



Actividad Antimicrobiana de *Bacillus thuringiensis* Contra bacterias Patógenas Presentes en Alimentos

Herminia Vázquez-Acosta, Rubén Salcedo-Hernández y J. Eleazar Barboza-Corona.
Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato. Apdo. Postal 311, 36500,
Irapuato, Guanajuato, México.

Resumen

De 50 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* se seleccionaron 5 que presentaron actividad antimicrobiana contra *B. cereus*, *Listeria innocua* o *B. thuringiensis* subsp. *kenyae*(LBIT-52). Se analizó la actividad de las proteínas presentes en el extracto crudo, encontrándose que presentan actividad a un rango de pH amplio (de 5 a 10) y son susceptibles al ataque de proteasas. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad antimicrobiana es debido a la acción de bacteriocinas. Por otro lado, dos de las posibles bacteriocinas fueron termosensibles, mientras que otras tres fueron termoresistentes. La futura clonación de los genes, permitiría entre otras cosas: sobreexpresar las bacteriocinas, obtener proteínas quiméricas que pudieran ampliar no solo el espectro de actividad, sino también su acción a rangos de pH mas amplios; permitiendo su uso en una gran variedad de alimentos con diferentes grados de acidez.

Abstract

From 50 *Bacillus thuringiensis* studied in this work, only five showed antimicrobial activity against *Bacillus cereus*, *Listeria innocua* or *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*(LBIT-52).; Secreted proteins were active pH range of 5 to 10 and the activity was inhibited by proteases. This suggests that the antimicrobial mechanism was due to the action of bacteriocins. Alternatively, two of the putative bacteriocins were thermosensitive while the other three were thermoresistant. Future cloning of genes responsible for bacteriocin synthesis will allow over express those proteins, obtaining chimerical bacteriocins that will permit improve their activity at wider pH range and expand their use as preservative in food prepared at different pHs.

Introducción



Los probióticos contienen microorganismos que benefician la salud del hospedero mediante la adhesión y colonización del tracto intestinal, lo que permite mantener un equilibrio en las casi 100 billones de bacterias (400 especies bacterianas) que tenemos como flora intestinal. Los microorganismos probióticos usan diferentes mecanismos antagónicos contra bacterias patógenas presentes en alimentos, por ejemplo: producción de ácido láctico, ácido acético, etanol, bióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, algunas sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular (reuterina, ácido piroglutámico) y bacteriocinas (Ouwehand, 1998).

Las bacteriocinas son proteínas sintetizadas a nivel ribosómico con actividad antimicrobiana contra especies muy relacionadas y cuya actividad no es letal para la célula productora. Las bacteriocinas tienen actividad antibiótica, pero de manera estricta difieren de ellos en el sentido que no tienen uso terapéutico. La importancia de las bacteriocinas radica en que tienen actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas presentes en alimentos como *Listeria monocytogenes* (causante de la Listeriosis), *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolítica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus* (Paik y col., 1997; Escudero-Abarca y Sánchez Esquivel, 2002; Simon y col., 2002; Cherif y col., 2003; Matthews, 2004), entre otros; lo cual implica que tienen un gran potencial como bioconservadores en alimentos.

Por otro lado, la mayor parte de los reportes relacionados con *B. thuringiensis* tiene que ver con las proteínas insecticidas Cry y Cyt, en los demás campos la información es bastante escasa. Las bacteriocinas producidas por *B. thuringiensis* no son la excepción. Hasta ahora se han reportado 5 bacteriocinas producidas por diferentes especies de *B. thuringiensis* (Paik y col., 1997; Cherif y col., 2001; Cherif y col., 2003). Las bacteriocinas de *B. thuringiensis* tienen actividad contra algunas bacterias patógenas presentes en alimentos como *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cereus* y *B. weihenstephanensi* (Barboza-Corona y col. 2004)

En este trabajo se analizó la actividad antimicrobiana de diferentes cepas nativas de *B. thuringiensis* contra bacterias patógenas que se pueden encontrar en alimentos, y se caracterizaron parcialmente. Los resultados obtenidos sugieren que el mecanismo de acción antimicrobiano es debido a bacteriocinas.

Materiales y métodos



Material Biológico. Las diferentes cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* fueron donadas por el Dr. Jorge Ibarra del CINVESTAV Unidad Irapuato. *Listeria innocua* y *Pediococcus acidolactici* fueron proporcionados por la Dra. Blanca I. Escudero-Abarca de la Unidad de Desarrollo en Alimentos (UNIDA) del Instituto Tecnológico de Veracruz.

Selección de bacterias con actividad antimicrobiana (método de sobrecapa). Las bacterias fueron inoculadas BHI (extracto de cerebro-corazón) y se dejaron crecer a 28 °C durante toda la noche. Posteriormente se adicionó una capa de agar con *Listeria innocua* en condiciones de crecimiento óptimo, se incubaron durante 24 h. Las bacterias que produjeron halos de inhibición fueron seleccionadas (Calderón y col., 2001).

Análisis de las bacterias seleccionadas. Cinética de la producción de bacteriocinas. Las cepas fueron inoculadas en BHI en agitación durante 24 h a 28 °C. Bajo condiciones estériles se tomaron muestras a determinados tiempos por un periodo de 24 h. La biomasa celular fue medida a 660 nm. Los sobrenadantes fueron esterilizados por filtración y las muestras se almacenaron en congelación. Posteriormente, de manera simultáneamente a todas las muestras se les determinó la actividad por el método de difusión de pozos.

Ensayo de bacteriocina (Método de difusión de pozos). La evaluación de la actividad de bacteriocina fue determinado mediante el método modificado de Paik y col. (1997). Las cepas productoras de bacteriocina se crecieron en medio BHI y se centrifugarán a 10 000 rpm por 15 min. a 4 °C. El sobrenadante fue recolectado, se le ajustó el pH a 6.8 con NaOH al 5% y se filtró con membranas de 0.22 µm.

Para preparar las cajas para la prueba de difusión de pozos, la bacteria testigo fue crecida en caldo de soya a 37 °C por 18 hrs. Después de este tiempo se tomó una alícuota y se resembró en caldo de soya fresco por 2 hrs. Se hicieron varias diluciones en solución de NaCl (8.5g/L), y se adicionó 105 µl de la dilución por cada 15 ml de agar de soya fundido. Se vertieron 25 mL del agar con la bacteria en cajas petri, se dejó solidificar y se hicieron pozos de 8 mm de diámetro. Se agregaron de 100 µL de muestra con bacteriocina preparada como se indicó previamente. Las cajas fueron mantenidas a 4°C durante 12 hrs. para permitir la difusión del sobrenadante. Finalmente se incubaron a 37 °C durante 12 hrs., y se observó la formación de halos de inhibición alrededor de los pozos. Una unidad fue definida como el área de inhibición en mm² por µl de extracto crudo.

Efecto de la temperatura, pH y enzimas sobre la actividad. Diferentes muestras de extracto crudo libres de células fueron tratadas a 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 121 °C por 30 min, y 121 por 20 min. Para determinar el efecto del pH, las muestras fueron puestas en varias



soluciones reguladoras a diferentes pHs y almacenadas durante un día a 4°C. Para examinar la susceptibilidad de las bacteriocinas a diferentes enzimas, las muestras fueron tratadas durante 1 h a 37 °C con proteasas de *Bacillus licheniformis* y de *Streptomyces griseus* y con lizosima en los amortiguadores recomendados por los proveedores. Las muestras de cada uno de los tratamientos fueron evaluados mediante el método de difusión en pozos y las unidades fueron definidas como se describió previamente.

Resultados y discusión

La actividad antimicrobiana fue analizada en 50 cepas nativas de *B. thuringiensis*. De estas, se seleccionaron 5 (*B. thuringiensis* 269, 287, 404, 420 y 524), las cuales presentaron actividad contra *B. cereus* 183. El hecho de tener actividad antimicrobiana contra *B. cereus*, patógeno comúnmente encontrado en alimentos, nos indicó que esas bacterias podrían tener actividad contra otros patógenos. Con el propósito de encontrar el mecanismo de acción y de analizar la actividad antimicrobiana contra otras bacterias, las proteínas de secreción fueron analizadas mediante la prueba de difusión de pozos. Se encontró actividad contra otra cepa de *B. cereus* (001), contra *Listeria innocua*, en algunas cepas de *B. thuringiensis*, pero no contra *Escherichia coli*. Los resultados de actividad son prometedores y no se descarta el efecto antimicrobiano contra otros patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, el cual deberá ser analizados posteriormente.

Cuando se analizó el efecto de tres proteasas y de la lizosima sobre la actividad, se encontró que las proteasas inhiben la actividad, lo cual sugiere que una proteína es la responsable de la actividad antimicrobiana, es decir una bacteriocina. Por otro lado, resultó interesante que la lizosima ejerció un efecto inhibitorio sobre la actividad. Ya que la lizosima actúa a nivel de polisacáridos, los resultados indican que probablemente el efecto antimicrobiano se deba a que la bacteriocina está asociada a carbohidratos. Cuando se analizó el efecto de la temperatura, las bacteriocinas de las cepas 404, 420 y 524 fueron termoresistentes hasta los 121 °C, y las de las cepas 269 y 287 fueron sensibles a partir de los 80 °C. Estos resultados parecen indicar que las bacteriocinas sintetizadas por el primer grupo, son de bajo peso molecular y las del segundo son de alto peso molecular (Cherif y col., 2003). Al estudiar el efecto del pH sobre la actividad contra *B. cereus*, se encontró que este fue variable. Al punto de actividad máximo para cada cepa, *B. thuringiensis* 287 tuvo su máxima actividad a pH 5 (155 U), *B. thuringiensis* 404 a pH 6 (136), *B. thuringiensis* 420 a pH 10 (161.325 U) y *B. thuringiensis* 524 a pH 5 (190 U). Estos resultados indican que las cepas



estudiadas presentan diferentes bacteriocinas, las cuales pudieran ser utilizadas para controlar patógenos presentes en alimentos preparados con diferentes pHs.

Por último, la actividad de las bacteriocinas contra otros microorganismos patógenos, su purificación y clonación de los genes que codifican dichas proteínas están planeadas en un futuro cercano. La clonación de los genes permitiría entre otras cosas el obtener proteínas quiméricas que pudieran ampliar no solo el espectro de actividad sino también su acción a rangos de pH, permitiendo su uso en una gran variedad de alimentos con diferentes grados de acidez.

Agradecimientos

Al CONCYTEG por el apoyo otorgado a Herminia Vázquez-Acosta durante el 1er verano de Investigación Estatal (2004) y por la beca-tesis de licenciatura (Convenio 04-16-k119-078).

Bibliografía

- Barboza-Corona, J.E., Vázquez Acosta, H., Salcedo-Hernández, R., Bautista-Justo, M. 2004. Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria*. 14(3): 32-38.
- Calderón-Santoyo, M., Mendoza-García, P.G. García-Alvarado, M.A. y Escudero-Abarca, B.I. (2001). Effect of physical factors on the production of bacteriocins from *Pediococcus acidilactici* ITV 26. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26: 191-195.
- Cherif A., Chehimi, S., Limen, F., Hansen B.M., Hendriksen, N.B. Daffonchio, D., and Boudabous, A. 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocidus 9, and safety evaluation of its producer , *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9. *J. Appl. Microbiol* . 95:990-1000.
- Escudero-Abarca, B. I. y Sánchez Esquivel, S. (2002). Bacteriocinas de bacterias lácticas: biosíntesis y transporte. *Revista de Educación Bioquímica*. 21(1):12-20.
- Cherif A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Slama, K.B., Hassen, A., Jaoua, S. and Boudabous, A. 2001. *Letter Appl. Microbiol*. 32: 243-247.
- Matthewes, K.R. 2004. Here, there, everywhere: antibiotic-resistant foodborne pathogens. *Food Technology*. 58 (4): 104.
- Ouwehand A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Edited by S. Salminen and A. von Wright. 2nd ed. Marcel Dekker Inc. New York USA. pp. 139-159.



Paik, H.D. Bae, S.S. Park, S.H. and Pan, J.G. (1997). Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19: 294-298.

Simon L., Fremaux C., Cenatiempo Y. And Berjeaud. 2002 Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Env. Microbiol.* 68: 6416-6420.