar solo algunas, representa el alza de costos hospitalarios y un incremento significativo en la morbimortalidad (Siegel *et al.* 2006, Abriouel *et al.* 2011). La resistencia múltiple es generada, entre otras cosas, por el uso excesivo e irresponsable de antibióticos. En países como Estados Unidos se han establecido programas enfocados a la lucha contra la resistencia bacteriana como un problema de importancia prioritaria (Siegel *et al.* 2006), por lo que la búsqueda de alternativas de sustancias naturales que sirvan como inhibidores de este tipo de patógenos y deteriorantes de los alimentos, es un campo con gran futuro.

Tradicionalmente, las bacterias ácido lácticas (BAL) emergen como las de mayor producción de bacteriocinas con actividad antimicrobiana. Sin embargo, es bien conocido que miembros del género *Bacillus*, son microorganismos que producen una enorme cantidad de metabolitos con actividad biocida. Entre ellos sobresale *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria sintetiza las proteínas Cry, Cyt y Vip usadas con gran éxito en el control biológico de insectos plaga y parasporinas (PS), proteínas con actividad lítica contra células tumorales. Recientemente, algunos grupos de investigación han encontrado cepas de *B. thuringiensis* que sintetizan bacteriocinas, proteínas con actividad biológica contra bacterias y hongos.

Este hecho ha atraído una especial atención, sobre todo debido a su posible aplicación como bioconservadores naturales de alimentos, como una alternativa al uso de los químicos disponibles y/o para el control de plagas bacterianas y la conservación del grano en la agricultura (Kamoun *et al.* 2011). De hecho, aunque los datos sobre su

toxicidad son muy escasos, la investigación y su uso intencional de largo plazo sugieren fuertemente que pueden usarse de manera segura (Cherif *et al.* 2001).

El Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas/UANL, cuenta con una de las colecciones de *B. thuringiensis* más ricas y variadas del mundo. Esta colección, por lo tanto, representa una riqueza importante para la búsqueda de bacteriocinas con actividad biológica contra dos de los microorganismos de mayor importancia en salud humana como son *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

En este trabajo se investigamos 48 cepas de la colección GM con el fin de detectar bacteriocinas con acción antimicrobiana y puedan ser propuestas como posible solución al problema de la resistencia de bacterias patógenas.

## **5. HIPÓTESIS**

Las cepas de la colección de *Bacillus thuringiensis* producen bacteriocinas actividad biocida contra bacterias de importancia médica e industria alimentaria.



## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Detectar y caracterizar bacteriocinas con actividad biológica contra bacterias de importancia en salud humana.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Detectar bacteriocinas en cepas de *B. thuringiensis* de la clave GM
2. Desarrollar un sistema de bioensayos para evaluar la actividad biocida
3. Determinar el espectro de acción de las bacteriocinas contra Gram positivas y Gram negativas
4. Probar las bacteriocinas contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y contra *L. monocytogenes*
5. Caracterizar la bacteriocina de mayor actividad biológica

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Material biológico.

Cuarenta y ocho cepas de *Bacillus thuringiensis*, fueron evaluadas como productores de bacteriocinas (Tabla 9). Como cepas indicadoras usamos *B. thuringiensis* HD1, HD73 (Kamoun *et al.*, 2004; Cherif *et al.*, 2003; Paik *et al.*, 1997), y la cepa GM10 perteneciente a la colección bajo estudio. Todas las cepas de *B. thuringiensis* fueron proporcionadas por el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Otras cepas usadas como potenciales blanco de bacteriocinas fueron: Gram-negativas: *Salmonella typhi*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella arizonae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* y las Gram positivas: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Listeria monocytogenes*. El control positivo fue conformado por tres cepas de *B. thuringiensis*: HD868 (subsp. *tochigiensis*) productora de tochicina (Paik *et al.*, 1997); HD9 (subsp. *entomocidus*) productora de entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003) y HD1 (subsp. *thuringiensis*) productora de thuricina (Favret y Younsten, 1989).

### 7.2 Activación de las cepas de la colección.

Las cepas fueron inoculadas en Agar Nutritivo (AN) e incubadas 72 h a 30°C. Una vez demostrado la presencia del cristal típico, cada colonia, por separado, fue inoculada en Caldo Nutritivo (CN) durante la noche a 30°C. Añadimos 1 mL glicerol al 40% con 1 mL del cultivo concentrado quedando a una concentración final del 20%. Las cepas fueron mantenidas a -20°C hasta su uso. Las cepas de *B. thuringiensis* fueron sembradas cajas Petri con AN e incubadas 72 h a 30°C y, posteriormente, inoculadas en tubos con 3 mL de CN e incubados a 30°C 14-16 h en agitación constante. El cultivo fue centrifugado y 2 mL del sobrenadante decantados y concentrados hasta 1 mL.

### 7.3 Detección de actividad antimicrobiana.

#### 7.3.1 Cultivo (producción de masa celular).

Matraces Erlenmeyer de 250 mL con de 45 mL de Caldo Soya Tripticasa (CST) fueron inoculados con 5 mL de un cultivo de toda la noche e incubados 12 h en agitación constante (180 rpm) a 30°C. Las células fueron separadas por centrifugación y el sobrenadante pasado por membranas de 0.45µm (MF Millipore membrane). Este filtrado fue usado para verificar la presencia de bacteriocinas en los bioensayos con las cepas indicadoras de Bt.

#### 7.3.2 Detección de actividad microbiana.

La actividad de las potenciales bacteriocinas fue evaluada por el método de difusión en pozo (Jack *et al.*, 1995). Para este ensayo usamos Bt HD1, HD73 y GM10 como indicadoras. **Preparación de las cepas indicadoras:** Las cepas fueron cultivadas en 5 mL de CN, 12 h a 30°C y 180 rpm, luego fueron transferidas a matraz con 45 mL de CST e incubadas a 30°C por 8 h en agitación constante a 180 rpm. De este cultivo se tomaron 200 µl para inocularse en 6 mL de Agar Soya Tripticasa (AST) suave (0.7 %) fundido a 45°C el cual fue vertido sobre una caja Petri que contenía 15 mL de AN. Una vez solidificado el agar suave, realizamos perforaciones (6 pozos de 8 mm de diámetro) con un arreglo de 5 en la periferia y 1 en el centro de la caja; las cajas fueron incubadas 2 h a 37°C (De la Fuente-Salcido, 2009). Posteriormente, colocamos 200 µl de los sobrenadantes concentrados de cada una de las 48 cepas con posibilidad de producir bacteriocinas. El pozo central fue para agua estéril. Las cajas fueron incubadas por 12-24 h a 30°C, hasta la aparición de los halos inhibición, los cuales fueron medidos (mm) con un vernier.

Este procedimiento utilizado para probar las cepas testigo, también fue usado para medir la sensibilidad de bacterias Gram negativas (*Salmonella typhi*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella arizonae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*) y Gram positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Listeria*

*monocytogenes*), contra los extractos de proteínas precipitadas de las 48 cepas de la colección solo que en este caso las bacterias fueron inoculadas en medios específicos e incubadas a 37°C por 24 h hasta observar inhibición.

### **7.3.3 Precipitación de proteínas.**

Las cepas con actividad antimicrobiana, fueron sometidas a otra ronda de crecimiento como se mencionó en la sección anterior. El sobrenadante de los 50 ml, fue precipitado con sulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] al 80% de saturación (28 g), manteniendo a temperatura ambiente (~ 17 a 20°C). El precipitado fue colocado toda la noche a 4°C, centrifugado a 4°C durante 30 min a 10 000 g. El precipitado fue resuspendido en 2 mL agua Mili Q estéril y conservado a 4°C hasta su uso. La concentración de proteína fue medida por el método de Bradford (1954). La presencia de bacteriocinas fue demostrada en cada paso de purificación mediante los bioensayos mencionados en la sección 7.3.2.

### **7.3.4 Confirmación de la prueba de actividad de la bacteriocina precipitada.**

Con el fin de descartar que la actividad inhibitoria fuera debido a (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizado para la precipitación de las proteínas, la conductividad de la muestra L4-2 precipitada fue determinada en un valor de 390 μS/cm; soluciones de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y cloruro de sodio (NaCl) fueron igualadas a 390 μS/cm de conductividad y probadas contra diferentes concentraciones de proteínas precipitadas utilizando GM10 como indicador.

## **7.4 Separación de proteínas en Geles de Acrilamida.**

Los extractos de proteínas que presentaron actividad antimicrobiana fueron corridos en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y nativas (sin β-mercaptoetanol) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Los geles fueron cargados con 20 μl de muestra y 10μl de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375). La electroforesis se llevó a cabo inicialmente a 80V y después a 120V durante 30 min y 5 h respectivamente.

Los geles fueron tiñidos con azul de Coomassie R-250 (2%, Azul Brillante Coomassie R-250, 250 mL metanol, 50 mL ácido acético glacial, aforado a 500 mL con agua destilada estéril) por 2 h en agitación continua y desteñido con 250 mL metanol, 50 mL ácido acético glacial, aforado a 500 mL con agua destilada estéril hasta visualizar las bandas.

### **7.5 Selección de la cepa productora para caracterizar y purificar una bacteriocina.**

Los resultados de los bioensayos fueron registrados y de acuerdo a su espectro de actividad biológica, las cepas fueron agrupadas en diferentes conjuntos. El dendrograma nos permitió seleccionar la cepa con el mejor desempeño de actividad inhibitoria, para continuar con la optimización del protocolo de obtención, caracterización y purificación de una bacteriocina. De esta manera, seleccionamos a la cepa L4-2 para posteriores procesos de caracterización.

### **7.6 Síntesis y caracterización de bacteriocina.**

#### **7.6.1 Obtención de bacteriocina L4-2 Parcialmente Purificada (PP)**

La cepa L4-2 evaluada nuevamente bajo las condiciones mencionadas en la secciones 7.3.1 y 7.3.3. Posterior a la precipitación, el precipitado fue resuspendido en 3 mL de agua mili Q y dializado con Kit Mega Dialysis de SIGMA-ALDRICH con un poro de 1000 Da. La actividad de la PP fue probada contra *B. thuringiensis* HD1, HD73, GM10, *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Las cepas HD868 productora de tochicina, HD9 productora de entomocina 9 y HD1 productora de thuricina fueron incluidas como controles positivos.

#### **7.6.2 Estabilidad a pH y temperatura**

8 alícuotas de 500 µl de bacteriocina L4-2a una concentración de 1.2 mg/mL (las mediciones de proteína realizadas en el NanoDrop™2000 Thermo Scientific), fueron preparadas para determinar el efecto del calor en la actividad inhibitoria. Cada alícuota fue sometida a una temperatura diferente iniciando con 40°C, luego 50, 60, 70, 80, 90,

100 y hasta 110°C por 30 min cada una. Después de este tiempo realizamos bioensayos (Ver sección 7.3.2) contra GM10 como cepa indicadora.

De la misma manera, para determinar su estabilidad a cambios de pH, fueron preparadas 7 alícuotas más (500 µl de bacteriocina L4-2 a una concentración de 1.2 mg/mL), las cuales se trataron con 500 µl de buffer de citrato 50 mM para pH 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0, buffer de fosfato 50 mM a pH 7.0 y buffer Tris HCl 50 mM para los valores de pH 8.0 y 9.0, de acuerdo a (Paik *et al.*, 1997). Se probó la actividad de cada alícuota contra GM10 utilizando la técnica de difusión en pozo descrita anteriormente.

### **7.6.3 Sensibilidad a Proteinasa K.**

La sensibilidad a las proteasas fue determinada agregando 1 mg de proteinasa K (Invitrogen) en 500 µl de bacteriocina L4-2 a una concentración de 1.2 mg/mL, luego incubada a temperatura ambiente por 1 h. La actividad biológica fue evaluada contra la GM10, como se mencionó anteriormente.

### **7.6.4 Determinación del modo de acción.**

50 mL de un medio líquido de CST fue utilizado para sembrar la cepa indicadora GM10 a 30°C en agitación a 180 rpm por 12 h. A mitad de la fase logarítmica fueron agregados 1.2 mg/mL de bacteriocina L4-2, luego cada 4 h se tomó 1 mL del cultivo. Cada muestra fue diluida hasta  $10^{-9}$ , la absorbancia a 600 nm fue medida y luego sembradas en placa de AST para contar las unidades formadoras de colonias (UFC).

### **7.6.5 Síntesis de la bacteriocina durante el ciclo de crecimiento.**

Para el estudio de producción de la bacteriocina, la cepa L4-2 fue inoculada en 5 mL de CST a 30°C a 180 rpm por a las 12 h, y transferidas un matraz con 45 mL de CST e incubado a 30°C por 24 h en agitación constante a 180 rpm. Alícuotas de 2 mL del cultivo fueron tomadas cada hora y concentrada en SAVANT (DNA 120 SpeedVac Concentrator) hasta un volumen final de 500 µl. La actividad inhibitoria de cada muestra concentrada fue probada contra GM-10 aplicando el método de difusión en pozo.

### **7.6.6 Caracterización parcial de la bacteriocina.**

Partiendo de un volumen de 1.2 L de cultivo de la cepa L4-2 de 12 h por 30 °C. El sobrenadante fue filtrado en membranas de 0.45 µm y precipitado con sulfato de amonio al 80% durante toda la noche a 4 °C. Las proteínas precipitadas fueron obtenidas por centrifugación a 10000 g por 30 min, y solubilizadas en 12 ml de agua MiliQ. La muestra fue pasada por FPLC (Amersham Biosciences. AB 2002) usando una columna Hi-Prep 26/60 Sphacryl™ S-300HR (Amersham Pharmacia) pre-equilibrada y eluida con 50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4 a un flujo de 12 ml h<sup>-1</sup>. Fracciones de 5 ml fueron colectadas y la concentración de proteína fue evaluada a 280 nm. La actividad antimicrobiana fue evaluada en cada fracción. Las fracciones positivas fueron mezcladas liofilizadas y disueltas en 5.0 mL de agua MiliQ estéril y pasada por filtros de diferente punto de corte, iniciando con 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa y 3 kDa (Centricon® Centrifugal Filter Devices Millipore). Con estos filtros separamos las moléculas grandes de las más pequeñas. Usamos primero los filtros de mayor tamaño y el producto obtenido por centrifugación lo filtramos usando el siguiente poro más pequeño hasta filtrar con un poro de 3 kDa. Las muestras obtenidas en cada uno de los pasos de filtración fueron probadas con GM10 (ver 7.3.2).

### **7.7 Purificación de la bacteriocina.**

Dos cultivos de 3 L cada uno fueron incubados a 28°C por diferentes lapsos de tiempo, uno fue incubado por 12 h (L4-212) y otro por 24 h (L4-224). Las células fueron eliminadas por centrifugación y los sobrenadantes filtrados con membrana de 0.45µm. Los filtrados fueron precipitados con sulfato de amonio como se mencionó anteriormente. El precipitado fue resuspendido en 10 mL de agua MiliQ estéril, pasados por el filtro de 10 kDa de corte (Cut off) y dializados en kit Mega Dialysis (Sigma-Aldrich. USA) de 1000 Da. Las muestras L4-212 y L4-224 fueron aplicadas, por separado, a un sistema de HPLC (Agilent 1100 Gradiente UV System) usando una columna C18-Zorbax 300SB (Agilent Technologies. USA) y eluidas con fase móvil: buffer A (90% agua: 10% acetonitrilo + 0.1% de ácido trifluoroacético), buffer B (10% agua y 90% acetonitrilo + 0.1% de ácido trifluoroacético) a un flujo constante de 1.0

ml/min. La absorbancia fue medida a 280 nm. Los picos fueron colectados y, por separado, probada la actividad contra *B. thuringiensis* GM10.

De acuerdo a los resultados obtenidos, decidimos repetir el procedimiento utilizando la muestra obtenida de 12 h de incubación, y como proteínas de referencia analizamos en la mismas condiciones Nisina 3.5 kDa y Lisozima 14.3 kDa a una concentración de 10 mg/mL cada una. Colectamos las diferentes fracciones proteicas para probar su actividad inhibitoria contra GM10. De esta manera identificamos la fracción que corresponde a la proteína que produce la actividad. Con el fin de obtener un volumen suficiente para analizar por espectrometría de masas, inyectamos la muestra al equipo HPLC en 15 ocasiones consecutivas, las fracciones colectadas en cada corrida fueron unidas y concentradas en el SAVANT y finalmente medimos la concentración de proteína en el NanDrop.

### **7.8 Determinación de la masa molecular.**

La muestra fue aplicada en un sistema LC-MS compuesto por una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución (Calmix)<sup>®</sup> conteniendo N-butilamina, cafeína, H<sub>2</sub>N-MRFA-CO<sub>2</sub> y Ultramark 1621. En el sistema de cromatografía de líquidos (LC) se utilizó un sistema gradiente de 50-50% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) utilizando una aguja capilar para la inyección directa. El flujo del sistema LC fue de 600 nanolitros/min. La masa molecular de cada muestra se obtuvo mediante el procesamiento de datos a través del algoritmo de Deconvolucion automática (Xtract rawfile. Agosto 2015).



## 8. RESULTADOS

### 8.1 Detección de actividad microbiana.

Un total de 48 cepas de la colección GM de Bt fueron analizadas, de las cuales 26 presentaron inhibición con al menos una de las cepas testigo. 24 presentaron actividad inhibitoria contra HD1, 13 para HD73, y 17 para GM-10. Medimos la actividad antimicrobiana en milímetros; entre más grande el halo de inhibición, mayor actividad (Tabla 9). De las 48 cepas 13 presentaron un mayor espectro de actividad ya que inhibieron las 3 cepas testigo; estas se muestran en letras negritas en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Actividad biológica de las 48 cepas de la colección GM contra las cepas de Bt HD1, HD73 e GM10. (Actividad medida en mm).

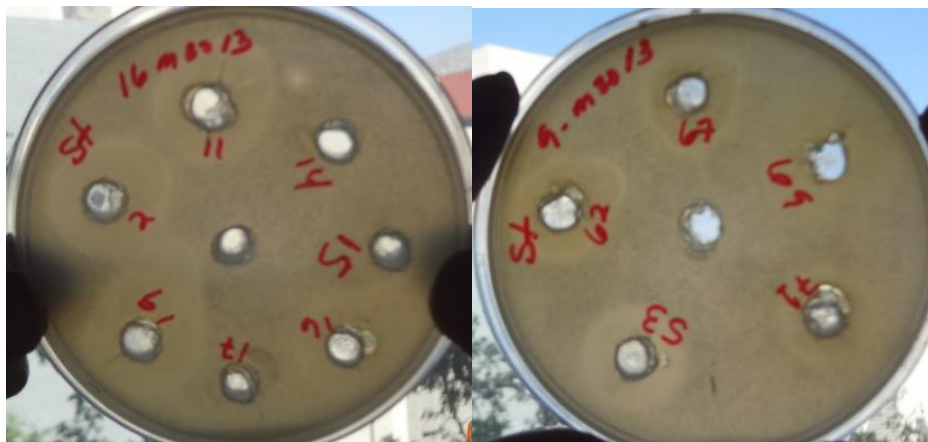
Bt	HD1	HD73	GM10
<b>L4-2</b>	12	19	29
GM5	-	-	-
GM6	-	-	-
GM8	-	-	-
<b>GM11</b>	11	17	26
GM14	-	-	-
GM15	-	-	-
<b>GM16</b>	11	19	25
GM17	-	-	-
GM18	-	-	-
<b>GM19</b>	12	21	24
GM20	10	-	22
GM22	10	-	-
GM25	10	-	-
GM26	10	-	-
GM27	12	-	-
GM28	-	-	-
GM46	-	-	-
GM48	-	-	-
GM49	-	-	-
GM50	-	-	-
<b>GM53</b>	14	17	25
GM57	10	-	22
GM60	-	-	-

Bt	HD1	HD73	GM10
<b>GM62</b>	12	20	25
GM63	-	-	-
<b>GM64</b>	10	18	18
<b>GM65</b>	10	17	20
<b>GM67</b>	12	21	25
<b>GM68</b>	10	19	23
GM69	-	-	-
<b>GM70</b>	10	17	24
<b>GM71</b>	12	21	23
<b>GM72</b>	20	17	25
GM74	-	-	24
GM76	-	-	22
GM75	20	-	-
GM77	-	-	-
GM78	-	-	-
GM79	-	-	-
GM80	-	-	-
GM82	12	-	-
GM81	13	-	-
GM83	10	-	-
GM85	12	-	-
GM86	-	-	-
GM87	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>24</b>	<b>13</b>	<b>17</b>

De las bacterias Gram negativas (*S. typhi*, *Salmonella Typhimurium*, *S. arizonae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*) y Gram positivas (*S. epidermidis*, *S. aureus* (MRSA) y *L. monocytogenes*), probadas contra los sobrenadantes de las 48 cepas de la colección, solo 9 presentaron actividad de las Gram positivas, contra MRSA y *L. monocytogenes* (Fig. 7 y Tabla 10). Por el contrario de las Gram negativas ninguna fue sensible.

**Tabla 10.** Gram positivas inhibidas por Bt de la colección GM.

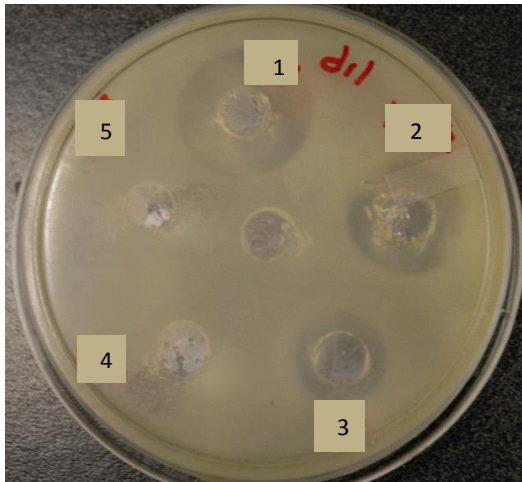
Colección Bt	MRSA	<i>L. monocytogenes</i>
L4-2	+	+
GM 11	+	+
GM 16	+	+
GM 53	+	+
GM 62	+	+
GM 67	+	+
GM 71	+	+
GM 72	+	+
GM 75	+	+
<b>Total</b>	<b>9/48</b>	<b>9/48</b>



**Figura 7.** Cultivo de MRSA inhibido por cepas de la colección GM. Los números corresponden al número con el que se identifica la cepa en la colección.

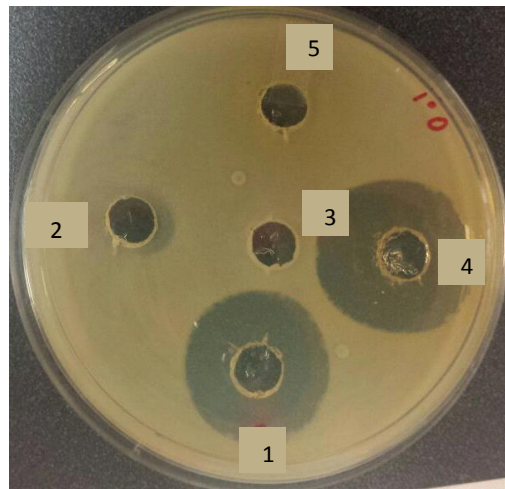
## 8.2 Comprobación de la prueba de actividad de la bacteriocina precipitada.

Un volumen de 200  $\mu$ l de la muestra precipitada con sulfato de amonio fue diluido en 200  $\mu$ l y 1 mL de agua MiliQ, respectivamente. Ambas diluciones probadas contra GM 10 mostraron una disminución en el tamaño del halo de inhibición, en relación a la muestra sin diluir (Fig. 8). Por otro lado, las muestras preparadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y NaCl con una conductividad (390  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) igual a la de la muestra precipitada de la cepa L4-2 no produjeron ninguna inhibición sobre el crecimiento de la cepa testigo GM10 (Fig. 9).



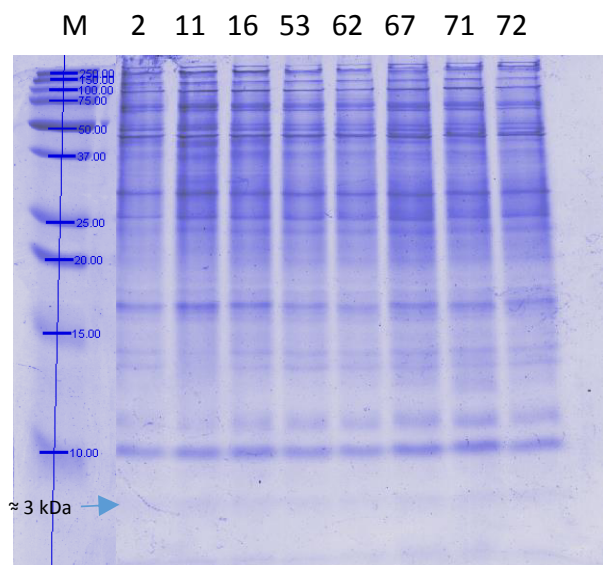
**Figura 8.** Actividad de la cepa L4-2. 1) Proteínas precipitadas; 2) diluida en 200  $\mu$ l; 3) diluida en 1 mL. 4) diluida en 2 mL y 5) 3 mL.

**Figura 9.** 1) y 4) Proteínas de la cepa L4-2 precipitadas con sulfato de amonio, 2) sulfato de amonio, 3) agua y 5) cloruro de sodio.



### 8.3 Separación de proteínas en Gel de Acrilamida.

La separación electroforética de las proteínas totales extraídas se llevó a cabo en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. En la figura 10, separación electroforética de proteínas de las cepas GM que presentaron inhibición contra MRSA y *L. monocytogenes*.



**Figura 10.** Gel SDS-PAGE con proteínas precipitadas. Los números superiores corresponden al asignado en colección GM que presentaron actividad contra MRSA. (M) marcador de peso molecular.

Además realizamos pruebas para determinar actividad directa sobre gel de acrilamida nativo. Una vez que las proteínas son separadas, el gel se coloca en una caja Petri y es cubierto con un cultivo de la cepa indicadora en agar suave fundido (ver apéndice). De los cuales no obtuvimos resultados favorables.

#### 8.4 Selección de la cepa productora para caracterizar y purificar una bacteriocina.

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la inhibición de la colección GM probadas contra las 3 cepas testigo HD2, HD73, GM10, y que inhibieron a *S. aureus* MRSA y *L. monocytogenes*. En la figura 11, corresponde al dendrograma que agrupa las cepas de la colección en base a su actividad y espectro de inhibición con lo que logramos identificar 6 grupos. El color de las filas de la tabla 12 corresponde al color de los círculos que agrupan las cepas identificadas por su clave GM en el dendrograma (Fig. 11). La cepa L4-2 fue seleccionada por su actividad de mayor espectro al inhibir las cepas testigo HD1, HD73 e GM10; además de presentar el diámetro mayor de inhibición contra *S. aureus* (Tabla 11 y Fig. 11). La cepa L4-2 fue caracterizada y purificada en este trabajo.

**Tabla 11.** Reordenamiento de las cepas de Bt de acuerdo a su espectro de actividad (mm).

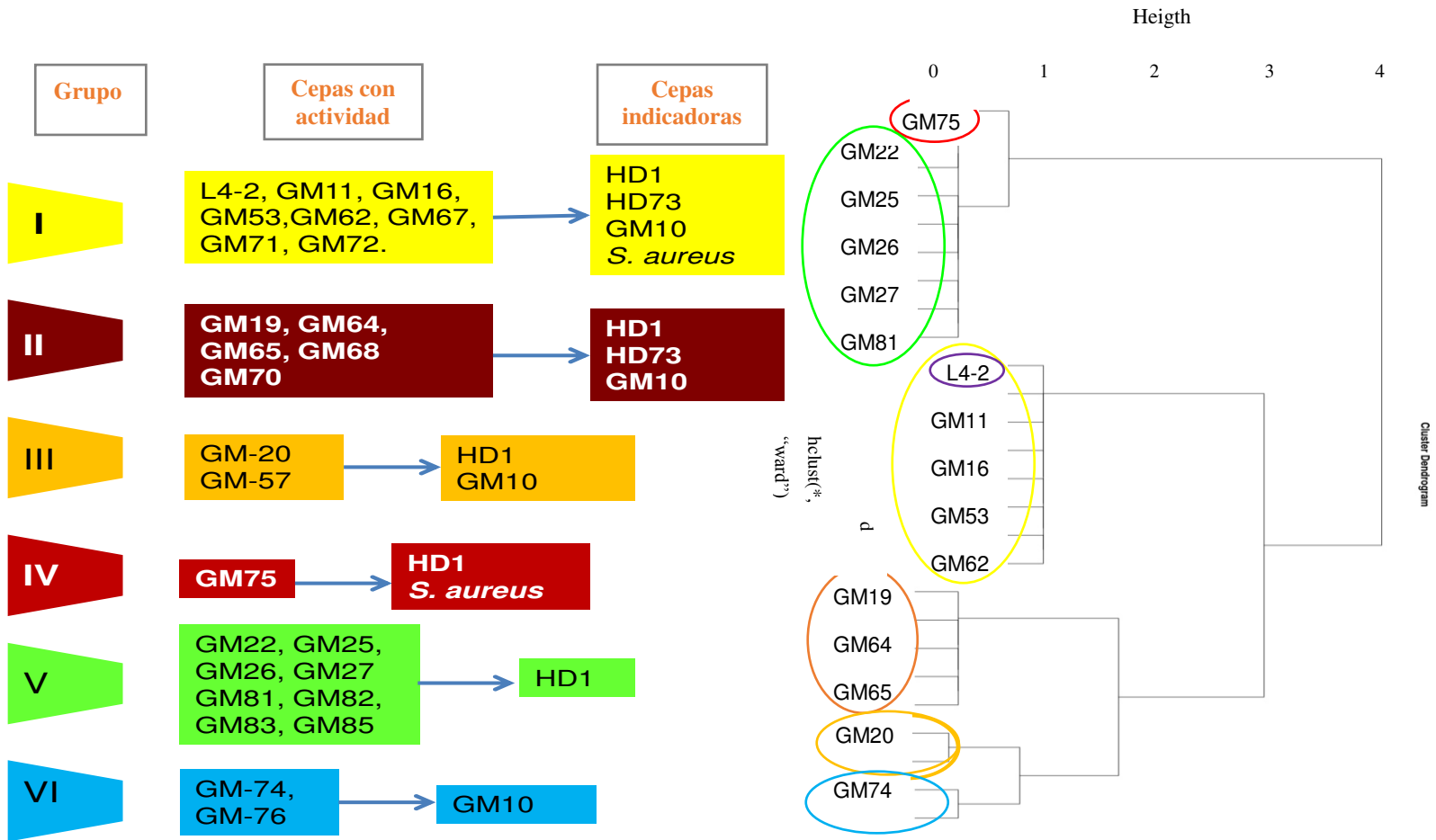
Cepa	Cepa indicadora				
	HD1	HD73	GM10	*MRSA	**Lm
L4-2	12	19	29	27	26
GM11	11	17	26	22	17
GM16	11	19	25	22	18
GM53	14	17	25	26	24
GM62	12	20	25	27	24
GM67	12	21	25	25	25
GM71	12	21	23	25	24
GM72	20	17	25	20	25
GM19	12	21	24	—	—
GM64	10	18	18	—	—
GM65	10	17	20	—	—
GM68	10	19	23	—	—
GM70	10	17	24	—	—

Cepa	Cepa indicadora				
	HD1	HD73	GM10	*MRSA	**Lm
GM20	10	—	22	—	—
GM57	10	—	22	—	—
GM75	20	—	—	25	13
GM22	10	—	—	—	—
GM25	10	—	—	—	—
GM26	10	—	—	—	—
GM27	12	—	—	—	—
GM82	12	—	—	—	—
GM81	13	—	—	—	—
GM83	10	—	—	—	—
GM85	12	—	—	—	—
GM74	—	—	24	—	—
GM76	—	—	22	—	—

\**Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

\*\**Listeria monocytogenes*



**Figura 11.** Dendrograma de colección GM agrupada en base a su espectro de inhibición. Las amarillas inhiben las 3 cepas testigo y MRSA.

## 8.5 Producción y caracterización de la bacteriocina L4-2.

### 8.5.1 Obtención de bacteriocina L4-2 Parcialmente Purificada (PP).

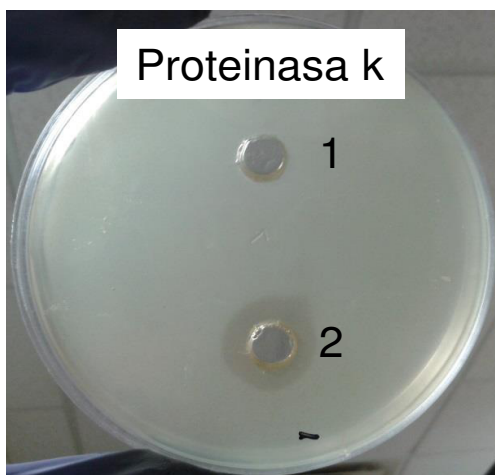
La cepa L4-2 fue sometida al mismo tratamiento para la obtención de bacteriocinas que nuestros controles positivos: *B. thuringiensis* subsp *tochigiensis* HD868 productora de tochicina, *B. thuringiensis* subsp *entomocidus* HD9 productora de entomocina 9 y *B. thuringiensis* subsp *thuringiensis* HD1 productora de thuricina. En la figura 12 podemos observar la obtención de las bacteriocinas usadas como controles positivos y la L4-2; además es evidente que el efecto de inhibición la bacteriocina L4-2 es más potente que los controles positivos. Los resultados de Cultivo HD73 inhibido por las bacteriocinas L4-2, tochicina, entomocina 9 y thuricina son mostradas en el apéndice.



**Figura 12.** Cultivo GM10 inhibido por las bacteriocinas L4-2, tochicina, entomocina 9 y thuricina.

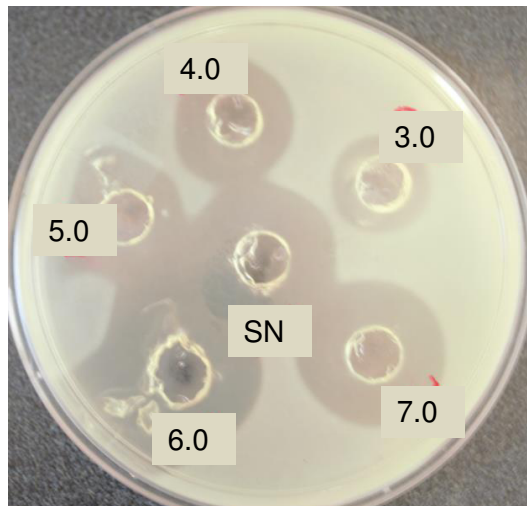
### 8.5.2 Sensibilidad a la proteinasa K, estabilidad a pH y temperatura.

La actividad de la cepa L4-2 desapareció cuando ésta fue tratada con proteinasa K, por lo que puede tratarse de una bacteriocina (Fig. 13).



**Figura 13.** Actividad de la bacteriocina L4-2 con (1) y sin (2) proteinasa K.

La bacteriocina fue inactivada a los 90°C después de 30 min, conservando su actividad desde los 40°C hasta 80°C. En cuanto a su estabilidad al pH, encontramos que la bacteriocina L4-2 es estable a valores de pH 3.0 a 7.0 (Fig. 14).

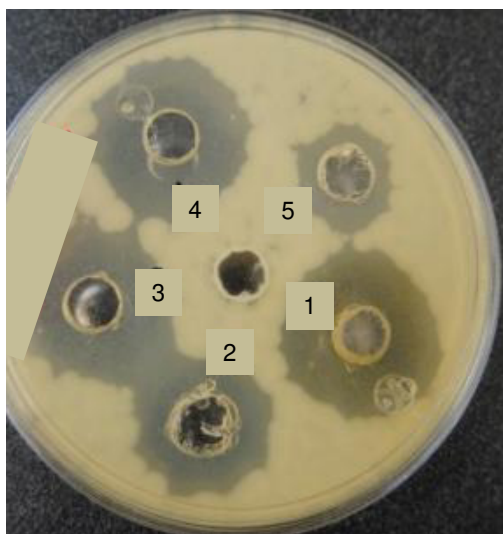


**Figura 14.** Cultivo de GM10. (SN) bacteriocina sin tratamiento. Los números corresponden al valor de pH al que se ajustó la bacteriocina.

La determinación si se trata o no de fagos, quedó demostrado la ausencia de virus, ya que diluciones de la bacteriocina L4-2, observamos una disminución progresiva de la zona de inhibición, sin la aparición de placas líticas.

### 8.5.3 Actividad contra *L. monocytogenes*.

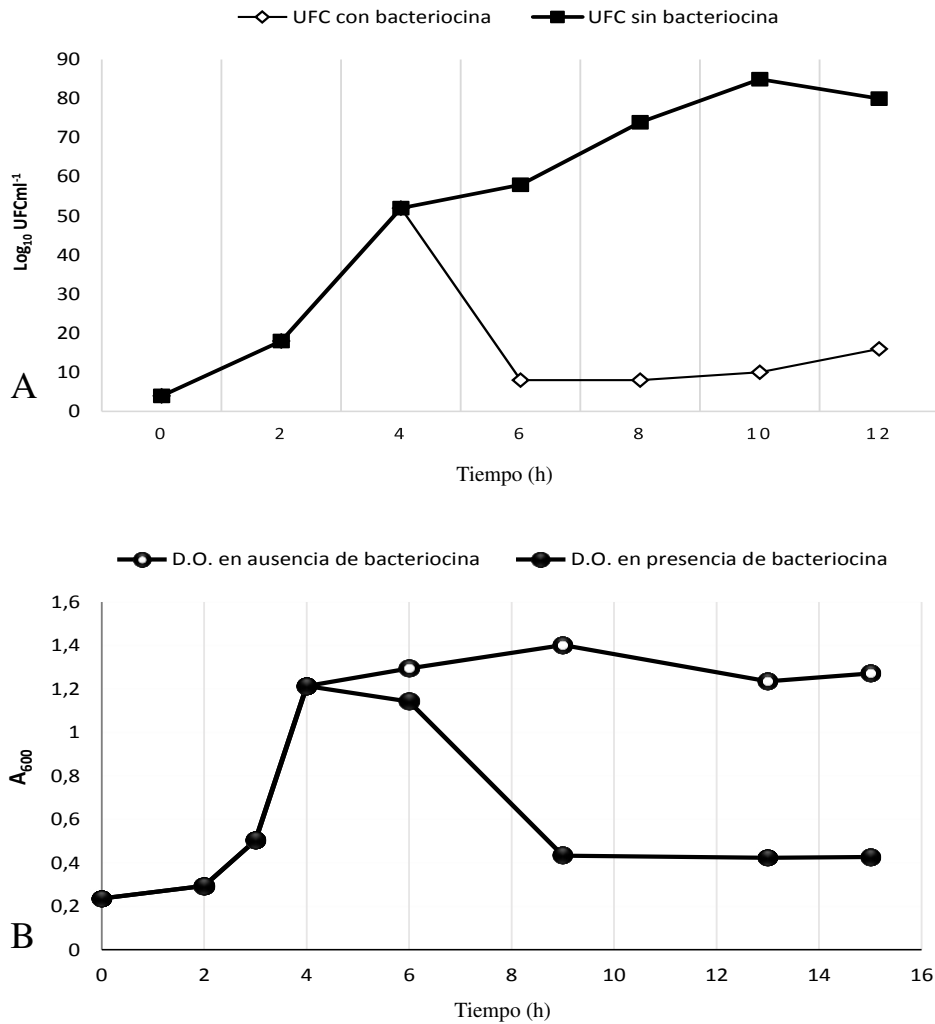
La bacteriocina L4-2 presentó actividad contra *L. monocytogenes*. (Fig. 15), característica que presentan las bacteriocinas de la clase II producidas por BAL.



**Figura 15.** Cultivo de *Listeria monocytogenes* inhibida por bacteriocina L4-2.



En la prueba para determinar el modo de acción de la bacteriocina L4-2, ésta fue agregada a mitad de la fase logarítmica del crecimiento de *Bt* GM10. Durante la primera hora observamos una disminución en el número de células viables (UFC/mL); la pérdida de actividad se mantuvo constante durante las horas siguientes. Lo que indica que tiene una actividad bactericida (Fig. 16 A).

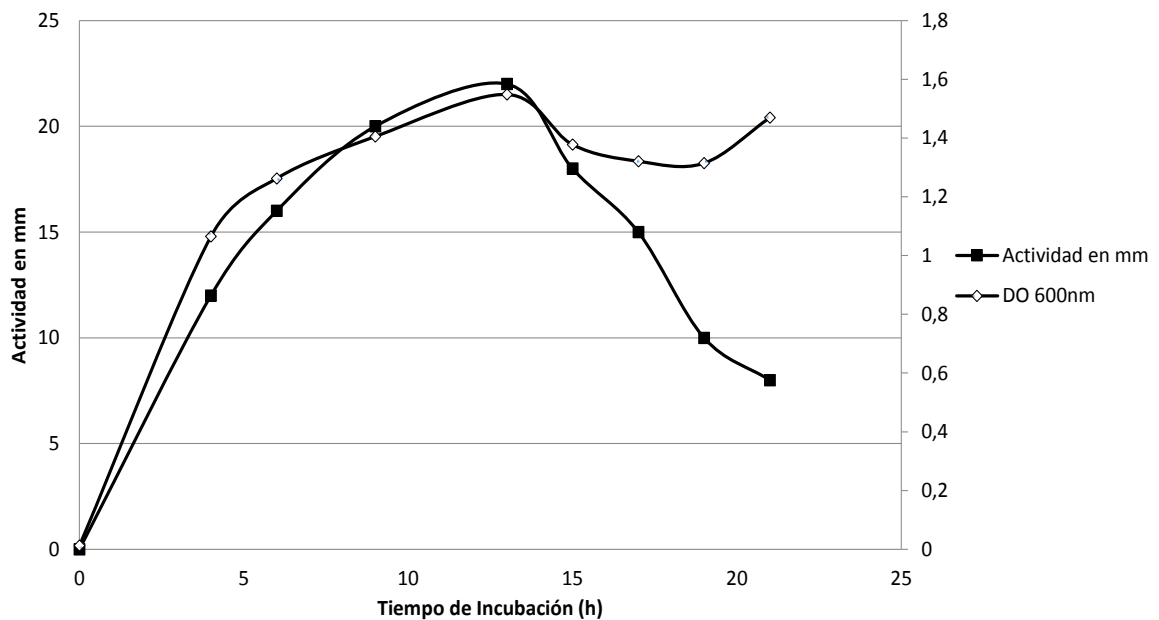


**Figura 16.** Efecto de la bacteriocina L4-2 sobre la viabilidad celular, UFC ml<sup>-1</sup> (A) y la densidad óptica (B) de *B. thuringiensis* GM10.

Los valores tomados por espectrofotometría (Beckman Coulter™ DU® 650) mostraron una disminución gradual de la densidad óptica (DO 600nm), lo que indica que la bacteriocina L4-2 no solo inhibe el crecimiento de las células sino que además las lisa, por lo tanto presenta una actividad bacteriolítica (Fig. 16B).

#### 8.5.5 Síntesis de la bacteriocina L4-2 durante el ciclo de crecimiento.

La cinética de crecimiento de la cepa L4-2 mostró que la bacteriocina empieza a producirse a las 4 h identificando una actividad inhibitoria de 11 mm de diámetro, obteniendo su máxima actividad con un diámetro de 24 mm a las 13 h y disminuyendo hasta ser totalmente inactiva a las 24 h. Con estos resultados pudimos identificar que la bacteriocina L4-2 inicia su producción a mitad de la fase logarítmica, aumentando hasta alcanzar su máxima producción al inicio de la fase estacionaria y disminuyendo drásticamente hasta las 24 h (Fig. 17 y 18).



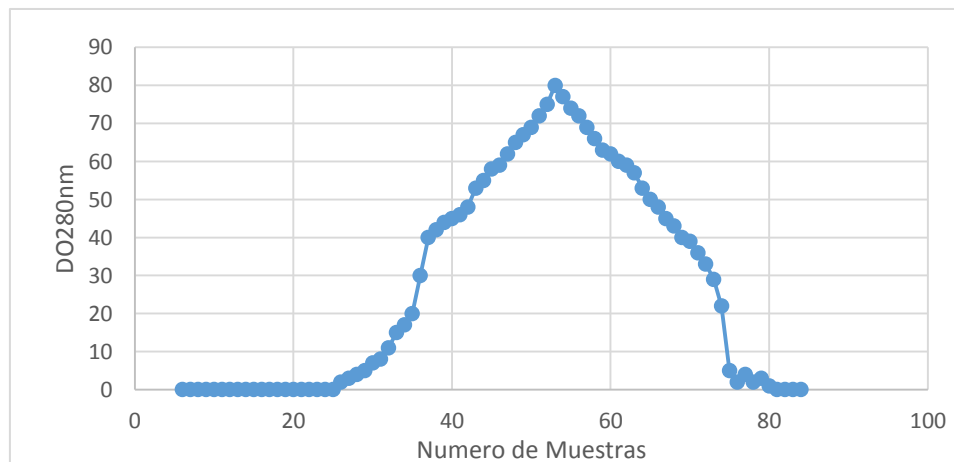
**Figura 17.** Cinética de producción de bacteriocina L4-2 durante el crecimiento de la cepa L4-2. Densidad óptica del cultivo ( $\diamond$ ), actividad inhibitoria (mm) sobre la cepa indicadora ( $\blacksquare$ ).



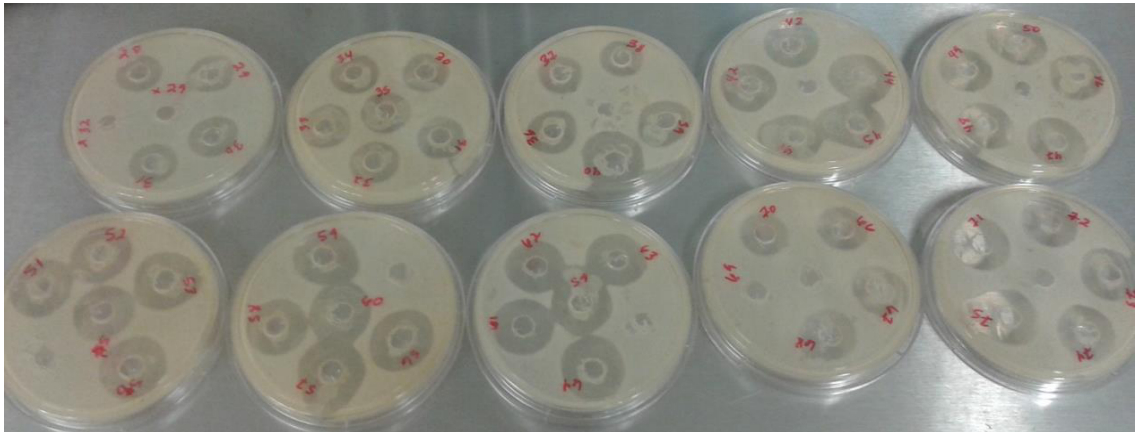
**Figura 18.** Prueba de actividad de la bacteriocina contra GM10 durante la cinética de crecimiento de la cepa L4-2. La primera evidencia de actividad de la bacteriocina se registró a las 4.5 h. A las 13 h la actividad comienza a disminuir.

### 8.5.6 Caracterización parcial la bacteriocina L4-2.

El cultivo de 1.2 L de la cepa L4-2, fue liofilizado y, posteriormente, resuspendido en 12 mL, alcanzando una concentración de proteína de 353.89 mg/mL. Esta muestra fue inyectada en el FPLC; colectamos 200 fracciones de las cuales 48 dieron lecturas positivas a proteínas por espectrofotometría (Fig. 19). Realizamos la prueba de actividad a las 200 fracciones (Fig. 20). La primera fracción en presentar actividad fue la 28 y la última fue la 76. Las muestras con actividad y lecturas positivas por espectrofotometría fueron unidas y liofilizadas nuevamente.

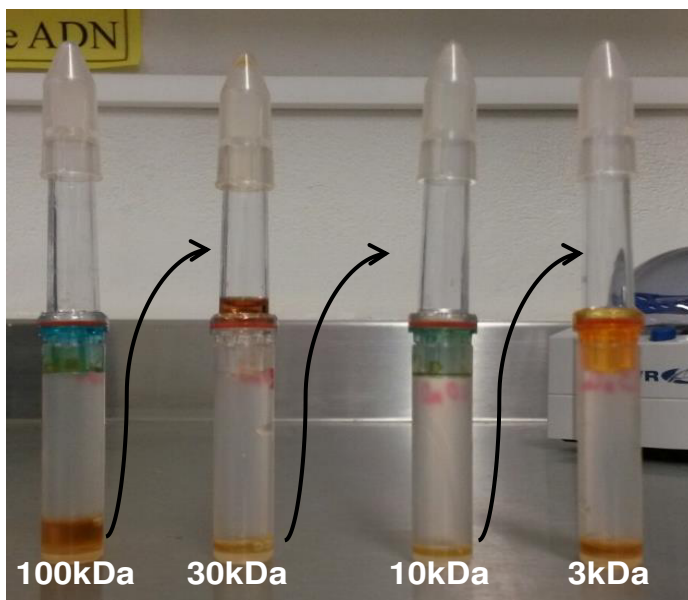


**Figura 19.** Muestra de L4-2 eluida en el FPLC. Proteína monitoreada por DO a 280nm. La primera fracción en presentar actividad fue la 28 y la última fue la 76 de las 200 fracciones colectadas.

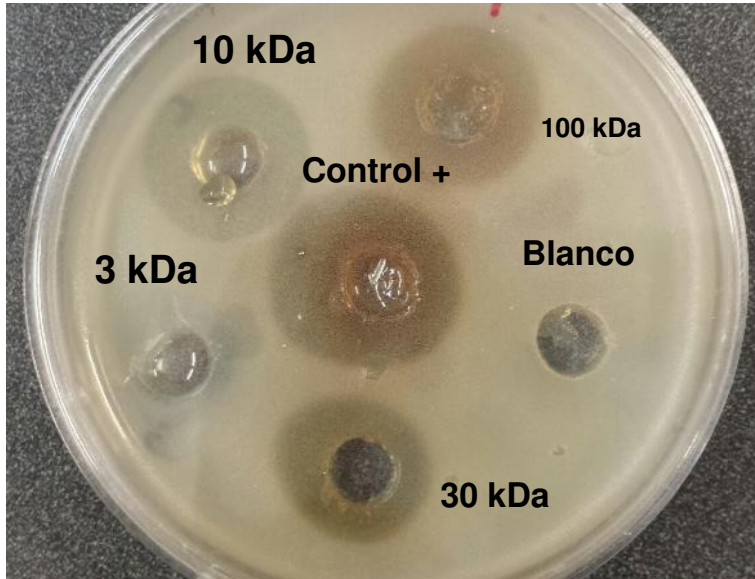


**Figura 20.** Muestra de L4-2 eluida por FPLC. Prueba de actividad de las 200 fracciones colectadas donde las 48 fracciones con lecturas positivas a proteínas presentaron actividad inhibitoria contra GM10.

El concentrado de las proteínas totales purificado por FPLC fue fraccionado por tamaños pasando la muestra de un filtro a otro (Fig. 21). La actividad contra la cepa de referencia Bt GM10 mostró que la actividad se pierde al usar el filtro de 3 kDa, lo que significa que la bacteriocina que causa la actividad debe de tener un tamaño igual o mayor de 3 kDa. (Fig. 22).



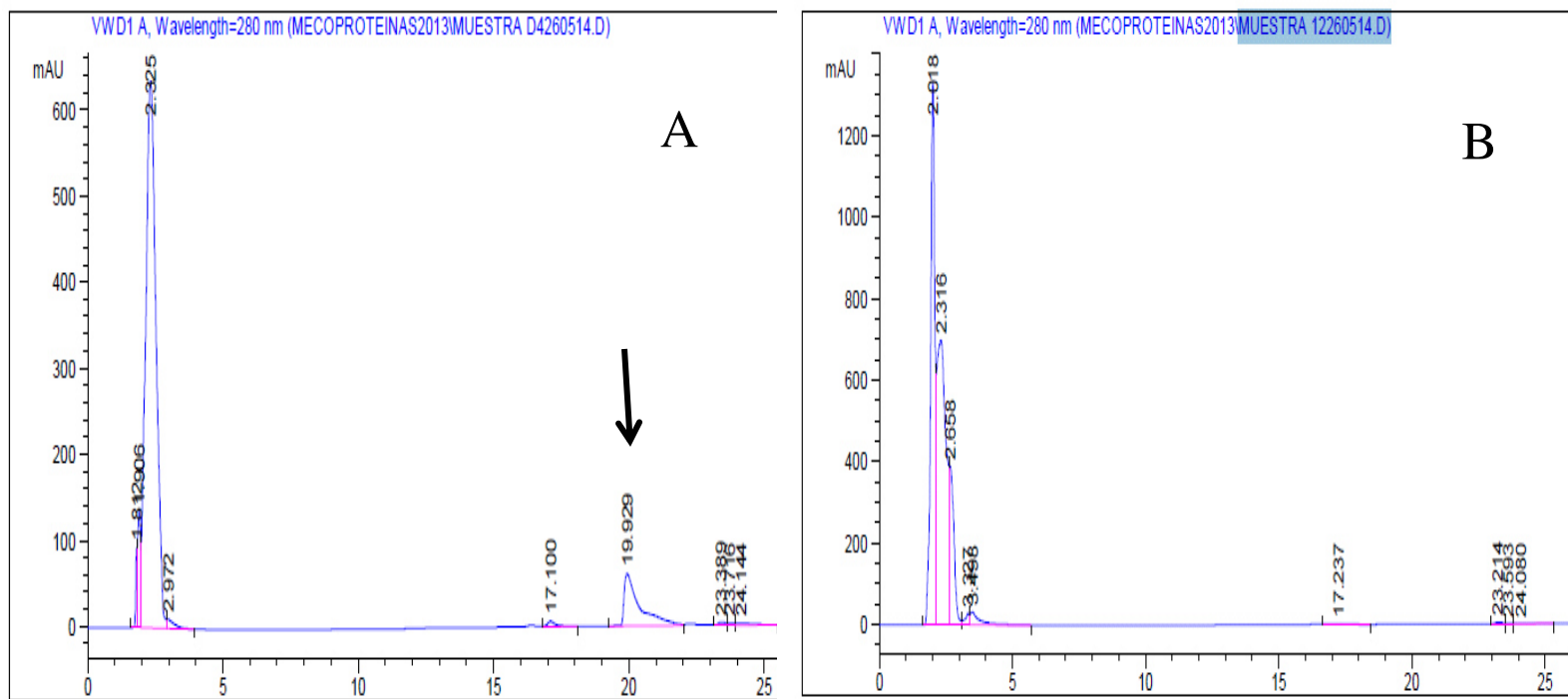
**Figura 21.** Proteínas separadas por filtros Centricon



**Figura 22.** Cultivo de Bt GM10 inhibido por proteínas sintetizadas por L4-2 separadas por tamaños utilizando filtros Centricon. La muestra filtrada a los 3 kDa no presentó actividad.

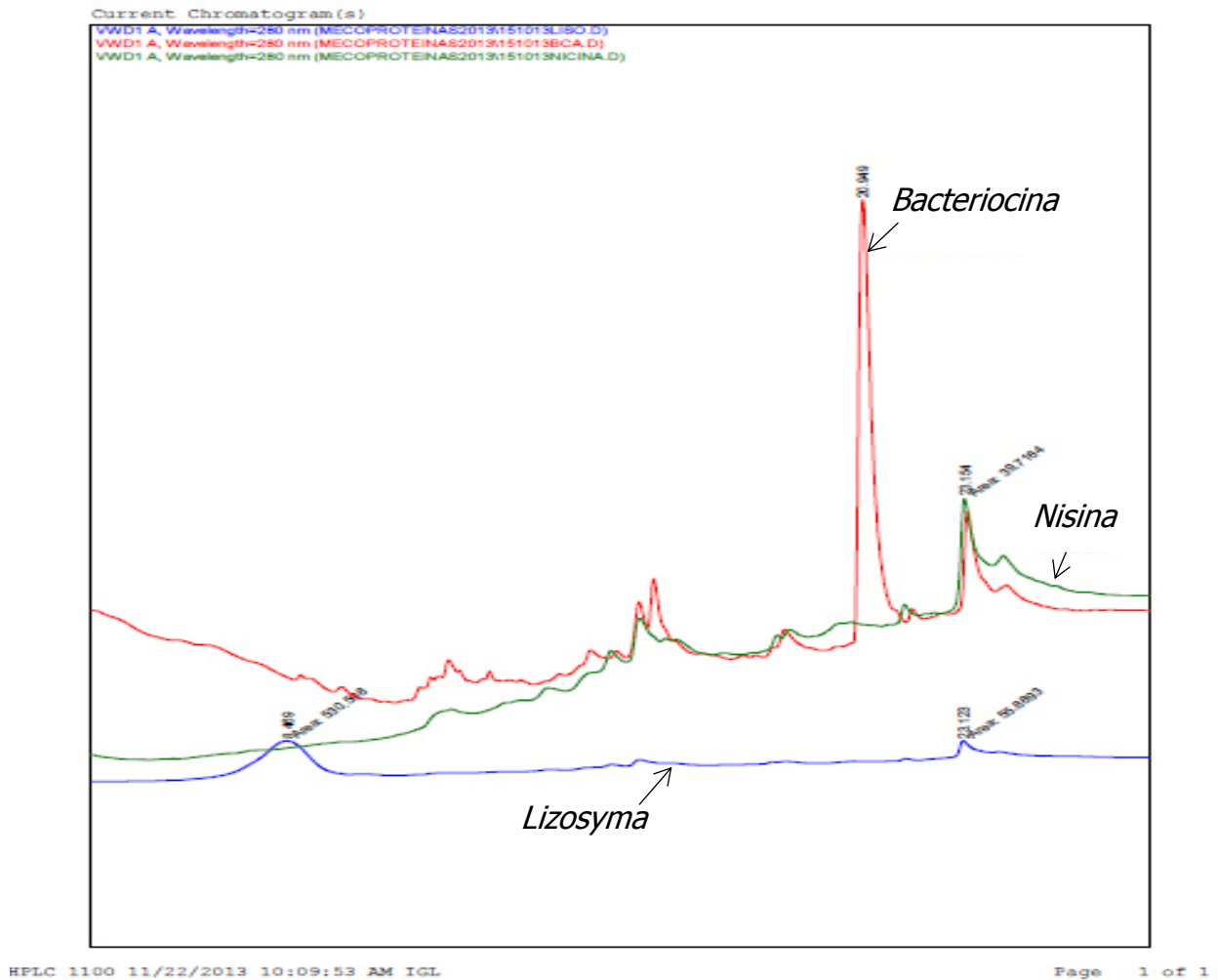
### **8.6 Purificación de la bacteriocina L4-2.**

Los cromatogramas del HPLC correspondientes a las proteínas obtenidas de los dos cultivos de la cepa L4-2 incubados uno por 12 h y otro por de 24 h, fueron diferentes identificando que a las 12 h se produce un pico a las 19.929 (Fig. 23A), el cual no aparece en el cultivo de 24 h de incubación (Fig. 23B). La actividad de las 5 fracciones que se obtuvieron del cultivo de 12 h y las 4 que se obtuvieron del cultivo de 24 h fueron probadas contra Bt GM10, identificando la fracción 19.929 como la proteína responsable de la inhibición.



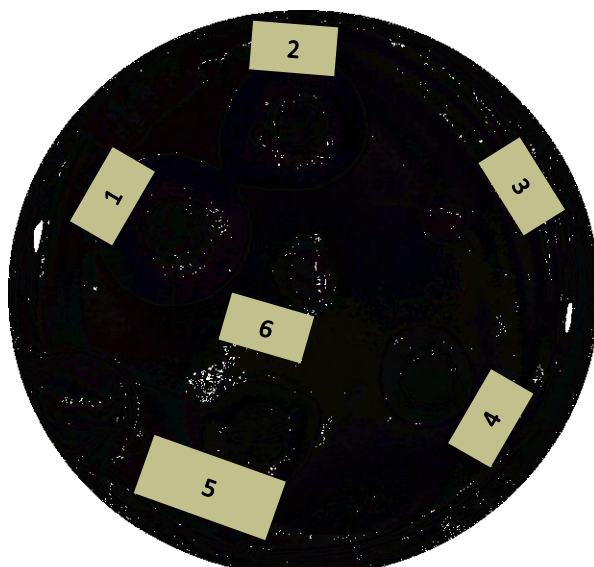
**Figura 23.** Cromatogramas del HPLC. Comparación del perfil del de proteínas del sobrenadante de la cepa L4-2 cultivada 12 h (A) y 24 h (B). Solo la fracción 19.929 tuvo actividad inhibitoria.

La nisina 3.5 kDa y lisozima 14.3 kDa fueron utilizadas como controles; la nisina como control positivo por ser una bacteriocina y la lisozima como control negativo. La figura 24 se muestra una similitud entre las gráficas de la nisina y la muestra L4-2. El pico que aparece a los 19.929 min no aparece en la nisina ni en la lisozima (Fig. 24).



**Figura 24.** Cromatograma obtenido por HPLC correspondiente a las proteínas producidas por la cepa L4-2 (rojo) y los controles nisina (verde) y lisozima (azul).

Cada pico fue analizado y determinada la concentración de proteína (Nanodrop) y actividad biológica contra GM10. Los resultados mostraron 0.033 mg/mL de proteína para la L4-2 y 1.948 mg/mL para la nisina. La actividad biológica del pico 19.929 min fue positiva, mientras que la lisozima, en cambio la nisina presentó actividad en el pico 23.5 min (Fig. 25).



**Figura 25.** Actividad biológica de las bacteriocina L4-2 obtenidas en los diferentes pasos de purificación. Pocillo: 1, liofilizado; 2, dializadas; 3 y 4, picos 1.8 y 19.929 obtenidos en el HPLC; 5, nisina colectada a los 23.5 min y 6, lisozima.

La proteína del pico de 19.929 min, obtenida de un cultivo de 12 h de la cepa L4-2 fue colectada, aplicada nuevamente al HPLC. Este paso se repitió 15 ocasiones consecutivas, mezcladas y concentradas en el SAVANT hasta una concentración de 0.574 mg/mL, a la que se le determinó la masa molecular.

### **8.7 Determinación de la masa molecular.**

La masa molecular de la bacteriocina L4-2 fue determinada por espectrometría de masa en 3.138 kDa (Fig. 26). La muestra L4-2, fue además sometida a un tratamiento de reducción-alkilación (esto para la apertura de la proteína y mejor visualización en la fragmentación de la misma en el espectrómetro de masas, para verificar la secuenciación manual [De Novo]) (Fig. 27). Estos resultados fueron inciertos, ya que solo se pudo obtener una secuencia de tres aminoácidos (Leu/Leu/Ala), Estos resultados sugieren que se trata de una molécula cíclica o compuesta (Grande et al., 2014; Gabrielsen et al., 2014).



39-2015BenitoMW\_XT\_00001\_M\_ #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 5.47E4  
T: FTMS + c NSI Full ms [700.00-4000.00]

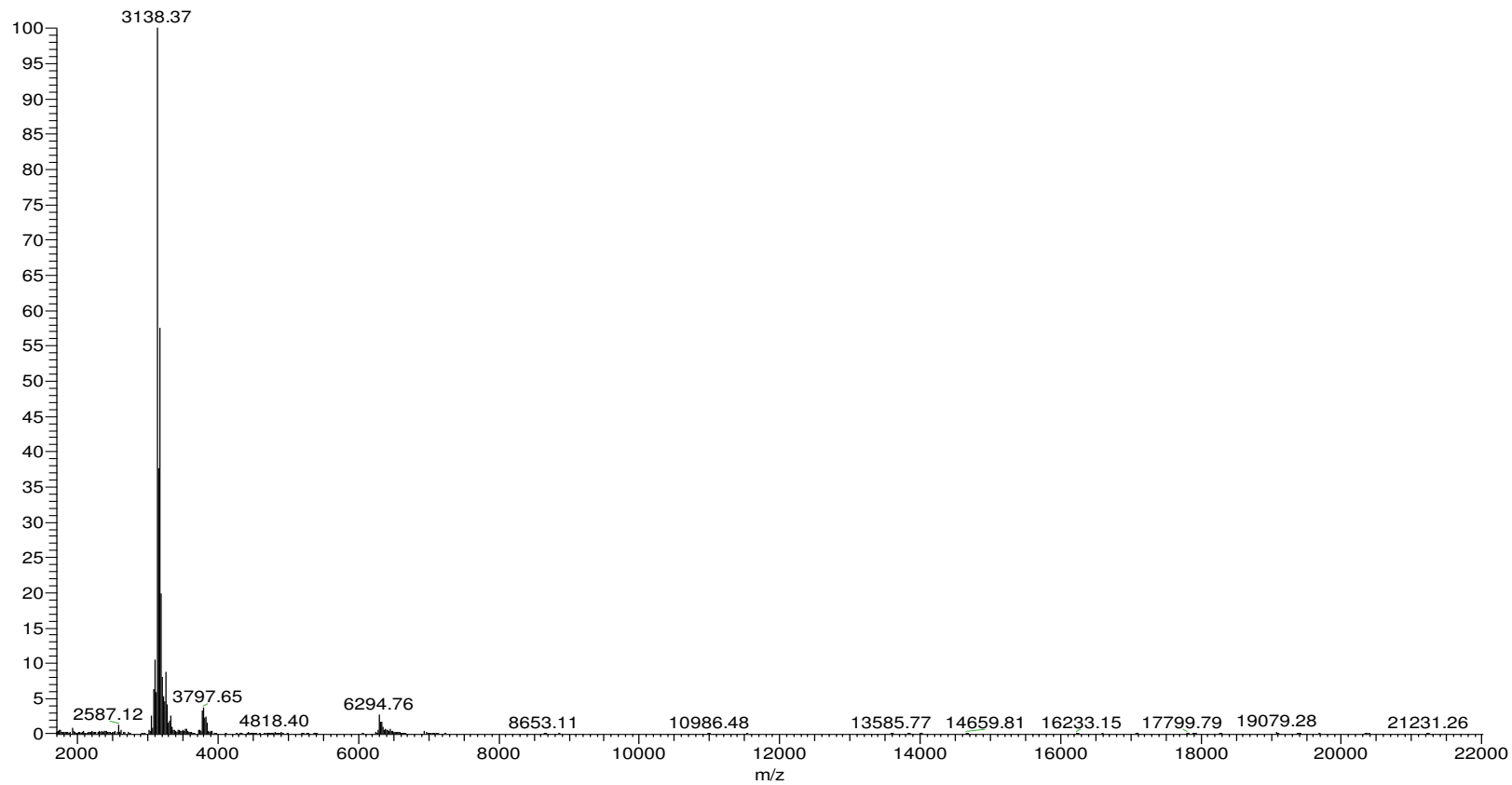


Figura 26. Cromatograma de la bacteriocina L4-2 por espectrómetro de masas

39-2015BenitoMWDTT #120-1481 RT: 2.15-27.13 AV: 530 NL: 1.88E  
T: Average spectrum MS2 1579.21 (120-1481)

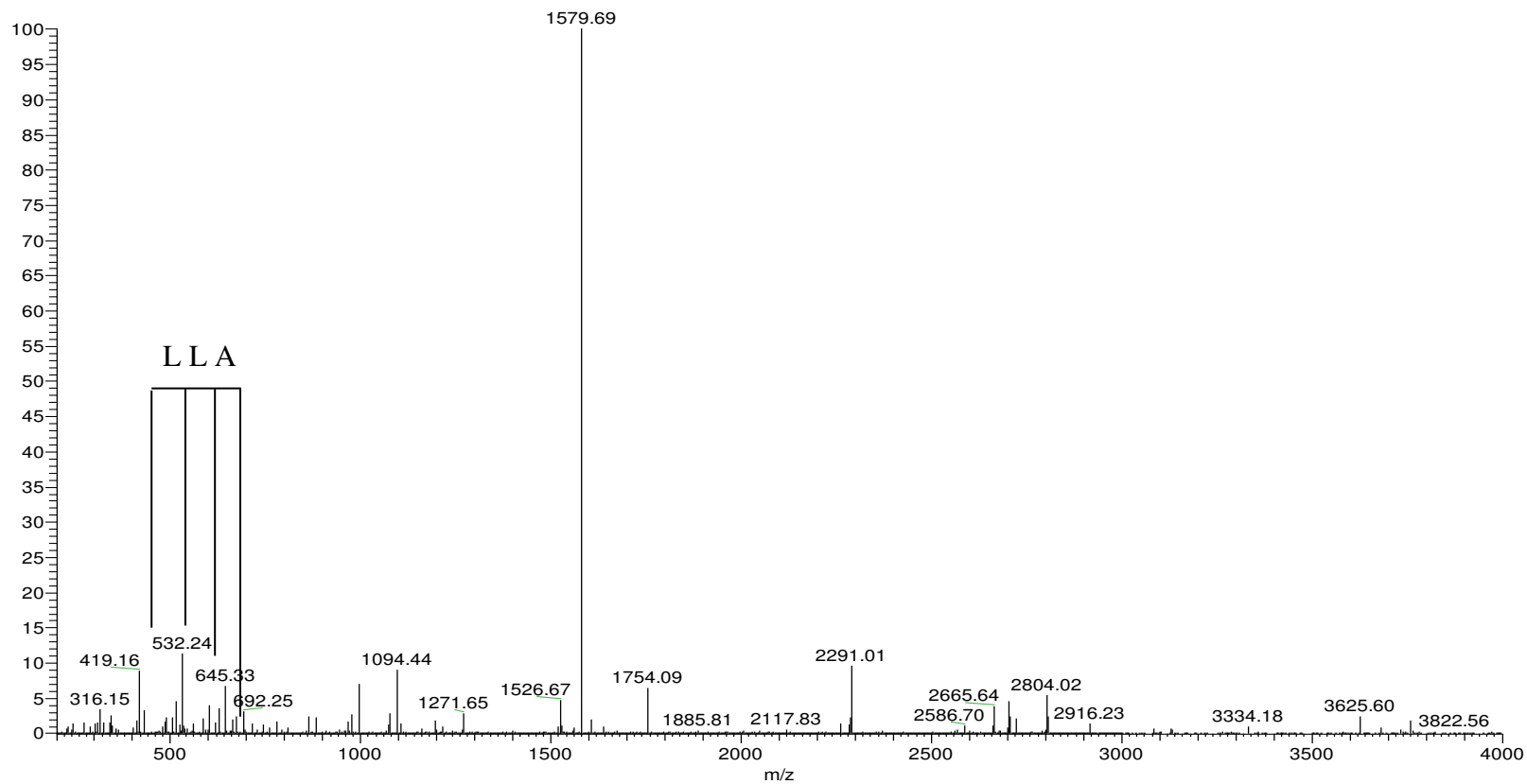


Figura 27. Espectro de fragmentación

## 9. DISCUSIÓN

El género *Bacillus* se caracteriza por la producción de un gran arsenal de sustancias con actividad biológica contra otros organismos. En el caso específico de *B. thuringiensis*, sintetiza diversos tipos de metabolitos y proteínas con actividad biocida, entre las que destacan las proteínas Cry, Cyt y Vip, por su uso contra insectos plaga de importancia agrícola y salud pública. Adicionalmente, es capaz de producir otras moléculas con efecto sobre células cancerígenas como las Parasporinas (PS) y otras más con efecto antimicrobiano como son las bacteriocinas (Salazar-Marroquín *et al.*, 2016; Ref).

A la fecha se han reportado 18 bacteriocinas sintetizadas por *B. thuringiensis*. Cada una presenta un espectro de actividad particular confiriéndoles un alto potencial para ser usadas como conservadores de alimentos, para control de hongos y además en el control de patógenos humanos como es *Clostridium difficile*. Lo relevante de este trabajo fue detectar cepas productoras de antimicrobianos tipo bacteriocinas, con actividad biológica contra bacterias de importancia en salud humana e industria alimentaria como lo son MRSA y *Listeria monocytogenes*.

En el gel de acrilamida SDS- PAGE, obtuvimos patrones de bandas de proteínas, con pesos aproximados de 12 kDa y menores, rango dentro del cual se encuentran las bacteriocinas producidas por Bt como menciona De la fuente Salcido *et. al.*, (2007) (Tabla 4). Algunos investigadores utilizaron geles nativos para detectar actividad directa como es el caso de Cherif y cols. (2003), quienes partiendo de un cultivo de 5 L concentrado lograron detectar la actividad de la entomicina 9. Nosotros realizamos las pruebas de actividad directa de la bacteriocina L4-2 en gel nativo, a partir de un cultivo de 500 mL, probamos varios métodos de fijado y lavado de gel (ver apéndice), sin obtener resultados favorables; consideramos que no fue suficiente la concentración de bacteriocina para detectar la actividad directa.

Las bacterias seleccionadas como indicadoras para la detección de las bacteriocinas fueron Bt HD1 serovar. *kurstaki* y HD73 serovar. *kurstaki*. Estas fueron reportadas sensibles a tochicina (Paik *et al.*, 1997) y entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003). Algunos autores mencionan que las bacteriocinas inhiben el crecimiento principalmente de cepas estrechamente relacionadas filogenéticamente (Jack *et al.*, 1995) es por eso que seleccionamos también una cepa nativa, la GM10 serovar. *aizawa*.

El resultado de los bioensayos con las cepas indicadoras mostró que 26 de las 48 (26/48) cepas de Bt estudiadas producen metabolitos con actividad similar a una bacteriocina (Tabla 9). Al respecto, pudimos observar que el efecto de las proteínas probadas difería significativamente dependiendo de la sensibilidad de la cepa testigo; por ejemplo, HD1 presentó sensibilidad a un mayor número de cepas, 24/48; no obstante su mayor espectro de sensibilidad, los halos de inhibición fueron menores a los mostrados por la HD73 y GM10. Mientras que en HD73, sensible 13/48, los halos de inhibición oscilaron entre 17 y 21 mm de diámetro. Lo más sobresaliente de estos resultados fue el efecto sobre de la cepa GM10 fue inhibida por 17/48 cepas y los halos de inhibición fueron mayores a los presentados por HD1 y HD73, los cuales tuvieron un mínimo de 18 mm hasta un máximo de 29 mm, la sensibilidad más alta de las 3 cepas indicadoras probadas (Tabla 9). Esto corrobora lo argumentado por Jack *et al.* (1995), que menciona que las bacteriocinas presentan mayor actividad contra cepas estrechamente relacionadas; esto coincide también con los resultados obtenidos de la actividad presentada contra las Gram negativas probadas, de las cuales ninguna fue inhibida. Por otra parte, las Gram positivas, 9/26 presentaron actividad contra *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Estos resultados fueron relevantes en el sentido de que los halos de inhibición de *S. aureus* fueron los de mayor diámetro que incluso los presentados con la GM10.

De las bacteriocinas de Bt reportadas a la fecha, la bacthuricina F4 (Kamoun *et al.*, 2005) y las reportadas por el grupo mexicano, morricina 269, kurstacina 287, kenyacina 404, entomocina 420, y tolworthicina 524 (Barbosa y Corona 2007) presentan actividad contra *S. aureus*, al igual que 9 cepas de la colección analizada en este trabajo (tabla 11 y Fig 11). Mientras que para *L. monocytogenes*, se asemeja a thuricina S (Chehimi *et al.*, 2007), entomocina 110 (Cherif *et al.*, 2008), entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003) y thuricina 7 (Cherif *et al.*, 2001). Sin embargo solo la L4-2, thuricina (Favret and

Younsten. 1989) y thurincina H (Lee *et al.*, 2009a) fueron activas contra ambos patógenos.

Para confirmar que la actividad de las 48 cepas se debe a la acción de la bacteriocina y no a la concentración del sulfato de amonio utilizado para precipitar las proteínas, probamos dos soluciones: una con sulfato de amonio y otra con cloruro de sodio, igualando la conductividad de ambas a la medida a la proteína precipitada L4-2 contra un cultivo de GM10. Se pudo observar un halo de inhibición provocadas por las diluciones de la proteína precipitada (200  $\mu$ l y 1 mL); por el contrario, las soluciones de sulfato de amonio y cloruro de sodio no causaron inhibición, descartando el efecto de la sal sobre el crecimiento de la cepa testigo.

Los resultados de la actividad de las 26 cepas fueron organizadas en una tabla utilizando un código binario para luego ser divididos en grupos en un dendrograma. Este mostró que las cepas productoras de bacteriocinas se agrupan en 6 grupos diferentes dependiendo de las cepas testigo que inhiben. En base a lo anterior podemos decir que, el grupo I y el V están compuestos por 8 cepas cada uno, (L4-2, GM11, GM16, GM53, GM62, GM67, GM71, GM72) y (GM22, GM25, GM26, GM27 GM81, GM82, GM83, GM85) respectivamente. El grupo I produce bacteriocinas que inhiben las 3 cepas indicadoras, además de MRSA, a diferencia del grupo V que mostró alta especificidad hacia HD1. El grupo II conformado por las cepas GM19, GM64, GM65, GM68 y GM70 (5) inhibió las 3 cepas testigo, pero no a MRSA. El grupo III, GM-20 y GM-57, por su parte, mostró acción contra HD1 y GM10; el grupo IV integrado solo por GM75 inhibió HD1 y MRSA y, finalmente el VI solo inhibió a la GM10. En resumen, el grupo I y el IV actuaron contra MRSA (Fig. 11). Dado que el grupo I presentó el mayor espectro de actividad, decidimos seleccionar la cepa L4-2 perteneciente a este grupo para llevar a cabo los objetivos de caracterización y purificación de una bacteriocina propuestos en este trabajo.

El análisis de la actividad de la cepa L4-2 y los 3 controles positivos HD868, HD9 y HD2 contra GM10, mostraron que la bacteriocina producida por la cepa L4-2 es más potente que la tohicina, entomocina 9 y thuricina (Fig. 12).

El primer paso para caracterizar una bacteriocina es el comprobar que es de naturaleza proteica. Para ello, nuestra bacteriocina fue digerida con proteinasa K. El resultado observado fue la inactivación de la actividad biológica sobre GM10, comprobando que la molécula que causa la inhibición es de naturaleza proteica, por lo tanto podemos decir que se trata de una bacteriocina, a la que en adelante le llamaremos bacteriocina L4-2.

La caracterización fisicoquímica de la bacteriocina L4-2, demostró que la bacteriocina es estable aún a 80°C y a pH 3.0- 7.0. Estos resultados coincide con la bacthuricina F4 (Kamoun *et al.*, 2005). Además también se observó que la bacteriocina L4-2 es resistente a la liofilización y resuspensión ya que estas condiciones no alteraron su actividad antagónica. Esta misma característica fue observada por la bacthuricina F103 (Kaumon *et al.*, 2011) y la thuricina 7 (Cherif *et al.*, 2001)

Un aspecto importante en la caracterización de la bacteriocina L4-2 es la inhibición que le causa al cultivo de *L. monocytogenes* ya que podría tratarse de una bacteriocina clase II de acuerdo a la clasificación de las bacteriocinas sintetizadas por las Bacterias Ácido Lácticas. Dentro de las bacteriocinas producidas por especies de *B. thuringiensis* solo 5 de las 18 inhiben *L. monocytogene*, éstas son: thuricina S, thurincina H, entomocina 110, thuricina 7 y entomocina 9 (Salazar-Marroquín *et al.*, 2016).

Desde el punto de vista del modo de acción, nuestra bacteriocina mostró ser bactericida y bacteriolítica (Fig. 16 A y B). Resultados similares se registraron para entomocina 110, thuricina Bn1, thuricina 7, y entomocina 9 (Ugras *et al.*, 2012, Cherif *et al.*, 2003 y Cherif *et al.*, 2001). Por otra parte, sólo thuricin 17 causa actividad bacteriostática además de la bacteriocida pero no bacteriolítica. (Gray *et al.*, 2006). Por lo tanto, el modo de acción de las bacteriocinas depende de: i) concentración de bacteriocina y ii) el estado fisiológico de la cepa sensible. En general, las bacteriocinas de *B. thuringiensis* presentan actividad bactericida y los efectos bacteriolíticos pudiesen depender de la concentración (Gray *et al.*, 2006).

En cuanto a las fase crecimiento donde se produce, la bacteriocina L4-2, está asociada a la fase logarítmica (Fig. 18). Contrariamente a otras bacteriocinas, alcanza su máxima producción al inicio de la fase estacionaria. Los resultados mostraron diferencia a los observados para thuricin 7 cuya actividad, no pudo ser detectado durante la fase de

crecimiento exponencial sino al final de esta fase y alcanzó su punto máximo durante la mitad de la fase estacionaria (Cherif *et al.*, 2001). Otros reportes sobre producción de bacteriocinas como la thuricina 439 muestran que inicia su actividad al final de la fase logarítmica y mantiene su producción durante la fase estacionaria (Ahren *et al.*, 2003). De acuerdo a lo reportado por Kamoun *et al.*, (2011), la actividad más alta de la bacthuricina F103 se produjo después de 8 h de cultivo, posteriormente se observó una disminución gradual al final de la fase logarítmica y principio de la fase estacionaria, lo que sugiere que la molécula antibacteriana podría ser un metabolito secundario.

La producción de la bacteriocina L4-2 se inició en la fase logarítmica temprana, típica de un metabolito primario y continuó hasta el comienzo de la fase estacionaria. La mayor actividad bacteriocina se produjo al final de la fase logarítmica de crecimiento similar a la entomocina 110 (Cherif *et al.*, 2008), entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003), tochicina (Paik *et al.*, 1997) y thuricina S (Chehimi *et al.*, 2007).

Hasta este punto se trabajó con el total de proteínas producidas por la cepa L4-2, coincidiendo en que entre ellas se encontraba la bacteriocina de interés; el reto siguiente fue su purificación. Para ello, usamos filtros “Centricon” y de esta manera, los separamos en bloques de diferentes tamaños de proteínas. De acuerdo a lo reportado por otros autores, la bacteriocina más pequeña es la thuricina con 0.95 kDa (Favret y Younsten, 1989) y la más grande sintetizada por Bt es la entomocina 9 con 12.4 kDa (Cherif *et al.*, 2003). Con esta información y nuestros resultados identificamos que el tamaño de bacteriocina L4-2 era igual o mayor de 3 kDa por lo que sólo se pudo descartar que se tratara de la thuricina reportada por (Favret y Younsten, 1989).

Basándonos en los resultados obtenidos en la actividad probada durante la cinética de crecimiento, iniciamos la purificación en el HPLC corriendo las proteínas obtenidas de dos cultivos de la cepa L4-2 a diferentes tiempos de incubación uno de 12 h donde sabíamos que teníamos la bacteriocina y otro de 24 que no inhibía GM10. Al analizar los cromatogramas obtenidas del HPLC de ambas muestras y compararlas, logramos identificar la bacteriocina producida por L4-2 en el pico que corresponde a los 19.929 min. También se pudo comprobar que la bacteriocina L4-2 era diferente a la nisina, única bacteriocina aprobada por la FDA para usarse como conservador de alimentos.

Tanto la nisina así como la bacteriocina L4-2 inhibieron la cepa GM10. Se obtuvo un halo de inhibición muy parecido en cuanto a tamaño; sin embargo, la diferencia entre ellas es que la nisina se aplicó a una concentración de 1.948mg/mL y la bacteriocina L4-2 a 0.033mg/mL, esto indica que esta última es 59 veces más potente.

Con este método de purificación, la bacteriocina libre de las demás moléculas seguía siendo activa aunque la concentración (0.033mg/mL) no era suficiente para realizar la identificación de la secuencia y masa molecular, lo que nos llevó a repetir la aplicación de la muestra en el HPLC hasta obtener una concentración de la bacteriocina L4-2 de 0.574 mg/mL, necesaria para analizarla por el espectrómetro de masas.

La masa molecular de la bacteriocina L4-2 fue de 3.138 kDa (Fig. 26), aunque es muy cercana a la de thuricina S que es de 3.137 kDa (Chehimi *et al.*, 2012) y thuricina Bn1 de 3.139 kDa (Ugras *et al.*, 2013), no coincide con ninguna de las 18 bacteriocinas sintetizadas por Bt reportadas a la fecha. Sin embargo en cuanto a estabilidad a cambios de pH son muy diferentes, la thuricina S es estable a valores de 3.0 a 10.5 (Chehimi *et al.*, 2007), la thuricina Bn1 de 5.0 a 9.0 (Ugras *et al.*, 2013), mientras que la bacteriocina L4-2 que nosotros reportamos mantuvo su actividad a valores de pH de 3.0 a 7.0.

La bacteriocina L4-2 fue sometida a experimentos de secuenciación, los cuales revelaron incertidumbre y solo logramos identificar 3 aminoácidos, (Leu/Leu/Ala). Lo anterior puede ser debido que se trate de un péptido cíclico o molécula compuesta como el caso de la enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis* (Dimov *et al.* 2005; Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

Los resultados de masa molecular, espectro de actividad y modo de acción, sugieren que la proteína L4-2 es un nuevo tipo de bacteriocina.



## 10. CONCLUSIONES

1. 26/48 cepas de Bt estudiadas produjeron compuestos antimicrobianos tipo bacteriocina contra miembros de su misma especie
2. 9/26 tuvieron actividad biológica contra MRSA y *L. monocytogenes*
3. 0/48 inhibió Gram negativas probadas
4. 8/26 cepas presentaron bacteriocinas de amplio espectro, inhibiendo a las tres cepas de *B. thuringiensis* a MRSA y *L. monocytogenes*
5. En base a su actividad biológica, la bacteriocina L4-2 fue seleccionada para posteriores estudios microbiológicos y bioquímicos
6. Desde el punto de vista de la síntesis, la bacteriocina L4-2 apareció en el sobrenadante a las 4 h de cultivo fase logarítmica, y continuó hasta el inicio de la fase estacionaria
7. La bacteriocina desapareció a las 24 h de incubación
8. El modo de acción de la L4-2 está relacionado a un efecto bactericida y bacteriolítico. Éste último pudiera depender de la concentración de la bacteriocina
9. Es termoestable ya que conserva su actividad aún a 80°C y no sufre cambios en su actividad cuando es expuesta a cambios de pH manteniéndose activa desde 3.0 a 7.0.
10. La bacteriocina es estable después de ser liofilizada.
11. La característica más relevante es su masa molecular de 3.138 kDa, ya que ninguna de las bacteriocinas de Bt reportadas a la fecha presenta esta masa.
12. Los resultados de masa molecular, características de especificidad y modo de acción, sugieren que la proteína L4-2 es un nuevo tipo de bacteriocina.

## 11. PERSPECTIVAS

Como ya se mencionó, la identificación de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana es una demanda creciente, esto debido a la aparición de resistencias, lo que sitúa a las bacteriocinas como tema innovador de investigación por su comportamiento frente a patógenos comunes.

A la fecha los estudios se han enfocado principalmente en su aplicación como conservadores de alimentos, también llamados probióticos; aunque cabe mencionar que su potencial es tan amplio como para considerar su aplicación como desinfectantes de superficies en hospitales, cocinas, empacadoras de alimentos y en general en áreas físicas donde la inocuidad sea requerida.

La información disponible indica que existen grandes posibilidades de éxito. Por lo que es interesante considerar las bacteriocinas en la elaboración de productos biotecnológicos dirigidos al control de patógenos. Para lograr esto, se requiere de mayor investigación como por ejemplo estudios dirigidos a delucidar los mecanismos celulares implicados en la respuesta al medio externo, así como también conocer cual es el comportamiento de la bacteria productora de bacteriocinas ante la presencia de otras células.

## 12. BIBLIOGRAFIA

Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, and Gálvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol. Rev. 35, 201-232.

Ahern M, Verschueren S, and van Sinderen D. 2003. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. FEMS Microbiol. Lett. 220:127-31.

Al-Mahrous M, Sandiford SK, Tagg JR, and Upton M. 2010. Purification and characterization of a novel delta-lysin variant that inhibits *Staphylococcus aureus* and has limited hemolytic activity. Peptides. 31:1661-1668.

Barboza-Corona JE, Vázquez-Acosta HD, Bideshi K and Salcedo-Hernández R. 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Archives of Microbiology. 187:117–126.

Barboza-Corona JE, de la Fuente-Salcido N, Alva-Murillo A, Ochoa-Zarzosa A and Lopez-Meza JE. 2009. Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. Vet. Microbiol. 138:179-183.

Bernhard K, Jarret P, Meadows M, Butt J, Ellis DJ, Roberts GM, Pauli S, Rodgers P, and Burges HD. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. J. Invertebr. Pathol. 70:59–68.

Bravo A, Sarabia S, López L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Núñez-Valdez ME, Soberón M and Quintero R. 1998.

Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4965-4972.

Callewaert R, Holo H, Devrees e B, Van Beeumen J, Nes I, and De Vuyst L. 1999. Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method. *Microbiology.* 145:2559–2568.

Callewaert R and De Vuyst L. 1999. Expanded bed adsorption as a unique unit operation for the Isolation of bacteriocins from fermentation media. *Bioseparation*, 8:159–168.

Cerón J, Ortíz A, Quintero R, Güereca L, and Bravo A. 1995. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3826–3831.

Chaufaux J, Marchal M, Gilois N, Jehanno I, and Buisson C. 1997. Reasearch on natural strains of *Bacillus thuringiensis* in different biotopes throughout the world. *Can J Microbiol.* 43:337–343.

Cehimi, S, Delalande F, Sable S, Hajlaoui MR, Van Dorselaer A, Limam F, and Pons AM. 2007. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* 53:284-290.

Cehimi S, Limam F, Lanneluc I, Delalande F, van Dorselaer A, and Sablé S. 2012. Identification of three novel *B. thuringiensis* strains that produce the thuricin S. bacteriocin. *Bt Research.* 3:3-10.

Chen H and Hoover DG. 2003. Bacteriocins and their applications. *Comprehensive Reviews and Foods Science and Foods Safety.* 2:82-100.

Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S and Boudabous A. 2001. Thuricin 7: A novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:243-247.

Cherif A, Chehimi S, Limem F., Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D, and Boudabous A. 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9. *J. Appl. Microbiol.* 95:990-1000.

Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D and Boudabous A. 2008. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110. *Microbiol. Res.* 163:684-692.

Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nez IS, and Hernández PE. 2001. Review; Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International.* 74:281-305.

Cotter PD, Hill C, and Ross RP. 2005. Bacteriocins: Developing Innate immunity for food. *Nature Reviews of Microbiology.* 3:777-788.

De la Fuente-Salcido N, Alanís-Guzmán MG, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R, Bautista-Justo M, and Barboza-Corona JE. 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch. Microbiol.* 190:633-640.

Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ and Hugenholtz. 1996. Application of the bacteriocin nisin. *Antonie Leeuwenhoek.* 69:193-202.

Delves-Broughton J. 1990. Nisin and its use as a food preservative. *Food Technol.* 44:100-112.

De Vuyst L, Callewaert R, and Crabbé K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*. 142:817-827.

De Vuyst L and Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 13:194-9.

Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, and Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*. 24:85-106.

Enserink M. 1999. Promising antibiotic candidate identified. *Science*. 286:2245-2247.

Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, and Kozoel MG. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93:5389–5394.

Favret, ME and Yousten AA. 1989. Thuricin: The bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol*. 53:206-216.

Feitelson, JS. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. In Kim L. *Advanced engineered pesticides*. (eds) Marcel Dekker Inc., New York, USA. p. 63-71

Fischbach MA and Walsh CT. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*. 325:1089-93.

Franz CMAP, van Belkum M.J, Holzapfel W.H., Abriouel H. and Gálvez A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping into a new classification scheme. *FEMS. Microbiol Rev*. 31:293–310.

Gauri SS, Mandala SM, Pati BR and Dey S. 2011. Purification and structural characterization of a novel antibacterial peptide from *Bellamyia bengalensis*: Activity against ampicillin and chloramphenicol resistant *Staphylococcus epidermidis*, *Peptides*, 32:691-696.

George RH, Symonds JM, Dimock F, Brown JD, Arabi Y, Shinagawa N, Keighley MRB, Alexander-Williams J and Burdon DW. 1978. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *British Medical Journal*. 1:695.

Gratia, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol.* 93: 1040–1041.

Gratia A. 1946. Techniques selectives pour la recherche systematique des germes antibiotiques. *C.R. Seances Soc. Biol. Paris.* 140:1053-1055.

Gray EJ, Lee KD, Souleimanov AM, Di Falco MR, Zhou X, Ly A, *et al.* 2006. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: Isolation and classification. *J. Appl. Microbiol.* 100:545-554.

González-Martínez BE, Gómez-Treviño M and Jiménez-Salas Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista de Salud Pública y Nutrición.* 4:2.

Gordon DM, and O'Brien CL. 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 152:3239-44.

Hamon Y, and Peron Y. 1963. Etude du pouvoir bacteriocinogene dans le genre *Listeria*. II. Individualite et classification des bacteriocines en cause. *Ann. Inst. Pasteur Paris.* 104:55-65.

Hikmate A, Charles MAPF, Nabil Ben O and Gálvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol Rev 35:201–232.

Homedes N, and Ugalde A. 2013. Boletín electrónico latinoamericano para fomentar el acceso y el uso adecuado de medicamentos. Boletín Fármacos; Accessed August 16, 2015. <http://www.saludyfarmacos.org/boletin-farmacos/>

Ibarra JE, del Rincón MC, Ordúz S, Noriega D, Benintende G, Monnerat R, Regis L, de Oliveira MF, Lanz H, Rodriguez MH, Sánchez J, Peña G, and Bravo A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. Appl. Environ. Microbiol. 69:5269-5274.

Jack RW, Tagg JR, and Ray B. 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. Microbiological Reviews. 59:171-200.

Jetten, AM, Vogels GD and De Windt F. 1972. Production and purification of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. J. Bacteriol. 112:235-242.

Jenssen H, Hamill P and Hancock EWR. 2006. Peptide antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 19:491-511.

Kamoun F, Mejdoub H, Aouissaoui H, Reinbolt J, Hammami A and Jaoua S. 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. 98:881-888.

Kamoun F, Fguira IB, Hassen NBB, Mejdoub H, Lereclus D and Jaoua S. 2011. Purification and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* bacteriocin active against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens*. Appl. Biochem. Biotechnol. 165:300-14.

Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of acid lactic bacteria. Biochimie. 70:337-349.



Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12:39-86.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

Lee H, Churey JJ and Worobo RW. 2009a. Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. FEMS Microbiol. Lett. 299:205-213.

Lee KD, Gray EJ, Mabood F, Jung WJ, Charles T, Clark SR, Ly A, Souleimanov A and Zhou X. 2009b. The class IId bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. Planta. 229:747-755.

Lewus CB. 1991. Characterization of bacteriotin produced by lactic acid bacterial isolated from meat. PhD dissertation, Rutgers, The State University, New Brunswick, New Jersey.

Liu M, Wang J, Liu J, Yao JM and Yu ZL. 2006. Expression of *Bacillus subtilis* JA18 endo-beta-1,4-glucanase gene in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. Ann. Microbiol. 56:41-45.

López JE, Ochoa A, Santoyo G, Anaya JL, Medina E, Martínez M, and Loeza PD. 2008. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 39:49-57.

Maldonado-Blanco MG, Galan-Wong LJ, Rodriguez-Padilla C, and Quiroz-Martínez H. 2002. Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval *Aedes aegypti* in the laboratory. J. Am. Mosq. Control Assoc. 18:352-358.

Malke H, Starke R, Jacob HE and Kohler W. 1974. Bacteriocine-like activity of group A streptococci due to the production of peroxide. *J. Med. Microbiol.* 7:367-374.

Marki F, Hanni E, Fredenhagen A and Van Oostrum J. 1991. Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B, duramycin C, and cinnamycin as direct inhibitors of phospholipase A2. *Biochemical Pharmacology.* 42: 2027-2035.

Martin PAW and Travers RS. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2437–2442.

Martínez-Cardenas JA, de la Fuente- Salcido NM, Salcedo-Hernández R, Bideshi DK and Barboza-Corona JE. 2012. Effects of physical culture parameters on bacteriocin production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* after cellular induction. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39:183–189.

Matthewes KR. 2004. Here, there, everywhere: antibiotic-resistant foodborne pathogens. *Food technology.* 58:104-108

Moll GN, Konings WN, and Driessen AJM. 1999. Bacteriocins: Mechanism of membrane insertion and pore formation. *Ant. van Leeuwenhoek.* 76:185–198.

Moreyra Dos Santos. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus sp.* 347 de origen cárnico. Universidad Complutense de Madrid. Tesis doctoral.

Mørtvedt CI, Nissen-Meyer J, Sletten K, and Nes IF. 1991. Purification and amino acid-sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl Environ Microbiol.* 57:1829–1834.

Nes IF, Yoon S-S and Diep DB. 2007. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Sci Biotechnol.* 16:675–690.

Paik HD, Bae S.S, and Pan JG. 1997. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:294-298.

Parente E. and Ricciardi A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52:628–638.

Pereyra-Alferez B, Sánchez-Alejo E, Flores A, Iracheta-Cárdenas M, Galán-Wong LJ, Morales L, Luna H, Rodríguez C, Medrano-Rolán H, Arévalo K and Tamez R. 1999. Isolation and characterization of mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.). In: *Biotechnology of Bacillus thuringiensis*. Y. Ziniu, S. Ming and L. Ziduo (Eds). Science Press. New York. 7:21-25.

Pugsley AP.1984. The ins and outs of colicins. II. Lethal action, immunity and ecological implications. *Microbiol. Sci.* 1:203-205.

Quadri LEN, Sailer M, Terbiznik MR, Roy KL, Vederas JC and Stiles ME. 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.* 177: 1144–1151.

Raddadi N, Cherif A, Ouzari H, Marzorati M, Brusetti L, Boudabous A and Daffonchio D. 2007. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. *Ann. Microbiol.* 57:481-494.

Ramírez-Rosales A and Cantú-Llanos E. 2012. Mortalidad intrahospitalaria en pacientes con diarrea asociada a infección por *Clostridium difficile*. *Gastroenterol Mex.*77:60-65.

Rea MC, Sit CS, Clayton E, O'Connor PM, Whittall RM, and Vederas JC. 2010. Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. PNAS. 107:9352–9357

Rea M, Ross RP, Cotter P, and Hill C. 2011. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria, p 29 –53. In Drider D, Rebuffat S (ed), Prokaryotic antimicrobial peptides. Springer, New York, NY.

Riley MA, and Wertz JE. 2002. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. Annual Reviews of Microbiology. 56:117-137.

Sablon E, Conteras B and Vandamme E. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 68: 22–60.

Salazar-Marroquín EL, Galán-Wong LJ, Moreno-Medina VR, Reyes-López MA, and Benito Pereyra-Alfárez B. 2016. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: Generalities and potential applications. Reviews in Medical Microbiology.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Ziegler DR, and Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775–806.

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, and Chiarello L. 2006. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings. Am J Infect Control. 35:S165-93.

Tamez-Guerra P, Iracheta M, Pereyra-Alfárez B, Galán-Wong L, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra RS and Rodríguez-Padilla C. 2004. Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for lepidopteran and coleopteran larvae. J. Invertebr. Pathol. 86:7-18.

Tagg JR, Dajani AS and Wannamaker LW. 1975. Bacteriocin of a group B streptococcus: partial purification and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:764-772.

Tagg JR, Dajani AS and Wannamaker LW. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol.* 40:722.

Tian BY, Yang JK, Lian LH, Wang CY, Li N, and Zhang KQ. 2007. Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:372–380.

Ugras S, Kazim S, Hatice K and Zihni D. 2013. Purification and Characterization of the Bacteriocin Thuricin Bn1 Produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bn1 Isolated from a Hazelnut Pest. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23:167–176.

Vady valoo V, Arous S, Gravesen A, Héchard Y, Chauchan HR, Hastings JW, and Rautenbach M. 2004. Cell surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology*, 150:3025-3033.

van Belkum MJ, Kok J, and Venema G. 1992. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:572-577.

van Belkum MJ, and Stiles ME. 2000. Nonantibiotic antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 17:323-335.

Vasily S, Vladimir M, Boris E, Edward S, Yulia S, Norman S, Konstantin M, Galina S, Alla S, and Alexander A. 2007. Antimycobacterial activity of bacteriocins and their complexes with liposomes. *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 59:919–925

Walter VL and Crosa JH. 1991. Colicin V Virulence Plasmids. *Microbiological Reviews*. 5:437-450.

Wiedemann I, Breukink E, Van Kraaij C, Kuipers OP, Bierbaum G, De Kruijff B, and Sahl HG. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:1772-1779.

Xue J, Hunter I, Steinmetz T, Peters A, Ray B, and Miller KW. 2005. Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin AcH resistance. *Applied And Environmental Microbiology*. 71:1283-1290.

Zhou Y, Choi Y-L, Sun M and Ziniu Y. 2008. Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:563–572.

### **13. RESUMEN BIOGRÁFICO**

M en C Elma Laura Salazar Marroquín

Candidato a obtener el grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Microbiología

#### **Título de Tesis**

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* Y SU POTENCIAL COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS.

#### **DATOS PERSONALES:**

Nacionalidad: Mexicana

Fecha de nacimiento: 28 de marzo de 1961.

#### **PUESTO ACTUAL:**

Profesor investigador Titular A, Centro de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional.

## **ESTUDIOS REALIZADOS:**

- Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León 1982.
- Maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, 2002.
- Maestría en Administración General en la Facultad de Postgrado de Ciencia Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Abril 2004.

## **PUESTOS ADMINISTRATIVOS DESEMPEÑADOS:**

- Jefe del departamento de Biotecnología del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional. de Octubre de 2003 a enero de 2006
- Jefe del Departamento de Docencia del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional de marzo de 2006 a mayo de 2007
- Subdirectora de vinculación del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional de junio del 2007 al enero del 2012.

## **EXPERIENCIA PROFESIONAL**

- Auxiliar en el proyecto “Asociación micorriza entre el hongo *Pisolithus tinctorius* y el nogal *Carya illinoensis*” UANL.
- Auxiliar en el laboratorio de Microbiología del suelo, UANL.1979.
- Investigación y desarrollo de nuevos productos de poliuretano en la empresa Química Pumex, Monterrey, Nuevo León. 1980-1982
- Prácticas profesionales en el Laboratorio del Hospital de Ginecología del IMSS, Monterrey, Nuevo León. 1982-1983.
- Departamento de Protección Ambiental, PEMEX. 1985.



- Desempeño de actividades docentes frente a grupo en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional del 2003 a la fecha.

Asignaturas:

- Biotecnología Molecular y Celular
- Bionegocios
- Temas Selectos en Biotecnología
- Introducción a la Bioética
- Participación en el proceso de acreditación del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica y su ingreso en el Programa Nacional de Posgrado en el periodo 2006-2010
- Coordinadora de la Comisión de “Revisión del Manual del Estudiante” del Centro de Biotecnología Genómica de enero 2006 a julio de 2007.
- Coordinadora de la comisión de “Revisión del plan curricular (plan de estudios)” del Centro de Biotecnología Genómica de enero 2006 a junio de 2007.
- Coordinadora de la comisión de “Comisión de Admisión y Seguimiento a estudiantes” del Centro de Biotecnología Genómica de enero 2006 a junio de 2007.

### **MIEMBRO DE COMITÉ DE TESIS**

- Miembro de la Comisión de Revisión de Tesis del estudiante de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica. Humberto Martínez Montoya. 2009. Diseño y aplicación de marcadores microsatélites para la cochinilla rosada del hibisco *Maconellicoccus hirsutus* (green) (*Hemiptera:pseudococcidae*)
- Miembro de la Comisión de Revisión de Tesis del estudiante de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica. Cesar Cerezo Camacho 2010. Epidemiología molecular para la pre-determinación de la suspensión de la Ivermectina (Mectizan) en el foco endémico de Oncocercosis del sur de Chiapas.
- Miembro de la Comisión de Revisión de Tesis del estudiante de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica. Osvaldo Avalos de León 2011. Tema: Identificación y análisis de genes productores de proteasas tipo subtilina y tipo

tripsina en el hongo *Metarhizium ansiopliae* como factor de virulencia para su aplicación en el control biológico de insectos plaga.

#### **CURSOS TOMADOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS:**

- Curso teórico-práctico “Detección de Antimicrobianos” impartido en el Instituto de Biotecnología de la UANL, del 27 febrero al 1° de marzo de 2012.
- “Microscopia de Fluorescencia y Confocal” impartido por la compañía Alta Tecnología en Laboratorios, S.A de C.V. con duración de 8 hrs llevado a cabo el 26 y 27 de enero de 2012 en la instalaciones del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto de Biotecnología Genómica del IPN.
- Curso teórico-práctico “Detección de Antimicrobianos” impartido en el Instituto de Biotecnología de la UANL, del 27 febrero al 1° de marzo de 2012.
- Taller de electroforesis 2D del 13 al 14 de noviembre de 2014 al Instituto de Biotecnología de la UANL en el que se procesaron las proteínas obtenidas en el laboratorio de Medicina de Conservación del Centro de Biotecnología Genómica del IPN.

#### **PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS:**

- 25° Encuentro Nacional de Investigación Científica y Tecnológica del Golfo de México con el tema: Identificación de bacteriocinas producidas por *Bacillus thuringiensis*. Llevado a cabo los días 23 y 24 de mayo de 2013 en CICATA –IPN Altamira Tamaulipas.
- Asistencia al Congreso Internacional Anual Meeting & Clinical Lab Expo 2013 los días 29 30 y 31 de Julio llevado a cabo en la Cd de Houston Texas.
- IV Simposium Internacional Biomedica de Referencia “Laboratorio clínico frente a los paradigmas del siglo XXI” Cd de México, D.F., 8 de noviembre de 2013.
- VIII congreso internacional de ingeniería Bioquímica, XIX congreso nacional de ingeniería bioquímica, XII Jornadas científicas de biomedicina y biotecnología

molecular. Realizado en Mazatlán Sinaloa los días 9,10 y 11 de abril de 2014. Modalidad Cartel, “Búsqueda y caracterización de bacteriocinas producidas por *Bacillus thuringiensis*.”, organizado por el Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos AC.

- XXVI Encuentro Nacional de Investigación Científica y Tecnológica del Golfo de México, llevada cabo en el ICEST en Tampico, Tamaulipas, el día 22 de mayo de 2014. Modalidad Cartel Identificación de bacteriocinas con actividad biológica contra *Staphylococcus aureus*.

- Congreso Internacional 6ª Food Science Biotechnology Safy realizado del 8 al 10 de octubre de 2014 en la Cd. de Monterrey Nuevo León. Participación en modalidad de Cartel con el trabajo titulado, “Optimization of method for characterization of bacteriocins”

- 1ª Biotechnology Word Symposium, 9ª Encuentro nacional de Biotecnología. Realizado en la Cd. de Tlaxcla los días 13 al 16 de octubre de 2014. En la modalidad Cartel “Production and mode of inhibition of *Bacillus thuringiensis* bacteriocin”. Realizado en el centro de investigación en biotecnología aplicada Tlaxcala del Instituto Politécnico nacional.

- 1º Congreso Nacional de Salud dentro del marco de la XV Semana Académica de la carrera de QFB y LNCA, organizado por la Universidad Autónoma de Tamaulipas el 21 y 22 de octubre de 2015, en la Cd. de Reynosa Tam. Participación Oral con el tema “Bacteriocinas”.

## **PREMIOS RECIBIDOS**

Premio a la mejor tesis de investigación científica en el área de Biotecnología Genómica en el estado de Tamaulipas, con el título “Evaluación de nueve marcadores microsatélites para la genotipificación de ganado bovino” **2003**.

Primer lugar obtenido por la presentación del cartel “Monitoreo del Virus de la Mancha Blanca por medio de Diagnóstico Molecular en Camarón procedente de Estados Unidos y Venezuela” durante el Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria 2004, realizado en la Cd. de Reynosa Tamaulipas los días 13-15 de octubre de 2004.

## DESARROLLO TECNOLÓGICO

- Desarrollando investigación, métodos y técnicas aplicadas durante los años 2001 y 2002 que han derivado en desarrollos tecnológicos para ofrecer un servicio al sector pecuario en la asignación de paternidad mediante el análisis de frecuencias alélicas utilizando marcadores microsatélites de uso internacional.

## ARTÍCULOS

- Publicación de las Frecuencias Alélicas de los Marcadores Microsatélites encontradas en las raza Charolais y Beefmaster en la CaDBase Genetic Diversity in Cattle. 2003. Roslin Institute, Edinburgh. <http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/acknow.html>
- Elma Laura Salazar Marroquín, Maurilio González Paz, Alejandro del Bosque González, Diana Rezséndez-Pérez, Hugo Barrera-Saldaña y Ana María Sifuentes-Rincón. Evaluación de marcadores microsatélites para la identificación de individuos, en dos razas de ganado de carne de la región noreste de México” en la revista Técnica Pecuaria en México. 2004;42(3):429-435
- Reyes-López, M. A.; Salazar-Marroquín, E. L.; Hernández-Mendoza, J. L. Encefalopatías espongiiformes transmisibles: Enfermedad Crónica Desgastante. 2006 en la revista Avances en Investigación Agropecuaria (AIA) de Colima. 10:3-12
- M. A. Reyes-López, E. L. Salazar-Marroquín, A. A. Oliva-Hernández, N. Salinas-López & J. A. Narváez-Zapata. 2009. White-spot syndrome virus diagnostics in frozen shrimp stocks imported to Mexico. Journal of Food Vol. 7 (2): 89–94.
- Elma Laura Salazar-Marroquín, Luis J. Galán-Wong, Víctor Ricardo Moreno-Medina, Miguel Ángel Reyes-López, and Benito Pereyra-Alfárez. 2016. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: Generalities and potential applications. Reviews in Medical Microbiology (**Artículo aceptado**)
- Elma Laura Salazar-Marroquín, Luis J. Galán-Wong, Virgilio Bocanegra-García, Víctor Ricardo Moreno-Medina, Miguel Ángel Reyes-López, and Benito Pereyra-

Alfárez. 2016. Characterization of a new bacteriocin synthesized for the mexican *Bacillus thuringiensis* strain L4-2 active against *Listeria monocytogens* and a meticilin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiological Research (**Artículo enviado**).

### **CAPÍTULOS DE LIBROS**

Salazar Marroquín E.L., Moreno Medina V.R., Reyes López M.A., 2010. Secuenciación. Cap. V. pp 123-147. En: Reyes-López, M. A., Hernández-Mendoza, J.L., Mayek-Pérez, N. (editores). Fundamentos de la Biotecnología Genómica. Plaza y Valdés-FOMIX-Gobierno del Estado de Tamaulipas. México. ISBN: 978-607-402-319-0

José Arcadio Valdez Franco, Elma Laura Salazar Marroquín, Laura María Trejo Ávila. 2014. Empresas Biotecnológicas. Capítulo: “Bioinformática y Estado de prospección”. Dr. Luis J. Galán Wong (editor). Segunda edición Universidad Autónoma de Nuevo León. pp 274-284.

Hamlet Avilés-Arnaut, Lucila A. Galán-Franco, Luis J. Galán- Wong, Susana de la Torre Zavala, Nelly María Galán Franco, Elma Laura Salazar Marroquín, Kena Casarrubias-Castillo, Johon P. Délano-Frier. 2015. Biotecnología del tequila. Capítulo: Presente y futuro del tequila. Dr. Luis J. Galán Wong (editor). Universidad Autónoma de Nuevo León. pp 147-165.

### 13. APENDICE

#### **Respaldo de material biológico**

Una colonia de cada cepa fue inoculada, por separado, en 5 mL de CN e incubados 16-18 h a 30°C a 180 rpm de agitación. A un mL del cultivo le fue agregado 1 mL de glicerol al 40% y almacenados a -20°C.

#### **Agar suave**

100 mL de CN fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante, a este volumen le agregamos 1.4 g de agar-agar, lo fundimos y esterilizamos. Llenamos tubos con 6 mL de agar suave, luego volvimos a esterilizar y almacenamos para su uso posterior (Fig. 28).



**Figura 28.** Tubos con agar suave

## **Método de difusión en pozo.**

### **Preparación de cepas indicadoras.**

Cepas indicadoras (HD73, HD1, GM10, Gram negativas (*Salmonella typhi*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella arizonae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*) y Gram positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) y *Listeria monocytogenes*), fueron cultivadas en 5 mL de CN, 12 h a 30°C y 180 rpm, luego fueron transferidas a matraz con 45 mL de CST e incubadas a 30°C por 8 h en agitación constante a 180 rpm. De este cultivo se tomaron 200 µl para inocularse en 6 mL de Agar Soya Trypticase (AST) suave fundido a 45°C el cual fue vertido sobre una caja Petri que contenía 15 mL de AN. Una vez solidificado el agar suave, realizamos perforaciones (6 pozos de 8 mm de diámetro) con un arreglo de 5 en la periferia y 1 en el centro de la caja; las cajas fueron incubadas 2 h a 37°C.

### **Preparación de cepas productoras de bacterioinas.**

Las 48 cepas de la colección fueron cultivadas en 5 mL de CN, 12 h a 30°C y 180 rpm, luego fueron transferidas a matraz con 45 mL de CST e incubadas a 30°C por 12 h en agitación constante a 180 rpm. El sobrenadante de los 50 ml, fue precipitado con sulfato de amonio agregando 28 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  lentamente (1g/min) hasta alcanzar 80% de saturación, manteniendo a temperatura ambiente (~ 17 a 20°C). El precipitado fue colocado toda la noche a 4°C, centrifugado a 4°C durante 30 min a 10 000 g. El precipitado fue resuspendido en 2 mL agua Mili Q estéril y conservado a 4°C hasta la realización de la prueba de actividad.

Dializar la proteína precipitada antes de ser analizada en el HPLC, usando kit Mega Dialysis (Sigma-Aldrich. USA) de 1000 Da en 1 L de agua miliQ esteril durante 24 h, tiempo en el cual cambiamos el agua cada 3 o 4 h (Fig. 29).



**Figura 29.** Diálisis de proteínas precipitadas

### **Prueba de actividad**

En las primeras pruebas de actividad probamos 200  $\mu$ l del sobrenadante de las cepas de la colección, previamente concentrado, hasta ajustar la concentración de proteínas a 500 ng/mL utilizando la técnica de Bradford, el cual fue depositado en cada uno de los pozos realizados al cultivo de las cepas indicadoras e incubado por 12 a 24 h hasta observar el halo de inhibición. Posteriormente realizamos las pruebas de actividad utilizando Caldo Soya Tripticas (CST) en lugar de (CN) y las proteínas precipitadas, con lo cual obtuvimos resultados más uniformes y constantes.

### **Confirmación del método**

Para confirmar que el método para identificar la presencia de bacteriocinas fuera correcto, realizamos la extracción de las bacteriocinas (entomocina 9, tochicina y thuricina) producidas por *B. thuringiensis*: HD868 (subsp. *tochigiensis*) productora de tochicina (Paik *et al.*, 1997); HD9 (subsp. *entomocidus*) productora de entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003) y HD1 (subsp. *thuringiensis*) productora de thuricina (Favret y Younsten, 1989) aplicando el mismo tratamiento que le dimos a las 48 cepas de la colección. Como cepa indicadora utilizamos HD73 reportada como cepa sensible a entomocina 9 y tochicina (Paik *et al.*, 1997 y Cherif *et al.*, 2003) (Fig. 30).





**Figura 30.** Prueba de actividad de la cepa L4-2, HD2, HD9 y HD868.

Lo más sobresaliente de estos resultados además de confirmar que el método que utilizamos funcionó perfectamente para la producción de entomocina 9, tochicina y thuricina, fue que nuestra cepa L4-2 demostró una actividad sobresaliente de entre las 4 cepas.

### **Gel de acrilamida (SDS-PAGE) (Tabla 12).**

#### **Preparación de soluciones**

**Buffer gel de separación:** (1.5 M Tris base pH8.8 0, 1% SDS), SDS 10% 2 mL + H<sub>2</sub>O aforar a 200 mL.

**Buffer gel superior:** (0.5 M Tris-HCl ph 6.8), Tris 3.0 gr ajustar el pH 6.8 con HCl + SDS 10 % 0.5 ml + H<sub>2</sub>O aforar a 50 mL.

**SDS 10%:** SDS 5.0 gr + H<sub>2</sub>O aforar a 50 mL

**Iniciador (APS): persulfato de amonio:** Persulfato de amonio 0.1 gr ó 0.05, H<sub>2</sub>O aforar a 1.0 mL ó 500 µL.

**Solución de acrilamida – bisacrilamida:** Acrilamida 29.2 gr total, Bisacrilamida 0.8 gr solución 30%, Acrilamida 37.5:1 bisacrilamida y de esta mezcla hacer solución al 30%. H<sub>2</sub>O aforar a 100 mL. Filtrar la solución a través de papel whatmman # 1, almacenarla en frasco oscuro en refrigerador.

**Buffer para tanque de electroforesis (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M glicina, 0.1% SDS):** Tris base 3 gr + glicina 14.4 gr + SDS 10.0 mL de solución + H<sub>2</sub>O aforar a 1000 mL. Estas cantidades son para 1X.

**Buffer Laemmli:** 62.5 mM Tris HCl, pH 6.8 + 25 % (v/v) glicerol + 2% (w/v) SDS + 0.01% (w/v) azul de bromofenol + 5% (v/v) beta-mercaptoetanol (agregar este al final, cuando ya tenga la mezcla lista).

**Solución madre para tinción coomasie blue R-250:** Coomasie 2.0 gr + H<sub>2</sub>O 200 mL, agitar y filtrar.

**Desteñidor I:** Metanol 500 mL + c. acético 100 mL + H<sub>2</sub>O aforar a 1000 mL. Para 500 mL, 250 mL metanol + 50 ml ac. Acético + H<sub>2</sub>O aforar a 500 mL

**Desteñidor IIp:** Metanol 500 mL + ac. Acético 70 ml + H<sub>2</sub>O aforar a 1000 mL  
Para 500 mL, 250 mL metanol + 35 ml ac. Acético + H<sub>2</sub>O aforar a 500 mL

**Tabla 12.** Preparación del Gel para cámara (C.B.C. Scientific modelo DASG-250)

Reactivos	SDS-PAGE(mL)		
	Gel para sellar la parte inferior	Gel de separación	Gel concentrador
H <sub>2</sub> O	1.6	13.2	4.6
Acrilamida 30%	2.0	16.0	1.19
Tris 1.5 M pH 8.8	1.3	10.0	-----
Tris 1 M pH 6.8	----	----	0.91
SDS 10%	0.05	0.4	0.07
APS 10%	0.05	0.7	0.15
TEMED	0.002	0.03	0.008
TOTAL	5	40	5

**Nota:** para gel nativo se omite el SDS 10%.

Preparación de la muestra: 20µL de muestra + 20 µL de buffer Lameli.

**Nota:** para condiciones nativas el buffer Laemmil se sustituye por (H<sub>2</sub>O 5.75 mL, Tris 1 M pH 6.8 1.25 mL, glicerol 3 mL, azul de bromofenol).

## **Zimograma**

**Gel nativo:** Además del marcador de peso molecular se cargan las muestras en ambos lados del gel. (Marcador, muestra 1, muestra 2 ....etc., 2 espacios vacíos, muestra 1, muestra 2, etc.

El gel con fue cortado en dos partes una conteniendo el marcador de PM y las muestras, el cual fue teñido con azul coomassie g 250 y la otra parte conteniendo solo las muestras se lavó 3 veces con buffer de fosfatos en agitación por 2 h y se colocó en una caja Petri estéril, el cual cubrimos con un cultivo de cepa indicadora GM10 en Agar Soya Tripticosa suave fundido. Incubamos 24 h. Esperando observar un halo de inhibición sobre la proteína (bacteriocina).

No logramos resultados favorables, nos enfocamos en cambiar el fijado y lavado del gel antes de ponerlo en contacto con el cultivo de la cepa indicadora. Probamos las siguientes técnicas reportadas:

Buffer de fosfatos 10mM pH 7.2/4h, (Kaumon *et. al.*, 2005). 25% isopropanol, 10% ácido acético) por 30 min, lavado 2 veces con agua destilada (Cherif et al., 2001). Gel fijado durante 1 h en 2-propanol al 20% y ácido acético al 10% por 30 min (Paik et al., 1997).

No logramos ver inhibición en el cultivo sobre el gel. Tal vez se deba a la concentración de la proteína depositada en el gel; Cherif y cols (2003) partieron de 5 L de cultivo y nosotros de 3 L.

## **Buffer para determinar estabilidad de la bacteriocina al pH**

*Buffer de citrato 50 mM pH 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0:*

Citrato de sodio 1M – 294.10 g/mol

50 mM 14.705 g/L en 100 mL. Para preparar 50 mL= 0.735 g

$294.10 \text{ g/mol} \times 0,05 \text{ M} \times 0.05\text{L} = 0.735 \text{ g}$

Ajustar pH.

*Buffer de fosfato 50 mM a pH 7.0:*

PM= 136.09 g/L 1 M

50 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 6.8 g/500mL

29.1 mL NaOH= 0.2 g/ 500 mL

Ajustar pH

*Buffer Tris HCl 50 mM pH 8.0 y 9.0:*

18.17 g/100 mL de Tris Ajustar PH

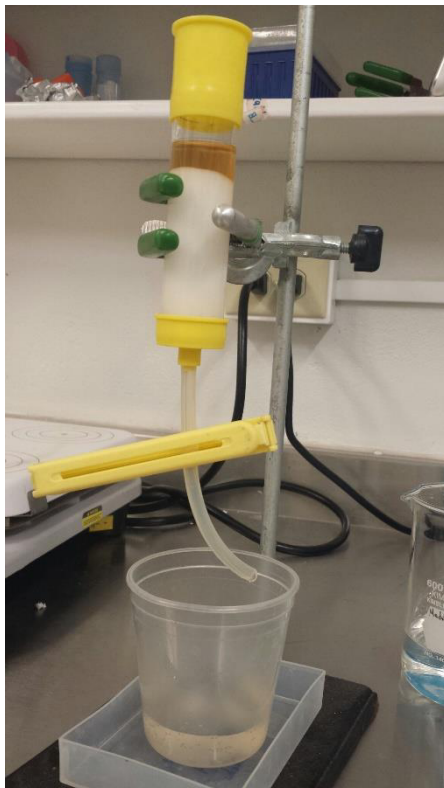
50 mM x 5 mL / 1500 mM = 166 mL

166 mL de 1.5 M Tris HCL pH 8

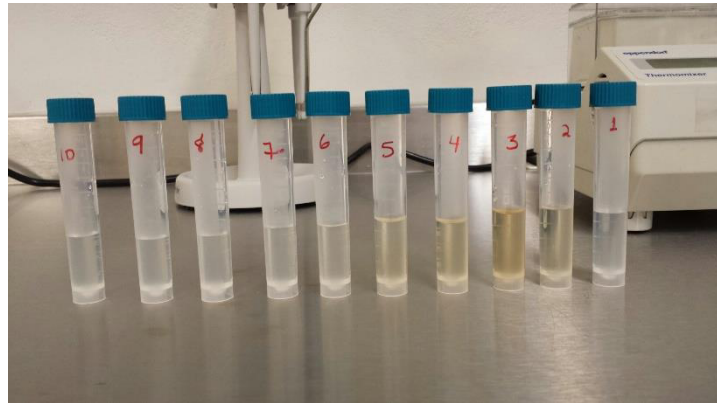
Ajustar PH

**Procedimiento para eliminar sales (Sulfato de amonio):**

Se utilizó una columna empacada con 15 g de SEFADEX 10G. Se hidrató con 150 mL de buffer de fosfatos pH 7 (Fig. 31). La proteína precipitada con  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , se diluyó en agua hasta que no quedara precipitado. Se midió la concentración de proteína en nanodrop (11.98 mg/ml). Se pasó la muestra por la columna regulando el flujo a 13 seg/mL. Se colectaron 10 muestras (Fig.32), a las que se les midió la proteína y la conductividad (Tabla 13).



**Figura 31.** Proteína precipitada con sulfato de amonio pasada por Columna de SEFADEX para eliminar sales.

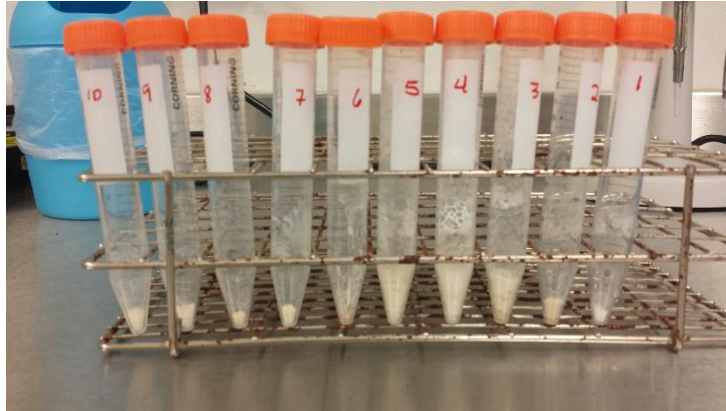


**Figura 32.** Muestras colectadas de la columna de SEFADEX

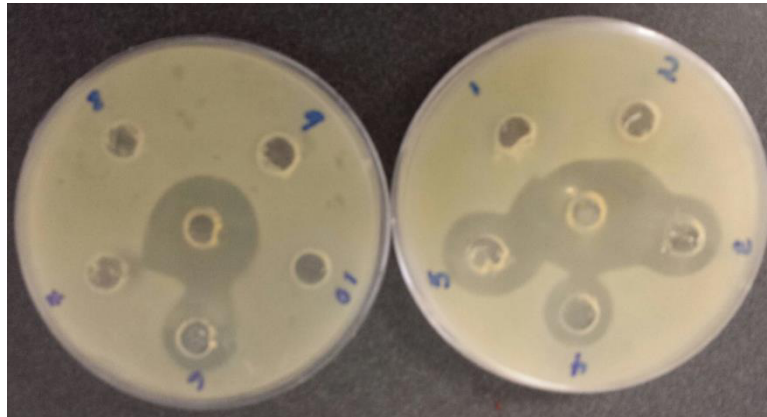
**Tabla 13.** Resultados de proteínas y conductividad. Proteína precipitada colectadas por SEFADEX.

Número de muestras	Proteínas 280 nm	Conductividad $\mu\text{S/cm}$
1	0.4458	130
2	1.2799	140
3	2.5928	390
4	2.3881	14 300
5	2.4887	310 000
6	1.7677	91 000
7	1.3002	1290
8	1.0426	270
9	0.8815	180
10	0.7724	180

Las 10 muestras fueron liofilizadas con 2 objetivos: concentrar proteínas y comprobar la estabilidad de la bacteriocina después de ser liofilizada a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Fig. 33 y 34).



**Figura 33.** Proteínas liofilizadas



**Figura 34.** Prueba de actividad biológica de proteína liofilizada, usando GM10 como cepa indicadora.

### Condiciones de Cromatografía líquida HPLC:

Columna ZORBAX 300SB-18 (4.6 X 150 mm) Agilent

Gradiente: 0 min 5% fase B = 95% fase A

45 min 100% fase B = 0% fase A

Preparación de fases A y B:

Fase A: 0.1 TFA + 10 mL Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) + 90 mL H<sub>2</sub>O

Fase B: 0.1 TFA + 90 mL Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) + 10 mL H<sub>2</sub>O

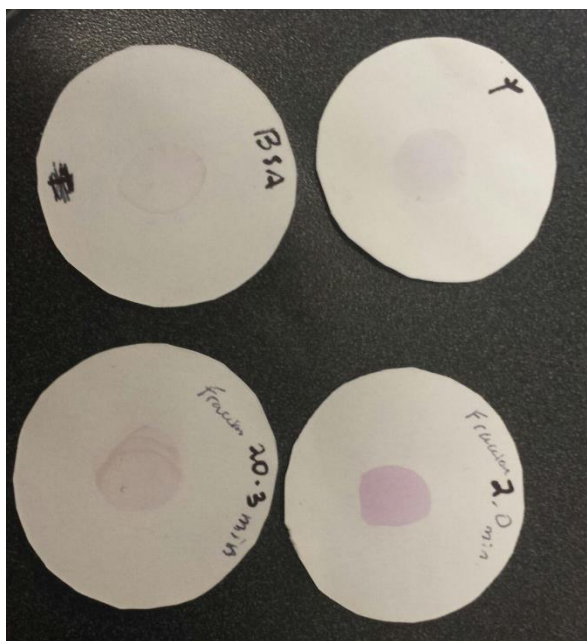
### Detección de presencia de aminoácidos en muestras colectadas del HPLC:

Utilizamos ninhidrina al 2% (0.2 g aforados a 100mL de agua)

Controles: BSA 0.5mg/mL y Triptofano

Muestras: colectada a los 2 min y a los 20.3min

En un papel filtro se depositó una gota (10 µL) de cada una de las muestras y de los controles. Estos fueron incubados a 80°C/30 min. Luego se les agregó una gota (10 µL) de ninhidrina y se incubaron a 80°C/15 min. Se observó cambio de color que revela la presencia de aminoácidos.



**Figura 35.** Prueba con ninhidrina revela presencia de aminoácidos

OPEN

## Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and potential applications

Elma Laura Salazar-Marroquín<sup>a,b</sup>, Luis J. Galán-Wong<sup>a</sup>,  
 Víctor Ricardo Moreno-Medina<sup>b</sup>, Miguel Ángel Reyes-López<sup>b</sup> and  
 Benito Pereyra-Alfárez<sup>a</sup>

The members of the *Bacillus thuringiensis* group, commonly known as Bt, produce a huge number of metabolites, which show biocidal and antagonistic activity. *B. thuringiensis* is widely known for synthesizing Cry, Vip and Cyt proteins, active against insects and other called parasitoids with biocidal activity against certain types of cancerous cells. Nevertheless, *B. thuringiensis* also synthesizes compounds with antimicrobial activity, especially bacteriocins. Some *B. thuringiensis* bacteriocins resemble lantibiotics and other small linear peptides (class IIa) from the lactic acid bacteria bacteriocins classification system. Although many bacteriocins produced by Bt have been reported, there is no a proper classification for them. In this work, we have grouped these ones based on its molecular weight and functionality. Bacteriocins are small peptides synthesized by bacteria, presenting inhibitory activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and to a lesser extent against fungi. These molecules represent a good study model in the search for microbial control alternatives. Lactic acid bacteria produces a huge number of these types of molecules with great potential. Nonetheless, members of the *Bacillus cereus* group, especially *B. thuringiensis* are emerge as an attractive alternative for obtaining bacteriocins showing novel activities. This review describes the potential applications of *B. thuringiensis* bacteriocins in the control of foodborne pathogens, environment and medical area.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Reviews in Medical Microbiology 2016, 37:000–000

**Keywords:** antimicrobial peptides, *Bacillus thuringiensis*, bacteriocins, biotherapy

### Introduction

The steadily increasing use of antibiotics with the aim of controlling microorganisms, which may damage food or infective agents for human, plants or animals led to the emergence of resistant microorganisms to a wide range of antimicrobial agents [1]. It is estimated that in Europe, approximately 25 000 persons have deceased on an annual basis, because of infections caused by bacteria, which are antibiotic resistant [2]. The emergence of drug resistant bacteria requires us to search for develop new antimicrobial agents. One viable alternative could be the use

of bacteriocins [3–5]. Bacteriocins are small peptides (approximately between 12 and 70 amino acids) with antimicrobial activity, synthesized by prokaryotes. These peptides originally emerged as adaptation mechanisms [6], which allow them to compete for nutrients and space in their habitat, inhibiting growth within the members of the same producer species or members of different bacterial genera [4,7]. Lactic acid bacteria have been widely studied as bacteriocin producers [8]. For example, nisin, the most commonly studied lantibiotic has been approved as food preservative in more than 50 countries [9]. In food, the addition of bacteriocins represents an

<sup>a</sup>Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L., and <sup>b</sup>Conservation Medicine Laboratory Centro de Biotecnología Genética, IPN, Blvd. del Maestro S/N esq. Elias Pina, Col. Narciso Mendoza, Reynosa Tama, México. Correspondence to Benito Pereyra-Alfárez, Dr, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León México.

E-mail: benito.pereyraalf@uanl.edu.mx; bpereyra@gmail.com

Received: 7 October 2015; revised: 4 January 2016; accepted: 24 February 2016

DOI:10.1097/RMM.0000000000000076

ISSN 0214-3270 Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 License, where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.



excellent strategy to control pathogenic bacteria and/or food spoiler, such as *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Shigella sonnei*, among others [10]. Dissemination of multidrug-resistant bacteria as *S. aureus*, *Proteus mirabilis* and *Enterococcus* sp., represents a matter of great concern through an important increase in the hospital costs and morbimortality [11]. During the 1970s another bacterium, *Clostridium difficile*, was found to be responsible for nosocomial diarrhea [12]. Since then, the cases have increased in number and severity in many parts of the world. The main predisposing factor is broad-spectrum antibiotics, which eradicate beneficial bacteria, leading to *C. difficile* overgrowth [13].

The emergence of its resistance to certain conventional antibiotics lead to research with a view to discovering novel therapeutic strategies. In addition to lactic acid bacteria, different members of the *Bacillus* sp. genus, particularly from the *araneus* group, such as *Bacillus thuringiensis* have been studied because of their capability of producing bacteriocins. *B. thuringiensis* is a Gram-positive bacterium, which produces endospores and is well known for synthesizing an enormous 'battery' of compounds with biological activity, specially Cry, Cyt and Vip proteins, possess bio-cidal activity against certain kinds of insects. Although *B. thuringiensis* also synthesizes proteins with antimicrobial activity [14]. In this regard, the knowledge relating to the mode of action of several *B. thuringiensis* antimicrobials is still limited. The application of *B. thuringiensis* antimicrobials is very important within different areas as: food biopreservation, medicine and environmental care. This review describes some of the

most important aspects of bacteriocins synthesized by different strains of *B. thuringiensis*, such as activity spectrum, molecular mass and biological activity.

### Bacteriocins synthesized by *B. thuringiensis*

In the last few years, there has been a resurgence in interest with respect to the discovery of new treatments including the use of micro-organisms as natural products. *B. thuringiensis* is considered as model organism for production of metabolites, which is currently employed in the biological control of plagues and agricultural crops. In 1989, Favret and Younsten [15] reported the detection of a peptide synthesized by a *B. thuringiensis*, which was subsequently named thuricin. So far, there is a report of 18 bacteriocins synthesized by different *B. thuringiensis* strains. Among these 18 bacteriocins are five inhibitory substances, which resemble bacteriocins known as bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) [16] (Table 1). Bacteriocins are peptides with a different molecular weight, varying from almost 1 kDa (thuricin, 0.950 kDa) to 12.4 kDa (entomocin 9). In terms of molecular weight, we propose to divide these bacteriocins into groups A and B. Group A is composed of the bacteriocin weighing less than 5 kDa and group B which weigh more than 5 kDa. Although from a functional point of view, within group A, we can find two types: single peptide and two-component peptide. Almost all of them belong to type I and only thuricin CD and thuricin 439 belong to type II (Table 1). Other important aspect is that members of the ecological subsp. *araneus* produce three different peptides, thuricin 5, entomocin 110 and entomocin 9 (Table 1). On the other

Table 1. Bacteriocins synthesized by different strains of *B. thuringiensis*.

	Bacteriocin	Molecular mass (kDa)	Producer strain (subsp.)	Reference
A1	Thuricin	0.950	HD2 ( <i>B. thuringiensis</i> )	Favret and Younsten, 1989 [15]
	Thuricin 5	3.537	HD188 ( <i>Enterococcus</i> ) 9 ( <i>Enterococcus</i> ) HD110 ( <i>Enterococcus</i> ) HD125 ( <i>Salvadoria</i> )	Chohimi et al. 2007 [28] Chohimi et al. 2012 [24] Chohimi et al. 2012 [24] Chohimi et al. 2012 [24]
	Thuricin 8a1	3.528	8a1 ( <i>Bacillus</i> )	Ligas et al. 2013 [27]
	Thuricin 11	3.140	37361	Lee et al. 2010 [27]
	Baccharicin 14	3.160	BUPAN ( <i>Bacillus</i> )	Karoun et al. 2005 [22]
	Thuricin 17	3.172	81 non- <i>Grasylebiovium</i>	Cray et al. 2006 [26]
	Entomocin 110	4.800	HD110 ( <i>Enterococcus</i> )	Choi et al. 2008 [21]
	Thuricin CD	Type 2.760 Type 2.860	GPC 4431	Rea et al. 2019 [18]
	Thuricin 439	65 2.818 85 2.801	8439	Ahmed et al. 2003 [40]
	B1	Muricin 283	~10.000	LRT283 ( <i>Bacillus</i> )
Kurtacin 287		~10.000	LRT287 ( <i>Bacillus</i> )	Barbosa-Correa et al. 2007 [16]
Kerpacin 404		~10.000	LRT404 ( <i>Bacillus</i> )	Barbosa-Correa et al. 2007 [16]
Entomocin 420		~10.000	LRT420( <i>Enterococcus</i> )	Barbosa-Correa et al. 2007 [16]
Teleorhcin 524		~10.000	LRT524 ( <i>Salvadoria</i> )	Barbosa-Correa et al. 2007 [16]
Techicin		10.200	HD868 ( <i>B. thuringiensis</i> )	Falk et al. 1997 [38]
Baccharicin103		~11.000	BUM103	Karoun et al. 2011 [35]
Thuricin 7		11.400	84017	Choi et al. 2001 [21]
Entomocin 9		12.400	HD9 ( <i>Enterococcus</i> )	Choi et al. 2008 [26]

Table 2. *Bacillus thuringiensis* bacteriocins with biological activity against Gram-positive bacteria.

	Sensitive strain	Reference
Thuricin	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus pectinat</i> , <i>Corynebacterium jeikeium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Favari and Yonatan, 1989 [13]
Thuricin 5	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Paenibacillus acidilactici</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Chelini et al. 2007 [26]
Thuricin Bn1	<i>B. cereus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Ugras et al. 2013 [27]
Thuricin H	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. ivanovi</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Carnobacterium patens</i> , <i>Clostridium sporobothrum</i>	Lee et al. 2009 [37]
Bacteriocin F4	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>	Kamran et al. 2005 [12]
Thuricin 17	<i>B. cereus</i>	Gray et al. 2006 [38]
Entomocin 110	<i>B. cereus</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bacillus pseudomycoides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Paenibacillus larrea</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i>	Cherif et al. 2006 [31]
Toxicin	<i>B. cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Paik et al. 1997 [39]
Bacteriocin F103	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Kamran et al. 2011 [15]
Thuricin 7	<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. pseudomycoides</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>Staphylococcus pyogenes</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. weihenstephanensis</i>	Cherif et al. 2001 [31]
Entomocin 9	<i>B. cereus</i> , <i>B. pseudomycoides</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	Cherif et al. 2003 [28]
Mericin 263	<i>B. cereus</i> , <i>B. weihenstephanensis</i> , <i>C. difficile</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Salazar-Moreno et al. 2007 [16]
Karsacin 287		
Kenyaicin 404		
Entomocin 420		
Tobwoerhein 524		
Thuricin CD	<i>B. cereus</i> , <i>Bacillus larrea</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>C. difficile</i> , <i>C. tyrocheilum</i> , <i>Clostridium kluyveri</i> , <i>Clostridium butylicum</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. trispitos</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	Rea et al. 2010 [11]
Thuricin 459	<i>B. cereus</i> , <i>G. meningitidis</i>	Ahern et al. 2003 [40]

hand, the same peptide can be produced by different sub-species such as thuricin 5, which is produced by the ecological subsp. *entomocin* and subsp. *tobwoerhein* (Table 1).

**Gram-positive bacteria inhibited by *B. thuringiensis* bacteriocins**

Most bacteriocins synthesized by *B. thuringiensis* are broad-spectrum, inhibiting several bacterial species. Some *B. cereus* strains synthesize toxins, which induce diarrhoea, whereas others may be responsible for causing nausea and vomiting [17]. Another important pathogen is *L. monocytogenes*, which may be inhibited by different bacteriocins, amongst which include thuricin, thuricin 5, thuricin Bn1, thuricin H, entomocin 110, bacteriocin F103, thuricin 7, entomocin 9 and thuricin CD. Listeriosis is a zoonotic disease, which is rare in humans but is still extremely serious, presenting low morbidity and high mortality. Generally, contamination takes place while consuming food containing *L. monocytogenes*, which are responsible of causing the disease [18]. Another bacterium, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, has become immensely important in intrahospital as a causative agent of wound infections [19,20]. Bacteriocins such as thuricin, thuricin H, bacteriocin F4 and BLIS reported by Salazar-Moreno et al. [16], mericin 263, karsacin 287, kenyaicin 404, entomocin 420 and tobwoerhein 524 may

represent the best option to control this problematic bacterium (Table 2).

**Gram-negative bacteria inhibited by *B. thuringiensis* bacteriocins**

Bacteriocins including bacteriocin F4, thuricin 7, mericin 263, karsacin 287, kenyaicin 404, entomocin 420 and tobwoerhein 524 have the potential to control *Klebsiella pneumoniae*; a Gram-negative bacillus, which lives in the human intestine as part of its microbiota [16,21,22], considered as one of the most important agents in relation to nosocomial infections, producing septicemia and urinary and respiratory tract infections [23]. Another important microorganism is *P. aeruginosa*, which may be found in hospitals. This opportunistic pathogen is frequently present in extra-intestinal infections, mainly in immune-compromised and malnourished patients [24]. This microorganism shows resistance to almost all conventional antimicrobials [25], even though it is susceptible to entomocin 110 and entomocin 9 (Table 3).

Some members of the BLIS group showed inhibitory activity against *Vibrio cholerae*. Since ancient times, cholera has been the cause of deadly epidemics; however, nowadays its morbimortality has diminished. Nonetheless, there are certain endemic zones presenting with a high percentage of this disease, which causes acute

ACG

4 **Reviews in Medical Microbiology** 2016, Vol 27 No 00**Table 3. *Bacillus thuringiensis* bacteriocins with biological activity against Gram-negative bacteria.**

	Sensitive strain	Reference
Thuricin 5	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> ser. <i>Cholerae</i>	Chevrel et al. 1987 [29]
Thuricin Bn1	<i>Pseudomonas (Perrugina)</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ligas et al. 2010 [27]
Bacteriocin P4	<i>E. pneumoniae</i>	Kamoun et al. 2005 [32]
Thuricin 17	<i>E. coli</i> HD294	Gray et al. 2006 [34]
Entomocin 110	<i>P. aeruginosa</i>	Chevrel et al. 2004 [31]
Bacteriocin P100	<i>A. baumannii</i>	Kamoun et al. 2011 [35]
Entomocin 9	<i>P. aeruginosa</i>	Chevrel et al. 2002 [36]
Moricin 269	<i>V. cholerae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella</i> sp. <i>E. coli</i> , <i>E. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Proteus vulgaris</i>	Balboa-Corona et al. 2007 [18]
Karyacin 187		
Karyacin 404		
Entomocin 420		
Telovorbacin 524		

gastroenteritis. If the disease is not correctly treated, it may even cause death [19] (Table 4).

### Fungi inhibited by *B. thuringiensis* bacteriocins

Fungi may also be targeted by some bacteriocins. For instance, Bn1 bacteriocin and entomocin nine inhibit *Aspergillus* growth [26,27]. Food containing starch (as in the case of potatoes and bread) may stimulate its growth. In addition, it may grow within dirty air conditioning units located in buildings and houses, representing a serious problem, including in hospitals. Frequently, *Aspergillus niger* is present in human ear infections and in certain instances, it can even infect the lungs of people who present with a weak immune system. *A. niger* may be toxic if ingested through infected fruits, vegetables or grains; it can produce food poisoning (single ingestion) or cancer (chronic consumption) [28].

### Potential applications of *B. thuringiensis* bacteriocins

**Thuricin 5:** This bacteriocin is heat resistant and stable in a wide range of pH conditions and inhibits not only the pathogens that are transmitted through food causing

poisoning such as *L. monocytogenes* and *B. cereus*, but also a great number of Gram-negative pathogens such as *S. enterica* subsp. *enterica* and *P. aeruginosa*. The use of *B. thuringiensis* as a biological insecticide, as well as the information about the bacteriocins, like thuricin 5, empower its practical use as an antagonistic agent towards phytopathogenic bacteria as *Pseudomonas syringae* [29,30].

**Thuricin Bn1:** This peptide is synthesized by *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Bn), who presents bifunctional properties in agriculture. This strain is active against insects through a crystalline protein [31] and active against plant pathogenic bacteria through a bacteriocin. On the other hand, the *Bacillus* genus includes a great variety of species that may be safely used within industry. Example, *B. thuringiensis* Bn1 produces Bacteriocin Bn1, which as proteinaceous nature, can be used as a natural food preservative [32]. Besides, bacteriocins have gained importance as natural biopreservatives for degradation control and against pathogenic bacteria transmitted by food [6]. **Thuricin H:** This bacteriocin inhibits the growth of *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Listeria innocua* and *Listeria ivanovi* [33]. All of these bacteria seem to affect both animals and humans [18]. Example includes the fatal case where *L. innocua* was found on a haemoculture. In this situation, the patient died because of septic shock caused by cholangitis [34]. **Bacteriocin P4:** This bacteriocin is stable at a wide pH range and heat treatment, which indicates that the bacteriocidal function can be preserved even in extreme conditions. This presents an extremely interesting characteristic for its use in the agro-industry

**Table 4. *Bacillus thuringiensis* bacteriocins with biological activity against fungi.**

	Sensitive strain	Reference
Entomocin 9	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus granulatus</i>	Chevrel et al. 2003
Moricin 269	<i>Rhizopus</i> sp., <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alternaria rostrata</i> (NRRL), <i>Nitroderma</i> sp. 2817, <i>Trichoderma</i> sp. 503.	De la Fuente-Salcido et al. 2008 [10]
Karyacin 187		
Karyacin 404		
Entomocin 420		
Telovorbacin 524		

The study of the bacteriocin inhibition spectrum against indicator strains revealed that this bacteriocin presents a bactericidal effect against bacterial strains highly linked to *B. thuringiensis* and other Gram-positive bacteria. Importantly, it is highly active against *S. aureus*, which is one of the most virulent bacteria that may be found in agro-industrial products [22]. Although this bacteriocin is less active against Gram-negative bacteria [35], it is the only bacteriocin produced by *B. thuringiensis*, which displays activity against *K. pneumoniae*. **Thuricin 17:** This peptide was isolated from a bacterium, which promotes plant growth [36], and has been demonstrated to be increase plant growth [37]. This peptide is stable a wide range of temperatures and is biologically active between pH 1.00 and 9.25. In addition, thuricin 17 is the only *B. thuringiensis* bacteriocin, which shows activity against *E. coli* [36]. **Entomocin 110:** This bacteriocin has been demonstrated to be inhibitory to several Gram-positive bacteria, including *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and other *Bacillus* species. [31]. *B. larvae* are extremely important bacteria within the apiculture sector, as it produces the American foulbrood disease, which affects bee larvae [38]. **Techlicin:** This bacteriocin exhibits activity against *B. cereus* and certain *B. thuringiensis* subsp. *israeli* [39]. Although its spectrum of activity is unclear as it has not been tested against *L. monocytogenes*, as in the case of bacteriocin F4 it has not been tested in *L. monocytogenes* or *S. aureus*, as it happens in the case of thuricin 5. For this reason, its application and potential use in biomedical treatments has not been completely defined. **Thuricin F103:** This bacteriocin presents a wide spectrum of inhibition against the related bacteria and different pathogens transmitted through food such as *L. monocytogenes*, *B. cereus* and the phytopathogenic bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. Subsequently, Knauman and his colleagues [35] demonstrated that bacteriocin F103 may be applied to raw beef meat with the purpose of avoiding contamination by *L. monocytogenes* [35]. **Thuricin 7:** The action and inhibitory spectrum of this bacteriocin includes *B. cereus* and *Bacillus anthracis* strains (commonly associated with the deterioration of dairy products and raw milk). Such properties make thuricin 7 the perfect candidate for to be used as a food antimicrobial agent in order to control Gram-positive bacterial contaminants, without interfering with lactic acid bacteria growth. [21]. **Entomocin 9:** This bacteriocin displays antimicrobial activity against *L. monocytogenes*, *B. cereus* and several fungi. Entomocin 9 is a new bacteriocin produced by *B. thuringiensis* HD9 characterized as being heat stable. Lack of toxicity against *Vero* cells renders strain HD9 as being suitable for a safe application in antimicrobial treatments. The importance and impact of entomocin 9 makes *B. thuringiensis* strain HD9, an attractive microorganism in biotechnological applications as an antimicrobial agent in the food and agricultural industry [26]. **Thuricin CD:** The effectiveness of thuricin CD against the clinical *C. difficile* isolates, especially hypervirulent PCR R027

strains, makes it extremely interesting because of its structural characteristics and potential as a therapeutic agent. The isolation and characterization of thuricin CD may represent a structural class of bacteriocins as well as potentially providing a treatment for *C. difficile*-associated disease [13]. **Thuricin 439:** *B. thuringiensis* strain B419 produces thuricin 439, a small substance like bacteriocin produced as two active peptides with different molecular mass. Thuricin 439 is active against *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains, while at the same time, showing activity against *L. monocytogenes* 4202 [40]. This bacteriocin could be used to control *B. cereus*, which can cause diarrhea and vomiting. **Bt-BLIS:** The *B. thuringiensis* BLIS include morriscin 369, kurstacin 287, keppocin 404, entomocin 420 and talworthicin 524, produced by *B. thuringiensis* strains isolated in Mexico. These BLIS have been shown effective against Gram-positive and Gram-negative bacteria, including etiologic agents of human diseases such as throat infections, scarlet fever, septicaemia, pneumonia, urinary tract infections, emetic and gastrointestinal syndromes and different types of fungal infections. Furthermore, activity of the five BLIS mentioned earlier, was tested against isolates of *S. aureus* associated with bovine mastitis. All the *S. aureus* isolates were shown to be susceptible to the 5 bacteriocins synthesized by *B. thuringiensis*, mainly to morriscin 369 and kurstacin 287, followed by keppocin 404, entomocin 420 and talworthicin 524 [14].

## Conclusion

In this report, we propose a classification of Bt bacteriocins based on molecular weight, and functionality on single peptide and two-component peptide bacteriocins.

Because of the broad-spectrum nature of some *B. thuringiensis* bacteriocins, some may be included in antimicrobial strategies against virus, fungi, parasitic diseases and cancer, as well as in the immune system modulation [41]. The potential applications of these peptides reinforce the importance of studying their biological properties.

As previously mentioned, nisin, a bacteriocin approved by the Food and Drug Administration is employed to inhibit bacterial growth in processed food. Although the potential application can be quite diverse and requires greater knowledge and tests that may be used in different health sectors as pathogen control in hospitals, environment and new antibiotics for controlling human and animal diseases.

For decades, *B. thuringiensis* has been one of the best options, as it has been safely employed as a bioinsecticide and applied in different human consumption crops without showing adverse effects. In particular, thuricin CD is a

good example as it displays specific activity against *C. difficile* and it has no effect on the good flora living in the intestine, as is the case with most traditional antibiotics [42].

**Acknowledgements**

**AGP** E.L.S.M. was a recipient of a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México. M.A.R.L. is SNI member. The authors thank Secretaría de Investigación y Posgrado, Instituto Politécnico Nacional; Grant 20151437.

**Conflicts of interest**

There are no conflicts of interest.

**References**

1. Carlett J, Jarlier V, Hachath S, Yess A, Gossens H, Pittet D. Ready for a world without antibiotics? The positive antibiotic resistance call to action. *Antimicrob Resist Infect Contr* 2012; 1:1–12.
2. Hernández N, Ugalde A. Boletín electrónico latinoamericano para fomentar el acceso y el uso adecuado de medicamentos. *Boletín Farmaco* 2011 <http://www.saludylamexico.org/boletines/farmacos/>. [Accessed 16 August 2015].
3. Deloren A, Carter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production a proteinic trait? *Appl Environ Microbiol* 2012; 78:1–4.
4. Friedrich MA, Walsh CH. Antikinetin for emerging pathogens. *Science* 2002; 325:1693–1695.
5. López JE, Ochoa A, Santos G, Anquál, Medina E, Martínez M, et al. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos farmacológicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacológicas* 2009; 3:49–57.
6. Deloren A, Carter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocin production a proteinic trait? *Appl and Environ Microbiol* 2012; 78:1–4.
7. Zheum Y, Choi YL, Kim M, Zink Y. Secondary metabolites of red *Bacillus* spp. *Microbiol Biotechnol* 2009; 40:363–372.
8. Klotenhammer TK. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Food Microbiol Rev* 1993; 12:39–66.
9. Liu C, Hu K, Liu Y, Chen S. Stimulation of toxin production from *Staphylococcus aureus* by a mixed culture of *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 128:751–761.
10. De la Fuente-González M, Alarcón-González MG, Ríosch DK, Salcedo-Hernández R, Bautista-Rufo M, Burbules Corona JE. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol* 2008; 180:631–640.
11. Alkhouf H, Franco Ch MAP, Omar NB, Calvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *Food Microbiol Rev* 2010; 33:201–232.
12. George RH, Symonuk JM, Dinicola F, Brown JD, Andri Y, Shingara N. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomonadomycosis colitis. *BMJ* 1978; 1:697.
13. Roe MC, Shi CS, Clayton E, O'Connor PM, Whitall RM, Vedara JC, Tharion CD. A posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *PLoS One* 2010; 1007915:1–10.
14. Schögel E, Crickmore N, Van Rie J, Concha D, Baum I, Fetscher J. *Bacillus thuringiensis* and its proteinic crystal proteins. *Microbiol Mol Biol* 1998; 62:775–805.
15. Favre ME, Yasutan AA. Thauricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Intensivista Publico* 1989; 52:206–216.
16. Rodríguez-Camero E, Vázquez-Arocas H, Ríosch DK, Salcedo Hernández R. Bacteriocin-like inhibitor substance produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol* 2007; 187:117–126.
17. Food & Drug Administration. *Bacillus cereus* Foundation (BCF) 2010. <http://www.consumer.safesystems.com/ingredient/bacillus-cereus/bacillus-cereus-foundation-2010.pdf>. [Accessed 12 July 2015].

18. Guillot C, Jais-Lambert C, Le Marrec A, Leclercq A, Machat F, Franco M, et al. Human listeriosis caused by *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:194–195.
19. Salazar-Gutiérrez T, Miranda-Méndez A. Bacteriocinas de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud Pública de México* 1991; 40:310–314.
20. Sorn NI, Swatch DA, Lovchuk VP, Pechenko VD, Trushakov BV, Akhmetov IV, et al. Inactivating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other pathogens by use of bacteriocins *DS67* and *DS68*. *J Clin Microbiol* 2008; 11:1884–1889.
21. Chertif A, Ouzari H, Daffonchio D, Chertif H, Ben Sassi K, Hassen A, et al. Thauricin P, a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Int Appl Microbiol* 2007; 33:266–267.
22. Kamoun F, Mejdoub H, Aouissoul H, Reimbold J, Hammani A, Jassa S. Purification, amino acid sequence and characterization of bacteriocin P4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol* 2005; 99:881–889.
23. Pinto ME, Ulluco M and Toro C. La producción en clave frente a *Escherichia coli* enterohemorrágica EPEC. Universidad de Chile. <http://www.med.uchile.cl/0912/0/0075514-p-producion-de-enteroescherichia-coli-enterohemorragica-produccion-clave.html>. [Accessed 20 June 2015].
24. Friedrich M. *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Medscape Reference* 2015 [http://emedicine.medscape.com/article/2287\\_A0148-overview](http://emedicine.medscape.com/article/2287_A0148-overview). [Accessed 8 December 2015].
25. Arredondo J, Villacorta R, Atlas bacteriológico. BAHSA, Real Academia de Medicina, México 2007:31–34.
26. Chertif A, Chertif S, Uzman F, Hassen RM, Hendekou NB, Daffonchio D, et al. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomeisin 5, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *intermedius* HD9. *J Appl Microbiol* 2007; 99:390–399.
27. Uzman F, Kadir S, Hacıoğlu K, Zihni D. Purification and characterization of the bacteriocin thauricin best produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *intermedius* best isolated from a Haccaport Port. *J Microbiol Biotechnol* 2012; 23:167–174.
28. Mendel L. *Agropélicas*. Universidad Nacional Autónoma de México 2012 <http://www.farmac.unam.mx/boletines/microbiologia/agropelicolas/agropelicolas.htm>. [Accessed 8 August 2015].
29. Chertif S, Dalalouk F, Sahli S, Haddad M, Van Dorsselaer A, Uzman F, et al. Purification and partial amino acid sequence of thauricin 5, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Clin J Microbiol* 2007; 45:284–294.
30. Chertif S, Uzman F, Larrouc J, Dalalouk F, Van Dorsselaer A, Sahli S. Identification of three novel *B. thuringiensis* strains that produce the Thauricin 5 bacteriocin. *Environ Sci* 2013; 14:1–7.
31. Chertif A, Bargaoui W, Raddadi N, Daffonchio D, Reimbold A. Characterization and partial purification of entomeisin 10, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *intermedius* HD110. *Microbiol Res* 2009; 163:654–660.
32. Cleveland J, Monteale T, Nis E, Chikinda ML. Bacteriocinase: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 2001; 71:1–10.
33. Lee H, Chaney J, Woods RW. Biosynthesis and transcriptional analysis of thauricin B, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* BTH43. *Food Microbiol Lett* 2009; 229:206–214.
34. Perrin M, Bruner M, Delamaro C. A fatal case of *Listeria monocytogenes* bacteremia. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1370–1374.
35. Kamoun F, Iguita B, Hassen NB, Mejdoub H, Lereche D, Jassa S. Purification and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* bacteriocin active against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens*. *J Appl Microbiol* 2011; 102:300–310.
36. Gray EJ, Lee KD, Soudamrath AM, Di Falco ME, Zhou X, Ly A, et al. A novel bacteriocin, thauricin 27, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* BTH27: isolation and characterization. *J Appl Microbiol* 2009; 106:345–354.
37. Lee KD, Gray EJ, Mubwand F, Jung WJ, Charles T, Clark SR, et al. The class III bacteriocin thauricin-17 increases plant growth. *PLoS One* 2009; 226:747–755.
38. Honey Bee Diseases and their a practical guide. Agricultural and food engineering agricultural and food engineering technical report technical report. <http://www.iafo.org/016-0006.pdf>. [Accessed 20 December 2015].

39. Park HD, Kim SS, Park JC. Identification and partial characterization of teichidin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain K2019. *Antonie van Leeuwenhoek* 1997; 71:294-298.
40. Ahern M, Vandenhaeren S, Van Sinderen D. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B429. *Food Microbiol Lett* 2005; 120: 127-131.
41. López JE, Córdova A, Barboza E, Hiedrich DR. Antimicrobial peptides: current and potential applications in biomedical therapies. *Biochim Research International* 2013; [10.1155/2013/5067240](http://dx.doi.org/10.1155/2013/5067240). [Accessed 8 December 2015].
42. Seo MC, Alenxayahu D, Kim KP, Hill C. Gut solutions to a gut problem: bacteriocins, probiotics and bacteriophage for control of *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 2013; 62:1349-1370.

Characterization of a new bacteriocin synthesized for the Mexican *Bacillus thuringiensis* strain L4-2 active against *Listeria monocytogens* and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Authors:

Elma Laura Salazar-Marroquín<sup>1,2</sup>, Luis J. Galán-Wong<sup>1</sup>, Virgilio Bocanegra-García<sup>2</sup>,  
Víctor Ricardo Moreno-Medina<sup>2</sup>, Miguel Ángel Reyes-López<sup>2</sup>, and Benito Pereyra-  
Alfárez<sup>1</sup>

Affiliation:

1 Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N. Ciudad Universitaria. San Nicolás de los Garza, N. L. 66450 México.

2 Laboratorio de Medicina de Conservación, Centro de Biotecnología Genómica. IPN. Blvd. del Maestro S/N esq. Elías Piña, Col. Narcizo Mendoza, Reynosa Tamps. 88710 México.

Corresponding Author:

Benito Pereyra-Alfárez

E-mail: [benito.pereyraal@uanl.edu.mx](mailto:benito.pereyraal@uanl.edu.mx); [bpereyra@gmail.com](mailto:bpereyra@gmail.com)

## **Abstract**

Bacteriocins are proteins with antimicrobial activity that are an alternative for the treatment of foodborne bacteria and fastidious human pathogens. In this work we inspected the antibacterial activity of forty-eight Mexican *Bacillus thuringiensis* strains against several bacteria used as indicators, such as *B. thuringiensis*, *Listeria monocytogenes* (Lm) and a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Supernatants from twenty six strains yielded positive action against some indicator, but nine showed inhibitory activity not only for all *B. thuringiensis*, but also against Lm and MRSA. The strain L4-2, isolated from soil, was selected for microbiological and biochemical studies. The bacteriocin called L4-2 was found in the supernatant from logarithmic growth (4 h) until the stationary phase and decreasing after 8 h. The bacteriocin displayed bacteriolytic and bactericidal activities and had antibacterial action at pH 3.0-7.0 and it remained stable after 30 min at 80°C, but its biological activity was lost after treatment with proteinase K. From Mass spectrometry results showed that the bacteriocin L4-2 possesses a molecular mass of 3,138 Da. The biological activity of bacteriocin L4-2 indicates that it has interesting activity and specificity to be considered for biotechnological purposes.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, Bacteriocin L4-2, purification, bacteriocin.



## Introduction

Bacteriocins are ribosomally synthesized bacterial polypeptides that develop biological action against very closely related microorganisms or species sharing ecological niches. These molecules have received special interest since those produced by lactic acid bacteria (LAB), especially nisin A, had great results in the biological control of not only foodborne pathogens but also, human infective bacteria (Cherif et al. 2001; Okuda et al. 2013). Some special characteristics, for example, i) its proteinaceous nature presupposes easy degradation in the gastric tract in both humans and animals; ii) its high stability and iii) both its broad and narrow spectra of action, establish the bacteriocins as a good candidates for the treatment of some hospital-acquired infections, such as those caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Clostridium difficile* (Rea et al. 2010), and also as natural preservatives in foods (Abriouel et al. 2011; Grande et al. 2014).

Bacteriocins have been grouped into several classes (Nes et al. 2007; Cherif et al. 2003), but according to their structure, they can be divided in two major groups: i) linear and ii) circular peptides. Bacteriocins can or cannot be post-translationally modified and their length varies from 20 to 688 amino acids (Hammami et al. 2010). Linear bacteriocins include classes I and II, which comprise thermoresistant peptides (lantibiotics) < 5 kDa, and thermostable peptides <10 kDa with a high glycine content, respectively. Circular bacteriocins have also been classified within the IIc subclass (Grande et al. 2014), although due to their structure and specificity they could be considered a separate class (Gabrielsen et al., 2014).

The number and type of bacteriocins is increasing every year, especially those produced by the *Bacillus cereus* group. This bacterium complex encompasses six species. Among these, *Bacillus thuringiensis* excels for its capacity to synthesize large proteins with antagonist activity, especially with insecticide and anti-cancer cell activities (Brasseur et al. 2015). Moreover, this fantastic bacterium could synthesize several proteinaceous metabolites with antibacterial activity. Today, we recognize, at least, 18 peptides from diverse *B. thuringiensis* strains which display biological action against bacteria and some fungal species (Pacheco-Cano et al. 2014; Cherif 2003). In this paper we report the screening of *B. thuringiensis* strains that produce peptides with antimicrobial action. Bacteriocin L4-2, a new bacteriocin produced by soil isolates of *B. thuringiensis* L4-2 strain, is active against three closely related *B. thuringiensis* strains and two main fastidious bacteria: *L. monocytogenes* and a MRSA strain.

## **Materials and Methods**

### **Bacterial strains**

*B. thuringiensis* strains were obtained from a Mexican entomopathogen bacterium collection that belongs to the Instituto de Biotecnología, FCB-UANL. All *B. thuringiensis* strains were maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  in nutrient broth supplemented with glycerol. Strains used in bioassays as indicators for bacteriocin activity were: i) gram positives: *B. thuringiensis* HD1, HD73 and GM10 strains; *L. monocytogenes* and a MRSA strain; ii) gram negatives: *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella arizonae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter aerogenes*. The strains were maintained using tryptic soy broth (TSB) or brain-heart infusion (BHI) culture media.

## **Production and bacteriocin bioassays**

In order to confirm the presence of the antimicrobial agent in culture, supernatant from forty-eight *B. thuringiensis* (Table 1) active strains were grown in TSB. In brief, each strain was inoculated in TSB and incubated for 12 h at 28°C in an orbital shaker at 180 rpm. The cultures were centrifuged at 10,000  $\times g$  for 30 min at 4°C; supernatants were filtered through 0.45  $\mu$  pore membranes. Antibacterial activity was detected using the well-diffusion method against the indicator bacterium *B. thuringiensis*, mentioned in Table 1. Plates were incubated 24 h at 30°C and the diameter of inhibition zone was reported in mm (Jack et al. 1995; Cherif et al. 2008) (Table 1). Those strains yielding a halo >10 mm were considered positive, and after that, were tested against MRSA and *L. monocytogenes*. The supernatant of the positive strains were diluted until activity disappeared (Cherif et al., 2008). All bioassays were carried out in triplicate and inhibition halo-size was reported as an average.

## **Time-course of biosynthesis of bacteriocin L4-2**

In order to know the growth-phase of maximum bacteriocin production, the *B. thuringiensis* L4-2 strain was inoculated (10% v/v) in 300 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of TSB incubated as mentioned before. Samples of 2 mL were removed every 2 h. Biomass accumulation was evaluated spectrophotometrically at 600 nm. Each sample was concentrated four times in a SpeedVac concentrator (Savant SVC H110). Antimicrobial activity was evaluated as mentioned before using *B. thuringiensis* IBGM10 as an indicator. Figure 1 depicts the kinetics of growth and bacteriocin production.

### **Mode of action of bacteriocin L4-2**

The *B. thuringiensis* IBGM10 strain was used as an indicator in all experiments. This strain was inoculated in 50 mL TSB as mentioned before and at the middle of log phase (4 h); supernatant from the L4-2 strain at 1.2 mg/mL of protein was added. Samples, 1 mL, were taken every hour and biomass accumulation ( $A_{600}$ ) and viability (CFU mL<sup>-1</sup>) were recorded. The number of viable cells was evaluated on TSA plates by standard methods.

### **pH, temperature, and proteinase K sensitivity**

Partial characterization tests of bacteriocin L4-2 were performed with samples of supernatant from 12 hs of culture. Samples of 500  $\mu$ L containing 1.2 mg /mL of protein were used to determine sensitivity to temperature, pH and proteinase K. Temperature was evaluated by incubating the samples for 30 min at 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 and 110°C. Supernatant with bacteriocin was incubated for 2 h at 30°C at different pH values using 50 mM citrate buffer (pH 3.0-6.0), 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), and 50 mM Tris HCl buffer (pH 8.0-9.0) (Paik et al., 1997). Buffer without supernatant was used as a control. Sensitivity to proteinase K (1 mg mL<sup>-1</sup>) was evaluated by incubating samples 1 h at 37°C. Proteinase K without bacteriocin was used as a negative control. The effect of bacteriocin L4-2 was assessed by determining the size of the inhibition halo of the *B. thuringiensis* IBGM10 strain.

### **Partial characterization**

Starting with a volume of 1.2 L of a 12 h culture at 30°C of the L4-2 strain, the supernatant was filtered on a 0.45 µm membrane and precipitated with 80% ammonium sulfate overnight at 4°C. Precipitated proteins were obtained by centrifugation at 10,000 *g* for 30 min, and were dissolved in 12 mL of Milli-Q water. The sample was passed through FPLC (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) using a HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR column (GE Healthcare) pre-equilibrated and eluted with 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4 at a flow of 12 mL h<sup>-1</sup>. Fractions of 5 mL were collected and the protein concentration was evaluated at 280 nm. Antimicrobial activity was evaluated in each fraction. Positive fractions were pooled, lyophilized, and dissolved in 5.0 mL Milli-Q sterile water and passed through filters with different cut-off points, starting with 100 kDa, 30 kDa, 10 kDa and 3 kDa (Centricon® Centrifugal Filter Devices, Merck Millipore, Billerica, MA). The samples obtained in each of the filtration steps were tested with the witness strain, *B. thuringiensis* IBGM10.

### **Partial purification and molecular mass determination**

Two cultures of 3 L each were incubated at 28°C for different periods of time; one was incubated for 12 h (L4-212) and another for 24 h (L4-224). Cells were removed by centrifugation and the supernatants filtered with a 0.45 µm membrane. The filtrates were precipitated with ammonium sulfate as mentioned before. The precipitate was resuspended in 10 mL of sterile Milli-Q water, passed through a 10 kDa cut off filter, and dialyzed using the Mega Dialysis Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) with a molecular weight cut-off of 1000 Da. The L4-212 and L4-224 samples were applied separately to a HPLC system (Agilent 1100 UV System) using a Zorbax 300SB-C18

column (Agilent Technologies Santa Clara, CA) and eluted with a mobile phase: buffer A (90% water: 10% acetonitrile + 0.1% trifluoroacetic acid), and buffer B (10% water and 90% acetonitrile + 0.1% trifluoroacetic acid), at a constant flow of 1.0 mL/min. Absorbance was measured at 280 nm. Peaks were collected, and separately, activity against *B. thuringiensis* IBGM10 was tested. The bacteriocin obtained in this step was termed L4-2HPLC.

The L4-2HPLC sample was applied in an LC-MS system consisting of an EASY-nLC II nanoflow pump (Thermo-Fisher Co. San Jose, CA) coupled to a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo-Fisher Co.) with nano-electrospray ionization (ESI). Spectrometer calibration was performed with Calmix® solution containing N-butylamine, caffeine, H<sub>2</sub>N-MRFA-CO<sub>2</sub> and Ultramark 1621. Flow of the LC system was 600 nL/min. The molecular mass of each sample was obtained by processing data using an automatic deconvolution algorithm (Xtract rawfile). The L4-2HPLC sample was processed to determine the amino acid sequence using Collision-Induced Dissociation (CID) and High Energy Collision Dissociation (HECD).

## **Results**

### **Detection and production of bacteriocins**

We evaluated the production of bacteriocins as inhibitory substances in 48 native strains of *B. thuringiensis* using three phylogenetically related strains as indicators. The production of inhibitory substances was demonstrated in the supernatant of 26 strains, of which 24 inhibited the strain HD1 and 8 were specific; while IBGM10 and HD73 were inhibited by 17 and 13, respectively (Table 1). Regarding *L. monocytogenes* and MRSA, only 9 supernatants had an effect on these two bacteria (Table 1). In all cases,

the inhibition zone decreased when the dilution of bacteriocin was increased, suggesting that inhibition was not caused by the activity of a bacteriophage, similar to that reported for entomocin 110 (Cherif et al., 2008). None of the strains presented an action against the gram negatives tested (data not shown). In this paper, the bacteriocin produced by strain L4-2 was selected for biochemical and bacteriological studies.

### **Synthesis of bacteriocin L4-2 during the growth cycle**

The growth kinetics and synthesis of bacteriocin demonstrated that antimicrobial activity began at the mid-log phase, after 4 h of incubation, and it decreased starting at 12 h, inactivating after 24 h (Fig. 1). Inactivation may be due to proteolysis of the bacteriocin.

### **Mode of action**

The study of mode of action was approached by incubating bacteriocin with cells of *B. thuringiensis* IBGM10 as an indicator strain. The indicator strain was grown in STB, and after 4 h of incubation, bacteriocin L4-2 was added. We observed a decrease in the number of viable cells (CFU/mL) (Fig. 2A) as well as in optical density ( $A_{600}$ ) (Fig. 2 B). This effect remained constant in the following 8 h, suggesting bactericidal and bacteriolytic activity.

### **Sensitivity to temperature, pH and proteinase K**

The sensitivity of bacteriocin L4-2 to temperature, pH changes and the action of proteinase K was determined by evaluating the residual activity in diffusion assays as well using the *B. thuringiensis* IBGM10 strain as an indicator. The bacteriocin showed stability even at 80°C, but at 100°C, its inhibitory action was abolished. With regard to pH, bacteriocin activity was present between pH 3.0-7.0. The loss of activity after treatment with proteinase K suggests that bacteriocin L4-2 is proteinaceous.

### **Partial characterization of bacteriocin L4-2**

The culture sample of L4-2 concentrated 1:100 from its initial volume generated a concentration of 353.89 mg/mL. The sample (12 mL) was fractionated on FPLC into 200 fractions, of which 48 developed inhibition zones against the indicator strain (data not shown). Concentrated and lyophilized samples gave a concentration of 233 mg/mL of protein. The passage of the sample through filters with different cutoffs demonstrated biological activity up to a 10.0 kDa filter. This activity was lost when passed through a 3.0 kDa filter. This suggests that bacteriocin L4-2 must have a size equal or greater than 3.0 kDa.

### **Purification of bacteriocin L4-2**

HPLC chromatograms of the L4-212 and L4-224 cultures showed different behavior. In L4-212 a peak with a TR 19.929 (Fig. 3a) was seen; a finding not seen in L4-224 (Fig. 3b). The result of the biological activity of the 19.929 TR fraction showed that it is responsible for the inhibition of the indicator strain; therefore, it is the bacteriocin L4-2 carrier. Mass spectrometry analysis revealed that this molecule has a molecular mass of 3.138 kDa (Fig 4). Results were uncertain in relation to protein sequence, since only a three amino acid (Leu/Leu/Ala) sequence was obtained, even when alternative methods, such as reduction-alkylation, were used. These results suggest that it is a cyclic or compound molecule (Grande et al., 2014; Gabrielsen et al., 2014).

### **Discussion**

*B. thuringiensis* is recognized worldwide for its importance as a biological control agent against insect pests in agricultural crops of importance to the food industry. In addition,



*B. thuringiensis* synthesizes a battery of metabolites with biological activity, including bacteriocins. To date, 18 bacteriocins have been reported synthesized by various strains of *B. thuringiensis*. These have a high potential for use in the food and pharmaceutical industry (Lopez-Meza et al. 2015) and in the clinic for control of human pathogens such as *Clostridium difficile* (Rea et al. 2010).

In this paper, we searched and selected native strains of *B. thuringiensis* capable of synthesizing proteins with antimicrobial activity. Of the 48 strains tested, 26 developed inhibition halos against at least one strain of *B. thuringiensis* used as an indicator. These results with different activity and specificity, suggest that our strains synthesize different bacteriocins, which represent a valuable new reservoir of antimicrobial molecules. Of the 8 strains with a broader spectrum of activity, we selected the L4-2 strain for biochemical and bacteriological studies. This bacteriocin inhibited all the indicator strains, but from the point of view of its action against *S. aureus*, it is similar to that reported for BLIS (Barboza and Corona 2007) and bacthuricin F4 (Kamoun et al., 2005); whereas for *L. monocytogenes*, it resembles thuricin S (Chehimi et al., 2007), entomocin 110 (Cherif et al., 2008), entomocin 9 (Cherif et al., 2003) and thuricin 7 (Cherif et al., 2001). However, only the L4-2, thuricin (Favret and Younsten, 1989) and thuricin H (Lee et al., 2009) were active against both pathogens.

Bacteriocin L4-2 production began in the early log phase of the growth cycle as a primary metabolite and continued until the early stationary phase. Most bacteriocin activity occurred at the end of the logarithmic phase, similar to entomocin 110 (Cherif et al., 2008), thuricin S (Chehimi et al., 2007), entomocin 9 (Cherif et al., 2003) and tochicin (Paik et al., 1997), but activity fell after 12 h of incubation.

Bacteriocin L4-2 showed bactericidal and bacteriolytic effects to the indicator strain, *B. thuringiensis* IBGM10. Similar results against several strains of *B. thuringiensis* were

found with entomocin 110. This type of effect has been recorded for other bacteriocins such as nisin and Pep5 (Bierbaum and Sahl, 1985; Cherif et al., 2008). However, in other bacteriocins, such as thuricin 7, bacteriolytic activity was observed only at a higher concentration of the bacteriocin (Cherif et al., 2001). This type of action shows that the mode of action of bacteriocins may depend on both the concentration of the bacteriocin and the physiological state of the indicator strain (Foulquié Moreno et al., 2006).

With respect to molecular weight, bacteriocin L4-2 has a mass of 3.138 kDa, similar to thuricin S of 3.137 kDa (Chehimi et al. 2007) and that of thuricin Bn1 of 3.139 kDa (Ugras et al. 2013). However, in terms of stability to pH changes, they are very different. Thuricina S is stable at values of 3.0 to 10.5 (Chehimi et al. 2007) and thuricin Bn1 at 5.0 to 9.0 (Ugras et al. 2013), while the bacteriocin L4-2 that we report, maintained its activity at pH values of 3.0 to 7.0. The bacteriocin L4-2HPLC was subjected to sequencing experiments, which revealed uncertainty, and we were only able to identify 3 amino acids (Leu/Leu/Ala). This may be because it is a cyclic peptide or compound molecule, as is the case of enterocin AS-48 produced by *Enterococcus faecalis* (Dimov et al. 2005; Foulquié Moreno et al., 2006). Determination of the structure and its amino acid sequence is under development. Our results of molecular mass, characteristic of specificity and mode of action, suggest that the protein L4-2 is a new type of bacteriocin.

### **Acknowledgements**

ELSM was a recipient of a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. MARL is a member of the SNI. This work was

supported, in part, by the Project: 20151437 from the Secretaria de Investigación y Posgrado, Instituto Politécnico Nacional.

## References

1. Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:201-232.
2. Bierbaum G, Sahl HG. Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol* 1985;141:249-254.
3. Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Côté J-C, Sirois M. Parasporin-2 from a new *Bacillus thuringiensis* 4R2 strain induces caspases activation and apoptosis in human cancer cells. *PLoS ONE* 2015;10:1-22.
4. Chehimi S, Delalande F, Sable S, Hajlaoui MR, Van Dorsselaer A, Limam F, Pons AM. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 2007;53:284-290.
5. Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S, Boudabous A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Lett. Appl Microbiol* 2001;32:243–247.
6. Cherif A, Chehimi S, Limem F, Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D, Boudabous A. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9. *J. Appl. Microbiol* 2003;95:990-1000.
7. Cherif A, Rezgui W, Raddadi N, Daffonchio D, Boudabous A. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110. *Microbiol Res* 2008;163:684-692.

8. Dimov S, Ivanova P, Harizanova N, Ivanova I. Bioactive peptides used by bacteria in the concurrence for the ecological niche: general classification and mode of action (overview). *Biotechnol Biotechnol* 2005;3:3–22.
9. Favret ME, Yousten AA. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr Pathol* 1989;53:206-216.
10. Foulquié Moreno MR, Callewaert R, Devreese B, Van Beeumen J, De Vuyst L. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J Appl Microbiol* 2003;94:214–229.
11. Gabrielsen C, Brede DA, Nes IF, Diep DB. Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:6854–6862.
12. Grande Burgos MJ, Pérez Pulido R, López Aguayo MC, Gálvez A, Lucas R. The cyclic antibacterial peptide enterocin as-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *Int J Mol Sci* 2014;15:22706-22727.
13. Hammami R, Zouhir A, Lay CL, Hamida JB, Fliss I. BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol* 2010;10:1-5.
14. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 1995;59:171–200.
15. Kamoun F, Mejdoub H, Aouissaoui H, Reinbolt J, Hammami A, and Jaoua S. Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol* 2005;98:881-888.
16. Lee KD, Gray EJ, Mabood F, Jung WJ, Charles T, Clark SR, Ly A, Souleimanov, A, Zhou X, Smith DL. The class IId bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. *Planta* 2009;229:747-755.

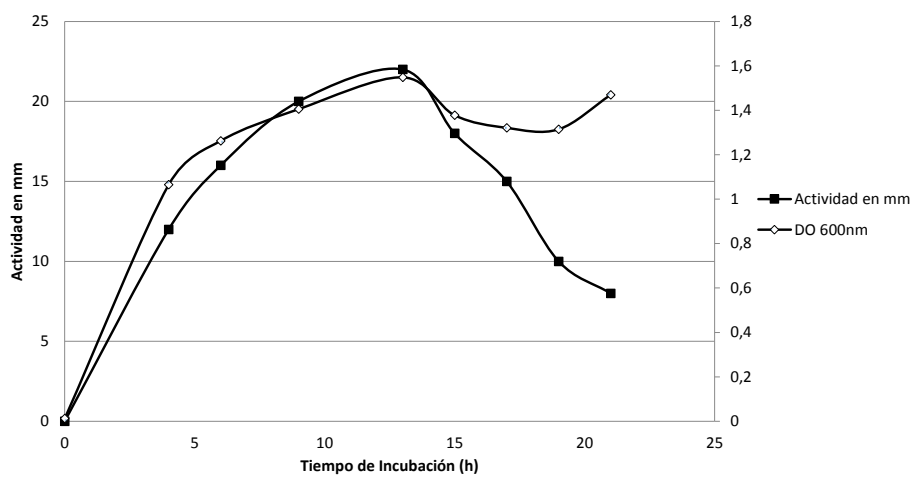
17. López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A, Barboza-Corona JE, Bideshi DK. Antimicrobial Peptides: Current and Potential Applications in Biomedical Therapies. *BioMed Research Internationa* 2015;1-2.
18. Nes IF, Yoon S-S, Diep DB. Ribozomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocin) in lactic acid bacteria: a review. *Foods Sci Biotechnol* 2007;16:657-690.
19. Okuda K-I, Zendo T, Sugimoto S, Iwase T, Tajima A, Yamada S, Sonomoto K, Mizunoe Y. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:5572-5579.
20. Paik HD, Bae SS, Pan JG. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997;19:294-298
21. Pacheco-Cano RD, de la Fuente-Salcido NM, Salcedo-Hernández R, León-Galvána MF, Bideshid DK, Hernández-Guzmána G, Barboza-Corona JE. Characterization, N-terminal sequencing and classification of Tolworthcin 524: A bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Microbiological Research* 2014;169:948–953.
22. Rea M, Ross RP, Cotter P, Hill C. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In: Drider D, Rebuffat S, editors. *Prokaryotic antimicrobial peptides: From Genes to Applications*. Springer New York: Publishing Inc; 2011. pp. 29–53.
23. Riley MA, Wert JE. Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Ann Rev Microbiol* 2002;56:117-137.
24. Ugras S, Kazim S, Hatice K, Zihni D. Purification and characterization of the bacteriocin Thuricin Bn1 produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bn1 Isolated from a Hazelnut Pest. *J Microbiol Biotechnol* 2013;23:167–176.

Table 1. Inhibitory spectrum of Mexican *B. thuringiensis* (Bt) strains. Inhibition halo size is represented in mm.

Bt Strain	Indicator strain*				
	HD1	HD73	IBGM10	MRSA	<i>Lm</i>
L4-2	12	19	29	27	29
IBGM 11	11	17	26	25	24
IBGM 16	11	19	25	25	20
IBGM 19	12	21	24	-	-
IBGM 20	10	-	22	-	-
IBGM 22	10	-	-	-	-
IBGM 25	10	-	-	-	-
IBGM 26	10	-	-	-	-
IBGM 27	12	-	-	-	-
IBGM 53	14	17	25	28	25
IBGM 57	10	-	22	-	-
IBGM 62	12	20	25	26	27
IBGM 64	10	18	18	-	-
IBGM 65	10	17	20	-	-
IBGM 67	12	21	25	27	23
IBGM 68	10	19	23	-	-
IBGM 70	10	17	24	-	-
IBGM 71	12	21	23	25	27
IBGM 72	20	17	25	20	25
IBGM 74	-	-	24	-	-
IBGM 75	20	-	-	25	28
IBGM 76	-	-	22	-	-
IBGM 81	13	-	-	-	-
IBGM 82	12	-	-	-	-
IBGM 83	10	-	-	-	-
IBGM 85	12	-	-	-	-
Total	24	13	17	9	9

\**B. thuringiensis* strains HD1, HD73 and IBGM10; MRSA= methicillin-resistant *S. aureus*;

*Lm*= *L. monocytogenes*.

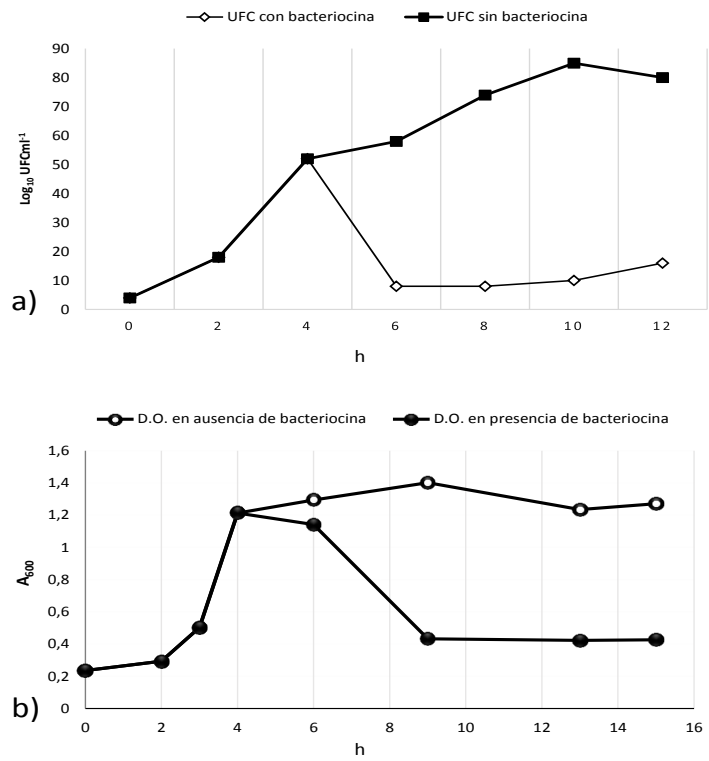


**Figure 1.** Kinetics of bacteriocin L4-2 production during growth of the L4-2 strain.

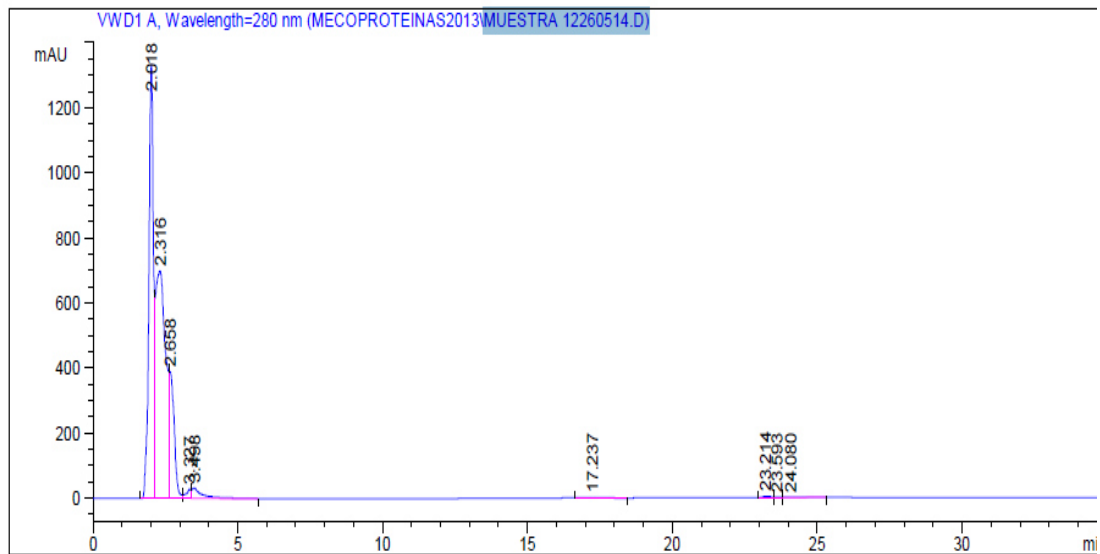
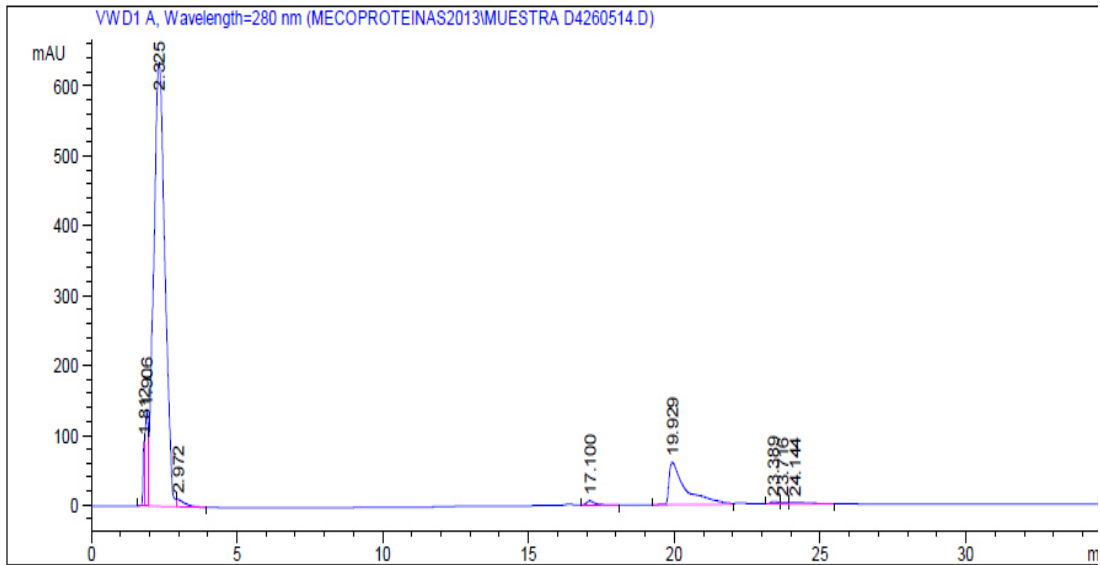
Optical density of the culture (◇), inhibitory activity (mm) on the indicator strain

(■).



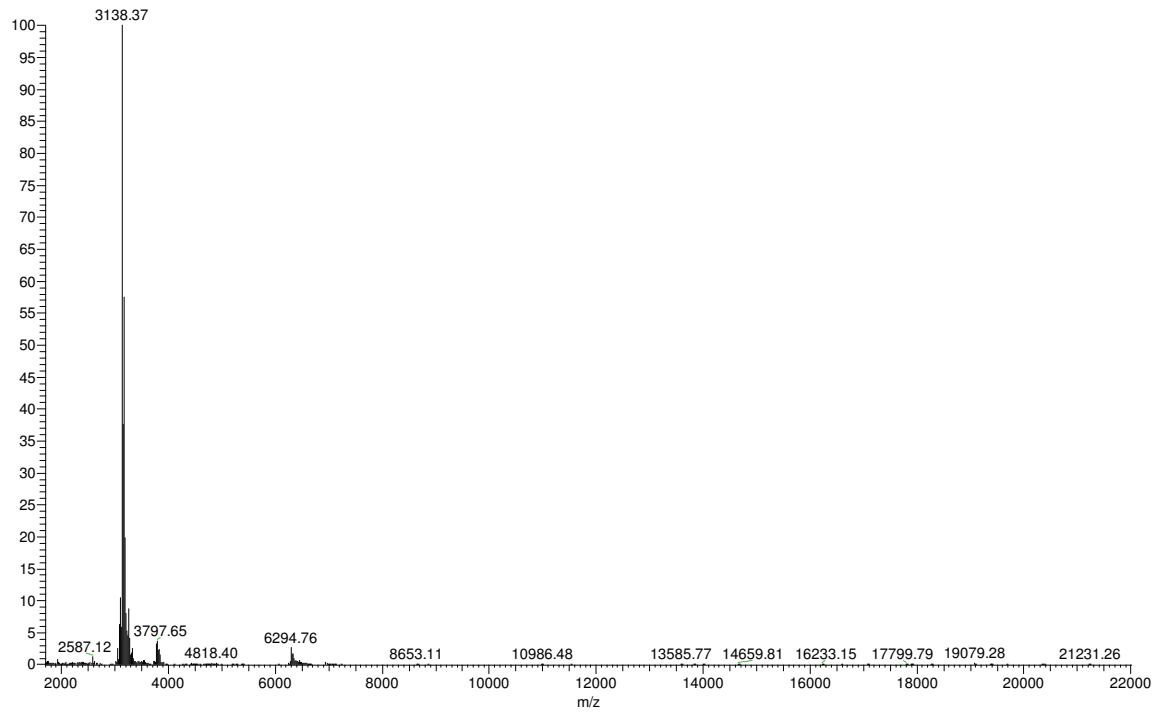


**Figure 2.** Effect of bacteriocin L4-2 on cell viability. UFC  $\text{mL}^{-1}$  (a), and optical density (b) of *B. thuringiensis* IBGM10.



**Figure 3.** Comparison of the protein file of the supernatant of strain L4-2 cultured for 12 h (A) and 24 h (B). Only the 19.929 fraction had inhibitory activity.

39-2015BenitoMW\_XT\_00001\_M\_ #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 5.47E4  
T: FTMS + c NSI Full ms [700.00-4000.00]



**Figure 4.** Molecular mass of bacteriocin L4-2, determined by mass spectrometry.